

**T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**YAZMA ESERLERDE TAHRİBATA NEDEN OLAN MİKROBİYAL
TOPLULUĞUN MOLEKÜLER DÜZEYDE TANIMLANMASI**

DOKTORA TEZİ

Esra KELEŞ

1700005504

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik Doktora

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Özge ÇELİK

TEMMUZ 2024

**T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**YAZMA ESERLERDE TAHRİBATA NEDEN OLAN MİKROBİYAL
TOPLULUĞUN MOLEKÜLER DÜZEYDE TANIMLANMASI**

DOKTORA TEZİ

Esra KELEŞ

1700005504

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik Doktora

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Özge ÇELİK

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Çimen ATAĞ

: Prof. Dr. Ercan ARICAN

: Prof. Dr. Seyhan ALTUN

: Dr. Öğretim Görevlisi Orkun YAYCILI

TEMMUZ 2024

ÖNSÖZ

Çalışmamda bana yol gösteren ve bilgilerini paylaşan değerli hocalarım Prof. Dr. Özge ÇELİK, Prof Dr. Çimen ATAĞ ve Prof. Dr. Ercan ARICAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde her türlü katkıdan dolayı Türkiye Yazma Eserler Kurumu Başkanlığı'na ve Süleymaniye Yazma Eser Kütüphanesi Müdürlüğü'ne, eserlere ulaşımımı sağlayan Yazma ve Nadir Eserler Daire Başkanı Hüseyin KUTAN'a, Süleymaniye Kütüphanesi çalışanları Mustafa DİL, Gülseren TANKUŞ ve Hakan ŞENTEPE'ye teşekkür ederim. Yazma eserler hakkında künye bilgilerinin tercümesini yapan İsmail Fakirullah YILDIZ'a, pH ölçümlerini gerçekleştiren Adem KEMER'e, İslami kağıt hakkında verdiği bilgiler ve kaynaklar için Esra FENER ve Merve ER'e teşekkür ederim. Çalışma arkadaşım Feyza Binnur OLGUNAY'a desteklerinden dolayı teşekkür ederim. Ve her türlü bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan değerli müdürüm Ömer KUZGUN'a, çok değerli arkadaşım kağıt restoratörü Hatice Karagöz ERGÜVEN'e ve Dr. Sabiha ACER'e çok teşekkür ederim

Tez çalışmam sürecinde yanımda olan ve beni destekleyen aile üyelerime; başta eşim Önder Zeki KELEŞ'e, çocuklarım Serra KELEŞ, Zehra KELEŞ ve Ahmet ASIM KELEŞ'e ve annem Müsevver ÇAVUŞOĞLU'na yürekten teşekkür ederim.

TEMMUZ 2024

ESRA KELEŞ

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
SİMGE LİSTESİ.....	viii
TÜRKÇE ÖZET.....	ix
YABANCI DİL ÖZET.....	x
1.GİRİŞ	1
2. YAZMA ESERLERDE MİKROBİYAL BOZULMALAR VE YAZMA ESER BAKTERİYAL FLORASI	4
2.1 Kağıt:	10
2.2 Cilt:	14
2.3 Yazma Eserlerdeki mikrobiyal topluluğunun tanımlanmasında Yeni Nesil Dizileme teknolojisi.....	16
3. MİKROBİYAL KONTAMİNANTLARIN TANIMLANMASI.....	24
3.1 Örnekleme (Sampling)	24
3.2 Kültür Temelli Teknikler.....	25
3.3 16S rRNA Amplifikasyonu ve Sanger Dizileme.....	25
3.4 Metagenomik Analizler	26
4- MATERYAL VE METOD	31
4.1 Kültür temelli Analizlerle Bakterilerin Tanımlanması.....	34
4.1.1 Örnek alma.....	34
4.1.2 İnokulasyon ve İnkübasyon	35
4.2 İzole edilen bakterilerin 16S rRNA analizleri	35
4.4 Metagenomik Analizler	36
4.4.1 Örnek Alma.....	36
4.4.2 DNA izolasyonu ve 16S rRNA Amplifikasyonu	37
4.4.3 İndeks PCR ve Kütüphane oluşturulması	38
4.4.3 Dizileme:.....	38
4.4.4 Biyoinformatik Analizler:.....	39
5. SONUÇLAR	41
5.2 Kağıtta pH Ölçümleri	41
5.2 İzole edilen bakteri kolonilerin 16S rRNA Analizleri.....	41
5.2 Metagenomik 16s rRNA Analizleri	47
5.2.1 Dizileme:.....	48
5.2.2 Biyoinformatik Analizler:.....	48

TARTIŞMA	67
KAYNAKÇA.....	79
EKLER.....	89
ÖZGEÇMİŞ.....	100



KISALTMALAR

bç	:Baz çifti
BLAST	:Basic Local Alignment SearchTool
DADA	:The Divisive Amplicon Denoising Algorithm
DGGE	:Denatüran Jel Elektroforozu
DNA	:Deoksiribo Nükleik Asit
ECC	:E. Coli/ Coliform Agar
ETE	:Environment for Tree Exploration
IFLA	:International Federation of Library Associations and Institutions
ITS	:Internal transcribed spacer
LC-MS	:Sıvı kromatografisi-Kütle spektrometrisi
MALDITOF-MS	:Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Kütle spektrometrisi
NB	:Nutrient Broth
NCBI	:National Center of Biotechnology Information
OTU	:Operasyonel Taksonomik Ünite
PCR	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PcoA	:Principal coordinate analysis
pH	:Asitlik/bazlık derecesini ifade eden ölçü birimi
PVC	:Polivinil klorür
QIIME	:Quantitative insights into microbial ecology
rRNA	:Ribozomal Ribonükleik Asit
sp.	:Tür
TSBA	:Tryptic Soy Broth Agar
TSA	:Tryptic Soy Agar
UPGMA	:Unweighted pair group method with arithmetic mean
WGS	:Tüm genom dizileme (Whole genom sequencing)
YND	:Yeni Nesil Dizileme
Yy	:yüzyıl

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1	Yazma ve matbu eserlerde 2010-2024 yılları arasında yapılmış çalışmalarda kültür temelli yöntemlerle izole edilen ve tanımlanan bakteri tür ve cinsleri	6
Tablo 2.2	Yazma eserlerde Metagenomik ve YND analizleriyle yapılan çalışmalar	18
Tablo 2.3	Yazma ve Nadir Matbu Eserlerde Metagenomik analizlerle en sık tanımlanan bakteri cinsleri.	21
Tablo 4.1	Örnek alınan eserler hakkında künye bilgileri ve tahribat detayları	33
Tablo 4.2	Metagenomik PCR amplifikasyonunda kullanılan primer çifti	38
Tablo 5.1	Kağıtta pH ölçüm değerleri	42
Tablo 5.2	Örneklerde PCR sonrası ölçülen DNA konsantrasyonları	43
Tablo 5.3	İzole edilen bakterilere ait tür düzeyinde tanımlama, benzerlik oranı ve erişim numarası	46
Tablo 5.4	İzolasyon sonrası DNA konsantrasyonları	48
Tablo 5.5	Örneklerdeki okunan dizi sayısı ve Kalite skorları değerleri	49

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	: Farklı eselerde görülen mikrobiyal tahribatlar	4
Şekil 2.2	: Kağıt yüzeyinde farklı formlarda mikroorganizmalar	7
Şekil 2.3	: A) Sırt kısmında beyaz renkli küf gelişmiş bir yazma eser. B) Yazma eser üzerinden bantla örnek alınması C) Mikroskop altında Eurotium sp. X50 görüntüsü D) Küflerden alınan örneklerde x50 büyüklükte mikroskop altında görülen Akar	9
Şekil 2.4	: Kağıdın çok katmanlı yapısı ve kimyasal bileşimi	11
Şekil 2.5	: Selüloz liflerindeki amorf ve kristal bölgeler.	12
Şekil 2.6	: Selüloz makromolekülünün sellülaz enzim gruplarıyla aşamalı olarak glukoza parçalanması	13
Şekil 2.7	: Selülozların ve LPMO enzimlerinin sinerjistik etkileşim yoluyla selülozun enzimatik degradasyonu	13
Şekil 2.8	: Kolajenin yapısı ve yapısında bulunan 3 farklı amino asit	15
Şekil 2.9	: Kolajenin Kollajenaz enzimiyle peptidlere ayrılması	15
Şekil 3.1	: Pinzari v.d. çalışmasında gerçekleştirdiği mikro aspirasyon örnekleme yöntemi	24
Şekil 3.2	: Ribozom kompleksi ve 16S rRNA geni şeması.	26
Şekil 3.3	: Illumina Miseq 16S rRNA metagenomik dizileme iş akışı şeması	28
Şekil 3.4	: İndeks PCR şeması	29
Şekil 3.5	: YND ile elde edilen verilerin (okumaların) OTU'lara atanmasını gösteren şema düzeni	29
Şekil 4.1	: A-B) 17 no'lu eserde baş kısmındaki pamuk su görünümü almış kağıt ve parça kayıpları. C) 231 no'lu eserde kemirfen tahribatı ve mikroorganizma nedeniyle meydana gelen kağıt üzerindeki lekeler. D) 54 no'lu eserde ciltte meydana gelen parça kayıpları E) 71 no'lu eserde meydana gelen lekeler ve pamuksu görünüm.	33
Şekil 4.2	: Eserler üzerinde pH ölçümleri	33
Şekil 4.3	: Eserlerden steril swablarla örnek alınması	34
Şekil 4.4	: Örnek alımından itibaren TSA üzerinde saf kolonilerin izole edilmesine kadar geçen iş akışı	35
Şekil 4.5	: A) Çalışılan yazma eserden yoğun tahribat görülen alan B) Tahribatlı alandan kopmuş ve dökülmüş kağıt parçalarının steril 1,5 ml.lik tüplere konulması	37
Şekil 5.1	: Amplikonların %1,5 Agaroze jeldeki görüntüsü B) Solis Biodyne 3000 bp DNA markır	42
Şekil 5.2	: TSA üzerinde izole edilen bakteri kolonileri	43
Şekil 5.3	: İzole edilen bakterilerin Mikroskop görüntüsü X100	44
Şekil 5.4	: Swablarla örnek alındıktan sonra ekimi yapılan Kromojenik ECC Agarlarda gelişim	46
Şekil 5.5	: A) PCR ürünleri %1,2'lik agaroz jel görüntüsü B) Solis Biodyne 3000 bp DNA markır	47
Şekil 5.6	: Okumaların dizi derinliğine bağlı Observed Features (ASV) dağılımı grafiği	49
Şekil 5.7	: 6 örnekte bakteri toplulukları için oluşturulan UPGMA filogenetik ağacı	49
Şekil 5.8	: Örneklerdeki Chao-1 indisi dağılımı	50
Şekil 5.9	: Örneklerdeki Shannon (H') indisi dağılımı	51
Şekil 5.10	: Örneklerdeki Simpson 1-D İndisi dağılımı	51

Şekil 5.11	: Ağırlıksız unifrac uzaklık	52
Şekil 5.12	: Baskın bakteriyal şubelerin 6 örnek arasındaki sekans dağılımı	53
Şekil 5.13	: Örneklerde tanımlanan tüm şubelerin yüzdelik dilimlerde görülme sıklığını gösteren bar grafiği	54
Şekil 5.14	: T1 örneğinde bakteriyal toplulukta en yüksek bollukta temsil edilen şubeler	55
Şekil 5.15	: T1 örneğinde %1 ve üzeri sıklıkla görülen bakteri cinsleri	56
Şekil 5.16	: T2 örneğinde bakteriyal toplulukta en yüksek bollukta temsil edilen şubeler	57
Şekil 5.17	: T2 örneğinde %1 ve üzeri sıklıkla görülen bakteri cinsleri	58
Şekil 5.18	: T3 örneğinde bakteriyal toplulukta en yüksek bollukta temsil edilen şubeler	59
Şekil 5.19	: T3 örneğinde %1 ve üzeri sıklıkla görülen bakteri cinsleri	60
Şekil 5.20	: T4 örneğinde bakteriyal toplulukta en yüksek bollukta temsil edilen şubeler	61
Şekil 5.21	: T4 örneğinde %1 ve üzeri sıklıkla görülen bakteri cinsleri	62
Şekil 5.22	: T5 örneğinde bakteriyal toplulukta en yüksek bollukta temsil edilen şubeler	63
Şekil 5.23	: T5 örneğinde %1 ve üzeri sıklıkla görülen bakteri cinsleri	64
Şekil 5.24	: T6 örneğinde bakteriyal toplulukta en yüksek bollukta temsil edilen şubeler	65
Şekil 5.25	: T6 örneğinde %1 ve üzeri sıklıkla görülen bakteri cinsleri	66
Şekil A.1	: T1 örneğine ait forward ve reverse ham sekans kalite skorları	90
Şekil A.2	: T2 örneğine ait forward ve reverse ham sekans kalite skorları	90
Şekil A.3	: T3 örneğine ait forward ve reverse ham sekans kalite skorları	91
Şekil A.4	: T4 örneğine ait forward ve reverse ham sekans kalite skorları	91
Şekil A.5	: T5 örneğine ait forward ve reverse ham sekans kalite skorları	92
Şekil A.6	: T6 örneğine ait forward ve reverse ham sekans kalite skorları	92
Şekil B.1	: T1 Örneğinde en yüksek yoğunlukta görülen Şubelerdeki sadece cins oranlarını gösteren Krona grafikleri	93
Şekil B.2	: T2 Örneğinde en yüksek yoğunlukta görülen Şubelerdeki sadece cins oranlarını gösteren Krona grafikleri	94
Şekil B.3	: T3 Örneğinde en yüksek yoğunlukta görülen Şubelerdeki sadece cins oranlarını gösteren Krona grafikleri	95
Şekil B.4	: T4 Örneğinde en yüksek yoğunlukta görülen Şubelerdeki sadece cins oranları	96
Şekil B.5	: T5 Örneğinde en yüksek yoğunlukta görülen Şubelerdeki sadece cins oranlarını gösteren Krona grafikleri	97
Şekil B.6	: T6 Örneğinde en yüksek yoğunlukta görülen Şubelerdeki sadece cins oranlarını gösteren Krona grafikleri	98
Şekil C.1	: Broussonetiae'ye ait temsili dizi	99

SİMGE LİSTESİ

B	: Beta
OH	: Hidroksil
%	: Yüzde
a_w	: Su aktivitesi
<	: Küçüktür
V	: volt
B	: Beta
OH	: Hidroksil
K	: Potasyum
Mg	: Magnezyum
S	: Kükürt
P	: Fosfor
ml	: Mililitre
Ng	: Nanogram

Üniversite	:	İstanbul Kültür Üniversitesi
Enstitüsü	:	Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Dalı	:	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı	:	Moleküler Biyolojli ve Genetik
Tez Danışmanı	:	Prof. Dr. Özge Çelik
Tez Türü ve Tarihi	:	Doktora-TEMMUZ 2024

KISA ÖZET

YAZMA ESERLERDE TAHRİBATA NEDEN OLAN MİKROBİYAL TOPLULUĞUN MOLEKÜLER DÜZEYDE TANIMLANMASI

Esra KELEŞ

Mikroorganizmalar termo-higrometrik parametrelerin etkisiyle yazma eserler üzerinde büyük tahribatlar meydana getiren biyobozuculardır. Değerli el yazmalarının korunması ve onarımının yapılmasında bilimsel veri oluşturması açısından mikrobiyal topluluğun tanımlanması son yıllarda büyük önem kazanmıştır. Yazma eserlerdeki biyobozucuların tanımlanmasında ve mikrobiyal verinin oluşturulmasında farklı teknikler kullanılmaktadır. Bu çalışmada 2 koleksiyona ait 6 farklı yazma eser üzerinde kültür temelli analizlere dayalı moleküler teknikler ile bakteriyel kontaminantlar tanımlanmış ve kültür bağımsız Yeni Nesil Dizileme Teknolojileri kullanılarak bakteriyel taksonomik çeşitlilik analizleri gerçekleştirilmiştir. İki yöntemden elde edilen veriler kıyaslanmıştır. Metagenomik analizler, geleneksel kültür temelli tanımlama yöntemlerine göre tüm mikrobiyal topluluğun tanımlanmasında daha yüksek çeşitlilik göstermiştir. Kültür temelli analizlerde bakterilerin tanımlanması için 16S rRNA Amplikon Sanger Dizilemesi gerçekleştirilmiş ve 16 bakteri izole edilmiştir. Bakteri türleri *Niallia circulans*, *Micrococcus luteus*, *Priestia Megaterium*, *Microbacterium foliorum*, *Bacillus haynesii*, *Ornithinibacillus scarpharcae*, *Psychrobacter pulmonis*, *Neobacillus niacini*, *Fredinandcohnia humi* (*Bacillus humi*) olarak tanımlanmıştır. Metagenomik analizlerde tüm örneklerde baskın şubeler her örnekte farklı nispi bolluk oranlarıyla *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidota* ve *Proteobacteria* olarak tanımlanmıştır. T1-T6 örneklerinde cins düzeyinde sırasıyla 495, 540, 280, 337, 226, 338 OTU tanımlanmıştır. Metagenomik analizlerden elde edilen veriler cins düzeyinde değerlendirildiğinde uzun bir süre aynı ortam koşullarına maruz kalmış olduğu düşünülen eserlerdeki bakteriyel kontaminasyonun kaynağı hakkında bilgi vermektedir. Çalışma ile elde edilen sonuçlar yazma eserlerin bakteriyel arşivini oluşturmakta ve sonraki çalışmalar için veri oluşturmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Yazma eserler, Mikrobiyal bozulmalar, Metagenomik

University : Istanbul Kültür University

Institute	:	Institute of Graduate Studies
Department	:	Molecular Biology and Genetics
Programme	:	Molecular Biology and Genetics
Supervisor	:	Prof. Dr. Özge Çelik
Degree Awarded and Date	:	PhD–JULY 2024

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF MICROBIAL COMMUNITY CAUSING DEGRADATION IN MANUSCRIPTS AT MOLECULAR LEVEL

Esra KELEŞ

Microorganisms, with the effect of thermo-hygrometric parameters, are involved in the biodegradation process of cultural assets, causing significant destruction of manuscripts. Investigating microbial communities and creating scientific data has gained great importance in conserving and restoring manuscripts. This study analysed six manuscripts from the different collections to identify microbial communities using culture dependent 16S rRNA Sanger Sequencing and culture independent Next Generation Sequencing. The results indicate significant differences in biodiversity. 16 Bacterial isolates from cultural dependent techniques were identified with 16s RRNA amplification sequencing. Bacteria species were identified as: *Niallia circulans*, *Micrococcus luteus*, *Priestia Megaterium*, *Microbacterium foliorum*, *Bacillus haynesii*, *Ornithinibacillus scarpharcae*, *Psychrobacter pulmonis*, *Neobacillus niacini*, *Fredinandcohnia humi* (*Bacillus humi*). However, greater biodiversity was observed with culture independent analysis. Frequently observed were filum of Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidota and Proteobacteria with different relative abundance on each sample. 495, 540, 280, 337, 226, 338 OTUs were identified at genus level in order from T1-T6 samples. Thus, it can be concluded that DNA analyses provide information about the source of bacterial contamination and the historical use of manuscripts. The results obtained from the study constitute the bacterial archive of manuscripts and provide data for further studies.

Key Words: Manuscripts, Microbial Deteriorations, Metagenomics

1.GİRİŞ

Yazma eserler, basım tekniğinin gelişmediği dönemlerde elle yazılmış eserlerdir. Türkiye kültürel mirasının önemli bir parçası olan yazma eserler bilgi kaynakları olmalarının yanısıra üretilmiş olduğu dönemlere ve bölgeye dair birçok veriyi de taşımaktadır. Türkiye yazma eserler açısından zengin bir ülkedir. Müze, kütüphane, kilise, vakıf ve şahıslarda farklı dönemlere ve menşeye ait genellikle Arapça, Osmanlıca, Farsça ve daha az sayıda farklı dillerde yazılmış yazma eserler mevcuttur. Türkiye'nin en büyük yazma eser kütüphanesi olan Süleymaniye Yazma Eser Kütüphanesi; Süleymaniye Külliyesi'nde yer almakta ve değerli basma ve yazma eserleri bünyesinde bulundurmaktadır. Günümüzde bağışlarla ve sonradan alınan yazma-basma eserlerle birlikte toplam eser sayısı 180.000 civarındadır. Fatih, Hamidiye, Sultan Ahmed, I. Mahmud tarafından kurulan Ayasofya ve Lâleli gibi önemli padişah koleksiyonları da kütüphanede yer almaktadır.

Tarihi değeri yüksek olan birçok yazma eser günümüze kadar tahribatsız olarak korunmuş olsa da; eserlerin bir kısmında çevrelerdeki ışık, sıcaklık, nem ve hava kirleticiler gibi abiyotik faktörlerin etkisiyle ve biyotik zararlıların varlığıyla tahribatlar meydana gelmiştir. Mikroorganizmalar, böcekler ve fareler eserin estetik ve fiziksel yapısını bozan biyobozuculardır.

Belirli çevresel faktörler altında çok çeşitli enzimatik aktiviteleri (proteinaz, selülotik enzimler-endoglikonazlar, eksoglikonazlar, β -glikozidazlar) ve düşük su aktivitesinde (a_w) gelişebilmelerinden dolayı mikroorganizmalar yazma eserlerin organik ve inorganik unsurları üzerinde gelişebilmektedir. Yüksek bağıl nem ve sıcaklık, ışık, pH, salinite gibi çevresel faktörler ve kirleticilerin etkisine bağlı olarak redoks reaksiyonlar, mikroorganizmaların yazma eserlerin unsurlarında gelişmesi için olumlu koşullar oluşturabilmektedir (Gutarowska, 2020). Kağıdın temel bileşeni selüloz, yapıştırıcılar, dolgu maddeleri ve K, Mg, S, P gibi eser elementlerin varlığı yazma

eserlerin mikrobiyal bozulmalara karşı hassasiyetini arttırmaktadır. Mikroorganizmalar, mikrobiyal pigmentlerin ve metabolitlerin salgılanması ile kağıt üzerinde farklı renklerde ve şekilde lekelerin meydana gelmesine, selüloz liflerinin depolimerizasyonu sonucu kağıdın fiziksel ve kimyasal yapısının zayıflamasına, mürekkebi besin maddesi olarak kullanarak yazının silinmesine neden olmaktadır. Mikrobiyal asidik metabolitler, asit kaynağı olarak kağıdın asit hidrolizini arttırabilmektedir (Zhang v.d., 2023). Suyun varlığı da kağıt üzerinde mikroorganizma gelişimini hızlandıran önemli bir faktördür. Mikroorganizmaların neden olduğu yapısal hasarlar makroskobik olarak görülebilmekte ve görsel olarak ayırt edilebilmektedir. Yapılan saha çalışmasında Türkiye Yazma Eserler Kurumu'na bağlı tüm yazma eser kütüphanelerinde yaklaşık olarak 17.000 eserde mikroorganizma tahribatı tespit edilmiştir.

Yazma Eserler üzerindeki tüm mikrobiyal topluluğun tanımlanması ve metabolik aktivitelerinin bilinmesi bu eserlerin koruma stratejilerinin belirlenmesinde önemlidir. Mikrobiyal toplulukların tanımlanmasında farklı yaklaşımlar mevcuttur. Genellikle çalışmalar 2 farklı strateji ile yürütülmüştür. Bunlar mikroorganizmaların seçili besiyerinde izole edilmesine dayalı kültür temelli teknikler ve nükleik asitlerin direk ortamından ekstraksiyonu ve analizine dayalı kültür bağımsız tekniklerdir. Geçmişte kültür temelli tekniklerle tanımlamalar yapılmıştır. Son yıllarda omik teknolojilerinde ve spektroskopik tekniklerdeki gelişmelere bağlı olarak kültürel miras öğelerinde tüm biyomoleküllerin tanımlamasına yönelik yapılan disiplinler arası çalışmalar da artmıştır. DNA, RNA, protein ve metabolit gibi biyomoleküllerin tanımlanmasında kullanılan Metagenomik, Metatranskriptomik, Metabolomik ve Proteomik analizlerle ve yapısal hasarın ve bileşimlerindeki değişikliklerinin saptanması için spektroskopik ve kromorografik tekniklerle fiziko-kimyasal analizler gerçekleştirilmiştir (Creydt ve Fischer, 2023).

Bu çalışmada Mikroorganizma tahribatı görülen yazma eserlerdeki bakteriyal toplulukları tanımlamak amacıyla 2 farklı tanımlama tekniği kullanılmış ve sonuçları karşılaştırılmıştır. 6 farklı kağıt esaslı yazma eser üzerinde, kültür temelli moleküler teknikler ve kültür bağımsız teknikler kullanılarak tahribata neden olan tüm bakteriyal topluluk tanımlanmaya çalışılmıştır. Kültür temelli analizlerle canlı bakteriler izole

edilmiş ve tür tanımlaması 16s rRNA amplifikasyonu Sanger Dizileme ile gerçekleştirilmiştir. Kültür bağımsız tekniklerde (Metagenomik), Illumina Miseq platformunda yüksek verimli dizileme teknolojileri ile mikroflora ve taksonomik çeşitlilik belirlenmiştir. Metagenomik analizlerde tüm canlı ve cansız bakteriyel topluluğun tanımlanmasıyla bakteriyel floranın biyodegradasyondaki potansiyel rolü hakkında veri oluşturulması amaçlanmıştır. Aynı koleksiyona ait eserlerin ortak geçmişe sahip oldukları düşünülerek eserlerin tahribatları üzerinden geçmişteki ortam şartları ve bulunduğu alanlara dair bilgi edinilmeye çalışılmıştır. İki farklı teknikle elde edilen veriler kıyaslanmıştır.



2. YAZMA ESERLERDE MİKROBİYAL BOZULMALAR VE YAZMA ESER BAKTERİYAL FLORASI

Hueck “mikrobiyal bozulmalar”ı, farklı mikroorganizmaların aktivitesi sonucu meydana gelen istenmeyen ve geri dönüşümsüz fiziko-kimyasal değişimler olarak tanımlamıştır (Hueck, 1968). Biyolojik bozulmalar, materyalin fiziko-kimyasal özellikleri, ekolojik çevre ve organizmalar gibi faktörlerin etkileşimi ile meydana gelmektedir. Yazma eserler üzerinde de mikrobiyal bozucuların etkisiyle geri dönüşümsüz fiziksel ve kimyasal değişimler meydana gelmektedir. Fiziksel etkinin görüldüğü bozulmalarda; pigmentlerin ve enzimlerin salgılanmasına bağlı olarak yuvarlak ya da düzensiz şekilli, farklı renklerde lekeler oluşmakta, kağıdın tüketilmesiyle kopmalar, yırtılmalar, delikler, pamuklaşma, keçeleşme ve kırılmalar meydana gelmekte, mürekkebin rengi solabilmektedir. Kimyasal etkinin görüldüğü bozunmada; metabolik aktivite sonucu organik (formik asit, asetik asit, laktik asit) ve inorganik (karbonik asit, nitrik asit, sülfürik asit) asitlerin üretilmesi ve bunun sonucunda pH’ın düşmesi ve metabolik ürünlerin etkisiyle kağıdın mekanik direnci düşmektedir. Şekil 2.1’de yazma eserler üzerinde meydana gelmiş farklı mikrobiyal tahribatlar görülmektedir.



Şekil 2.1 Farklı eserlerde görülen mikrobiyal tahribatlar A) Pigmentlerin ve enzimlerin etkisiyle meydana gelen lekeler B) Kağıdın tüketilmesiyle meydana gelen pamuklaşma ve parça kayıpları.

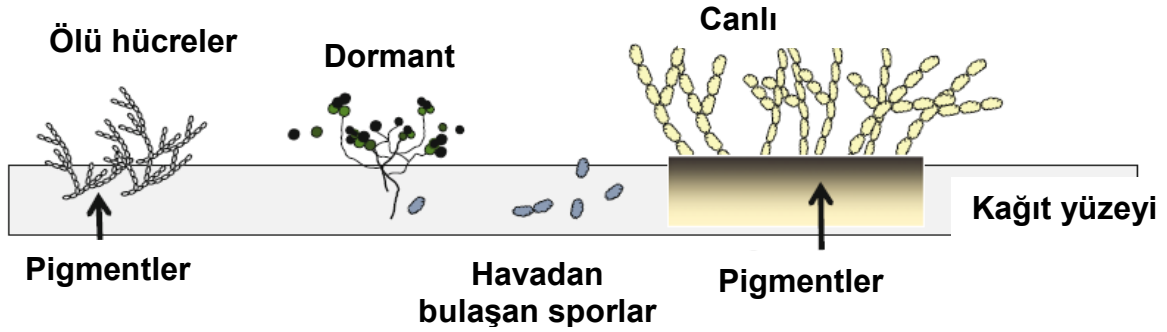
Yazma eserlerin cildinde ve sayfalarında bulunan tüm mikroorganizmalar yazma eser mikroflorasını oluşturmaktadır. Fiddymment'e göre zaman içerisinde yazma eserlerin kullanımına, üretimine, konservasyonuna ve tarihine bağlı olarak esere özgü kendi mikroflorası oluşmuştur (Fiddymment v.d., 2019). Yazma eserlerde ve tarihi kitaplarda mikrofloranın tanımlanması için farklı tekniklerle çalışmalar yapılmıştır. Bunlar, mikroorganizmaların spesifik mikrobiyolojik ortamda geliştirilmesi üzerine dayalı kültür temelli teknikler ve DNA'nın direk olarak yazma eserin unsularından (kağıt ya da deri) ekstraksiyonu ve analizi ile gerçekleştirilen kültür bağımsız tekniklerdir. Geçmişte kağıt materyal üzerinde mikrobiyal kontaminantların belirlenmesi amacıyla daha çok kültür temelli analizler gerçekleştirilmiştir (Borrego v.d., 2012; Mesquita v.d., 2009; Krakova v.d., 2012; Manente v.d., 2012). Kültür temelli analizlerde izole edilen mikroorganizmalar 16S rRNA bakteriyal ve 18S rRNA fungal amplifikasyonu moleküler analizler ile tanımlanmıştır (Michaelsen v.d., 2010; Karakasidou v.d., 2018). Çoğunlukla Proteobacteria, Frimicutes ve Acitnobacteria şubelerine ait Bacillus, Clostridium, Staphylococcus, Streptomyces, Acinetobacter bakteri cins üyeleri tanımlanmıştır ve Tablo 2.1 verilmiştir.

Kültür bağımsız tekniklerde Denatüran Jel Elektroforezi (DGGE) ile DNA parmak izi analizleri ve 16S rDNA klon kütüphanesi analizleri kullanılmıştır (Pinar v.d., 2015a; Michaelsen v.d., 2010; Jurado v.d., 2010). Pinar ve Perini'ye göre Kültür temelli teknikler ve kültür bağımsız DGGE-16S rDNA Klon kütüphanesi analizleri, yazma eserlerdeki tüm mikrobiyal toplulukların çeşitliliğini ve yoğunluğunu tanımlamak için yetersiz kalmıştır (Pinar v.d., 2020a; Perini v.d., 2020). Son yıllarda Yeni Nesil Dizileme (YND) teknolojilerinin gelişmesiyle birlikte kültür bağımsız yaklaşımlar bu platformlar üzerinden gerçekleştirilmiştir. Yeni moleküler mikrobiyolojik metod olarak DNA'nın direk olarak örnekten ekstrakte edilmesi ve YND teknolojisiyle kısa okumalar yapılmasına dayalı metagenomik analizler, mikrobiyal topluluk filogeni ve çeşitliliği çalışmalarında kullanılmaktadır. Metagenomik analizlerin yazma eserlerde kullanılmasıyla daha önce yazma eserler üzerinde tanımlanmamış 58 bakteri ve 40 fungi cinsi daha tanımlanmıştır (Krakova v.d., 2017; Raeisnia v.d., 2022; Pinar v.d., 2020b). Pinzari, bakteri ve fungi cinslerinin daha önce tespit edilememelerinin nedenini bu türlerin laboratuvar ortamında kültüre alınamayan türler olabileceği şeklinde açıklamıştır (Pinzari ve Gutarowska., 2021).

Tablo 2.1 Yazma ve matbu eserlerde 2010-2024 yılları arasında yapılmış çalışmalarda kültür temelli yöntemlerle izole edilen ve tanımlanan bakteri cinsve türleri

Materyal	Bakteri Cins/Tür	Kaynak
Kağıt	Bacillus sp. Pseudomonas stutzeri, Microbacterium sp., Lysobacter dokdonensis, Curtobacterium sp., Brevibacterium ptyocampae Massilia timonae	
Parşömen	Sporosarcina globispora, Virgibacillus sp., Corynebacterium tuscaniense, Brevundimonas sp., Micromonospora sp., Pseudomonas plecoglossicida, Bacillus galactosidilyticus, Rhodococcus fascians, Bacillus cereus, Staphylococcus pasteurii, Microbacterium paraoxydans, Pseudomonas oryzihabitans, Staphylococcus epidermidis	Krakova v.d., 2012
Kağıt	Staphylococcus, Massilia timonae, Brevundimonas vesicularis, Bacillus muralis, Bacillus sp., Spiroplasma sp.	Tarsitani v.d., 2014
Kağıt	Bacillus spp., B. flexus, B. simplex, M. luteus, Arthrobacter sp.	Carlo v.d., 2016
Parşömen	B. cereus, B. licheniformis, B. megaterium, B. pseudomycoideis, B. subtilis, Peainibacillus genus, Staphylococcus sp.	Lech v.d., 2016
Kağıt	Bacillus atrophaeus, Bacillus cereus, Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis, Lysinibacillus fusiformis, Microbacterium aerolatum, Psychrobacillus psychrodurans, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus pasteurii, Staphylococcus saprophyticus, Staphylococcus succinus, Streptomyces ambofaciens	Gutarowska v.d., 2016
Kağıt	Paenibacillus provencensis, Kocuria sp., Staphylococcus hominis, Micrococcus luteus, Staphylococcus epidermidis, Micrococcus luteus, Bacillus foraminis, Micrococcus yunnanensis, Staphylococcus pasteurii, Staphylococcus sp.	Karakasidou v.d., 2018
Kağıt	Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Microbacterium aerolatum, Staphylococcus succinis, Psychrobacillus psychrodians, Lysinibacillus fusiformis	Krakova v.d., 2017
Kağıt	Lactobacillus casei, Staphylococcus aureus	Ayodae ve Amona, 2018
Kağıt	Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus atrophaeus, Sphingomonas paucimobilis, Serratia plymuthica, Acinetobacter haemolyticus,	Fouda v.d., 2023
Kağıt	Bacillus atrophaeus, Bacillus mojavenis, Corynebacterium sanguinis, Bacillus filamentosus, Bacillus velezensis, Streptomyces rochei, Bacillus humi, Bacillus niacini, Bacillus cheonanensis, Bacillus licheniformis, Bacillus idriensis	Raesnia v.d., 2022
Kağıt	Micrococcus sp., Gordonia sputis, Dictyostelium discoideum, Paracoccus sp. Bacillus cereus	Pavlovic v.d., 2023
Kağıt	Staphylococcus warneri, Cellulosimicrobium aquatile, Bacillus mobilis, Staphylococcus epidermidis, Bacillus zhangzhouensis, Paenibacillus polymyxa, Bacillus atrophaeus, Terribacillus goriensis, Bacillus paramycoideis, Pantoea eucrina, Acinetobacter junii, Bacillus halotolerans	Mohammadi v.d., 2023

Pinzari ve Gutarowska, yazma eserler üzerinden izole edilen mikrobiyal topluluğu ve gelişim koşullarını genel olarak iki kategoriye ayırmıştır (Pinzari ve Gutarowska, 2021). Gelişim gösteren bakteri ve fungus türlerinin çoğunluğu hızlı gelişen, değişen ortam şartlarına dirençli (olumsuz şartlarda spor oluşturan) türler olup, suyun ani varlığıyla materyal üzerinde güçlü enzimler salgılayarak tahribat meydana getirmektedir. İzole edilen *Stachybotrys*, *Chaetomium* ve *Epicoccum* cinsine ait türler yüksek su aktivitesine gereksinim duyan ve hızlıca gelişerek bozulmaya neden olan bu grup içerisinde yer almaktadır. İkinci kategoride, daha az sıklıkta ekstrem şartlarda gelişim gösteren (düşük su yoğunluğunda ya da yüksek ozmotik basınçta) ve yavaş büyüyen öncü türlerin varlığı gözlenmiştir. Genel olarak düşük su aktivitesinde yavaş gelişen türler; *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Chrysosporium*, *Penicillium* ve *Cladosporium* türleridir.



Şekil 2.2 Kağıt yüzeyinde farklı formlardaki mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar, kağıt üzerinde canlı ve aktif halde, canlı ve dormant, ölü, havadan bulaşmış sporlar şeklinde farklı durumlarda Şekil 2.1’de gösterildiği gibi bulunabilirler. Buna göre ölü, canlı ya da dormant haldeki tüm mikrobiyal topluluğu tanımlamak için farklı metodlar birlikte kullanılmalıdır (Pinzari ve Gutarowska, 2021).

Pinzari ve Gutarowska, yazma eserlerin bozulmasındaki mikrobiyal süreci 3 farklı mekanizma ile tanımlamıştır. Birinci mekanizmada ani su varlığında meydana gelen tahribatlarda görüldüğü gibi, tahribat güçlü enzimatik aktivitesi sonucu kısa bir sürede meydana gelmektedir. Tahribat meydana getiren mikroorganizmalar çevresel kontaminantlardır. İkincisinde tahribatlar özel şartların varlığına bağlı olarak gelişim gösteren/kolonileşen seçici türler ile meydana gelmektedir. Tuzun varlığına bağlı

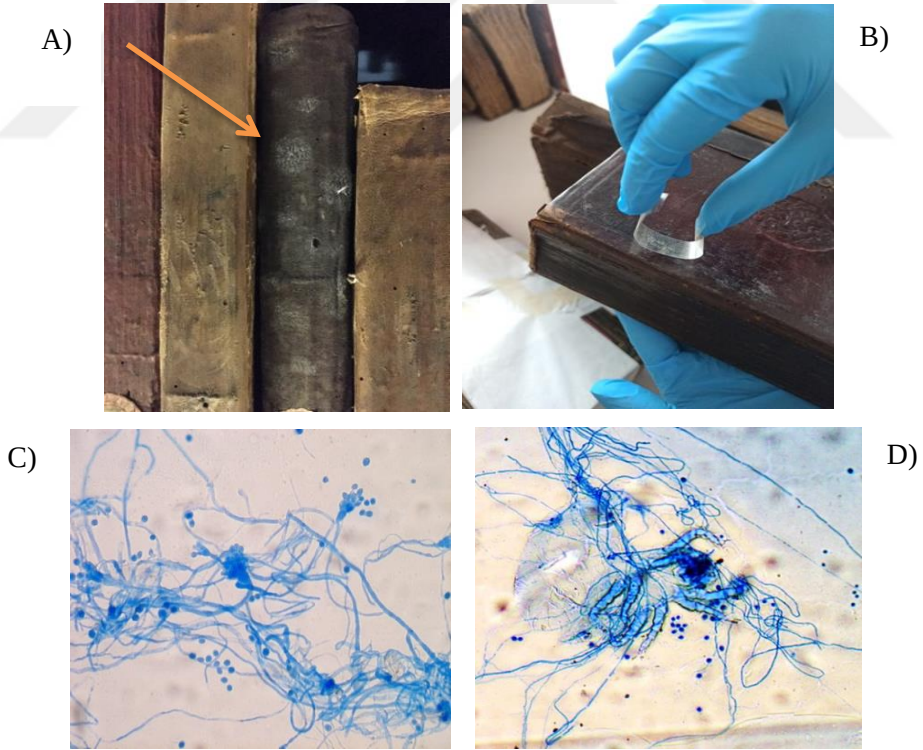
olarak extremofilik türlerin gelişim göstermesi gibi. Tanımlanan üçüncü mekanizmada tahribat mikrobiyal ardıllık ile gerçekleşmektedir. Farklı birçok tür birbirlerinin üretmiş olduğu metabolitler ya da enzimatik aktivite sonucu açığa çıkan ürünlerin üzerinden gelişme göstermektedir. Bu mekanizmaların ortaya çıkarılmasında sadece metabolik olarak aktif ve kültüre edilebilen mikroorganizmaların tanımlanması yeterli olmamaktadır. Bu nedenle yazma eser üzerindeki ölü ve kültür ortamında gelişmeyen tüm mikrobiyal topluluğun tanımlanması önem kazanmıştır.

Tanımlamaların yapılmasıyla mikroorganizmaların yazma eserlere farklı kaynaklardan bulaşmış olduğu anlaşılmıştır. Literatürde tanımlanan baskın bakteri cinsleri çoğunlukla hava yayılımı, insan teması ve böcek ve akarlar gibi vektörlerle ilişkilendirilmiştir. Krakova v.d. kütüphane materyallerinden izole edilen ve tanımlanan mikrobiyal toplulukların, bozulmaların kütüphanelerin ortam şartları ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir (Krakova v.d., 2017). Kütüphane havasındaki mikrobiyal yük, havalandırma sistemleri, tozun birikmesi ve sıcaklık-bağıl nem gibi iklimik faktörler ortam şartlarını belirlemektedir. Kontaminasyon çoğunlukla çoğunlukla nemli ve akan duvarlara, küflenmiş yiyeceklerin varlığına ve düşük havalandırma sistemine bağlı olarak hava kaynaklı kontaminasyon şeklinde gerçekleşmektedir (Wang v.d., 2016; Liu v.d., 2018). Bakteri ve Mantar sporları hava akımları ve toz ile kolaylıkla taşınmakta ve kitaplar üzerine çökmektedir. Tarihi yazma eserler de kütüphane materyalleri olarak değerlendirilmektedir.

Kağıtta en sık izole edilen ve tanımlanan bakteri toplulukları arasında Bacillus türleri yer almaktadır ve kağıdın degradasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Fakat tozla birlikte kağıdın yüzeyinde bulunduğu ve kağıdın degradasyonunda etkili türlerden olmadığı da bildirilmiştir (Jacob v.d., 2015).

Mikrobiyal bulaşmanın diğer bir kaynağı da insan teması olduğu tespit edilmiştir. Staphylococcus ve Streptococcus türleri insan deri mikrobiyomunda bulunmaktadır ve yazma eserlerden birçok türü izole edilmiştir. Bu türlerin eserlere direk temas ile bulaşmış olduğu düşünülmektedir.

Bazı böcekler ve akarlar mikroorganizmaları ve sporlarını taşıyarak onların yayılmasında büyük rol oynarlar. Pavlovic v.d., çalışmalarında tanımladıkları bakteriyal toplulukların, müze ve kütüphanelerde zararlı böcekler arasında yer alan bazı Lepidoptera ve Coleopteraların (Querner, 2015) mikrobiyomu ile benzerlik gösterdiğini belirtmiştir (Pavlovic v.d., 2023). Çalışmada tanımlanan Staphylococcus, Bacillus, Micrococcus ve Pseudomonas cinsi üyeleri sıklıkla bu böcek takımlarından izole edilmiştir. Gümüşçün (Lepismatidae ailesi), kitap biti (Liposcelididae ailesi) ve akarlar (Pyroglyphidae ailesi) materyallerin üzerindeki küf mantarları ile ilişkilendirilmiştir (Green ve Farman, 2015). Şekil 2.2.'de görülen kitap üzerinde beyaz renkli küf mantarı kolonilerinden bant tekniği ile alınmış örneklerin mikroskop incelemesinde, Eurotium sp. ve akarlar görüntülenmiştir (Yayınlanmamış veri). Eurotium sp. sporlarının havadaki yayılım potansiyelinin düşük olduğu düşünülmüş, bu nedenle Eurotium küf mantarı türlerinin yayılımı ve gelişimi toz ve akarlarla ilişkilendirilmiştir (Samson ve Lustgraaf, 1978).



Şekil 2.3 A) Sırt kısmında beyaz renkli küf gelişmiş bir yazma eser. B) Yazma eser üzerinden bantla örnek alınması C) Mikroskop altında Eurotium sp. X50 görüntüsü D) Küflerden alınan örneklerde x50 büyüklükte mikroskop altında görülen akar.

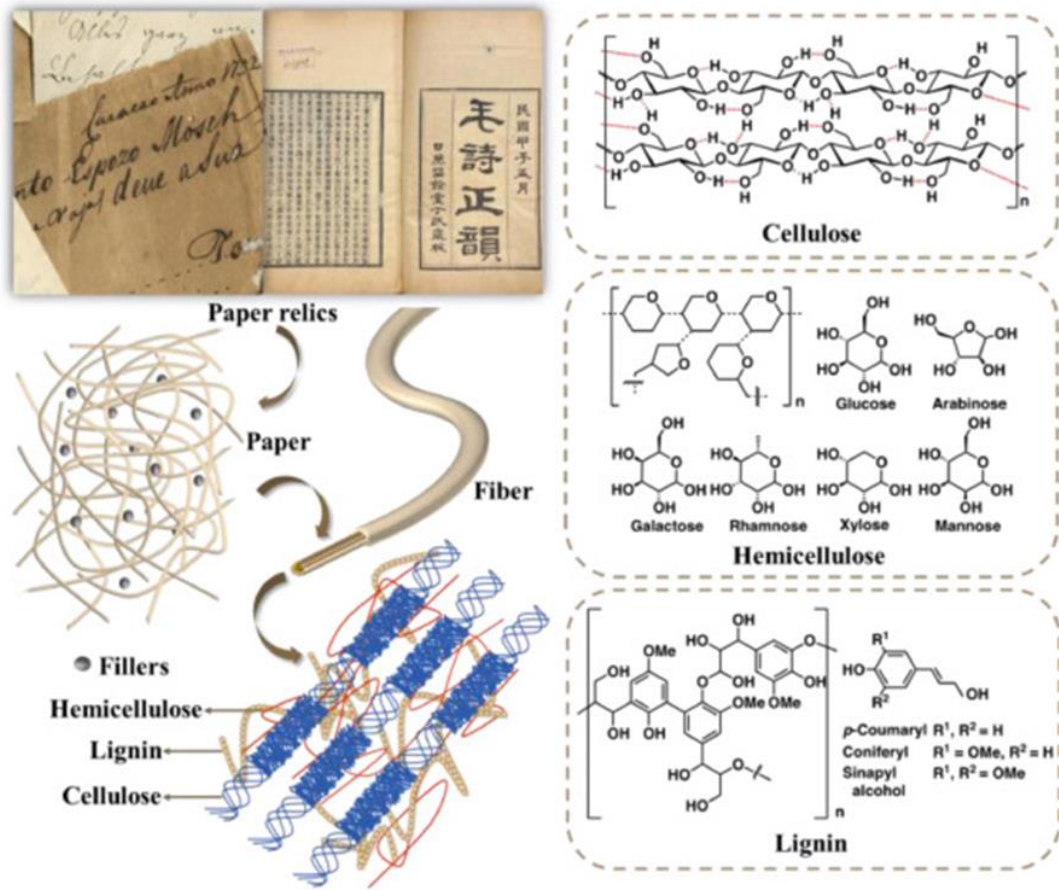
Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, tanımlamaların yapılmasıyla mikrobiyal flora ortaya çıkarılmış fakat tanımlanan bakteriyal toplulukların tarihi kitaplar üzerindeki potansiyel biyobozucu gücü ve materyalle etkileşimleri hakkında bilgi eksik kalmıştır.

Yazma eserlerin iki temel unsuru olan metin kısmındaki kağıt ve cilt kapaklarındaki deri, içeriklerindeki organik ve inorganik materyallerin varlığı ile bakteriler ve küf mantarları için gelişim ortamı olmuş ve mikrobiyal gelişim süreci içerisinde büyük tahribatlara uğramıştır.

2.1 Kağıt:

Kağıt 1. yüzyılda Çin’de bulunmuş, 8. yüzyıldan sonra İslam coğrafyasında ve 12. yüzyıldan sonra da Avrupa’da üretilerek en çok kullanılan yazım materyali haline gelmiştir (Hubbe ve Bowden, 2009). Kağıt temelde selülozdan ve yapımında kullanılan farklı malzemelere göre de lignin, hemiselüloz, pektin, tanen, protein ve mineral içeriklerinden oluşmaktadır. Kağıdın yapım aşamasında gözeneklerin doldurulması için hamuruna kireç ve kil eklenmiş, mürekkebin dağılmasını önlemek ve yazımı kolaylaştırmak için yüzeyi nişasta, jelatin, sentetik polimer ve yumurta akı gibi maddelerle muamele edilmiştir (Capitelli ve Sorlini, 2010). Bu maddelerin varlığı kağıdın yapım tarihine, tekniğine ve coğrafyasına göre değişim göstermektedir. Kağıdın mikrobiyal bozunmasının kağıdın özelliklerindeki farklı faktörlere bağlı olduğu gösterilmiştir. Selülozun depolimerizasyon derecesi, selülozun kristalin ve amorf bölgeleri arasındaki oran, yapımında kullanılan limyasal ya da mekanik hamurun varlığı (örn. odun hamurunda bulunan lignin), kağıdın hamurunda ve yüzeyinde bulunan nişasta, jelatin, kazein, reçine gibi hayvansal ya da bitkisel kökenli maddeler, üretiminde kullanılan kaolin, kalsiyum karbonat gibi dolgu maddeleri ve olası diğer yüzey uygulamaları kağıdın biyobozunurluğunu arttırmakta ya da azaltmaktadır (Florian, 2002; Pinzari v.d., 2021). Kağıdın farklı mikroorganizmalara karşı hassasiyetinde; kağıdın fiziksel-kimyasal özelliklerinin dışında mikroorganizmaların gelişmesi için gerekli ışık, bağıl nem ve sıcaklık gibi çevresel faktörlerin birbiriyle ve kağıtla etkileşimi de etkili olmuştur. Mikroorganizmalar metabolik aktiviteleri için suya ihtiyaç duyarlar. Su aktivitesi, bir materyalin içeriğindeki suyun buhar basıncının, aynı sıcaklıkta saf suyun buhar basıncına oranı olarak tanımlanmaktadır (Allen, 2018). Su aktivesi değeri materyalde bulunan ve diğer

organizma ya da materyallerle reaksiyona girebilen “serbest su” miktarını belirlemektedir. Su aktivitesi değeri 0,60 mikrobiyal gelişme için alt limit olarak değerlendirilmektedir. 0,55 ‘in altında tüm metabolik aktivitenin durduğu ve DNA’nın denatüre olduğu belirtilmiştir (Szczepanowska, 2023). Tüm mikroorganizmaların aktivitelerinin inhibe edildiği belirli su aktivitesi değerleri vardır. Bunlar, çoğu bakteri için <0,9, çoğu maya için <0,8, çoğu küf mantarı için <0,7 olduğu belirtilmiştir. Kağıt higroskopik bir materyaldir. Normalde düşük su aktivitesine sahip olan kağıdın gözenekli hidrofilik yapısı bağıl nemin yüksek olduğu ortamlarda su ve oksijeni tutması nedeniyle kağıdı bakteriler için gelişim ortamı haline getirir. Kağıdın higroskopik ve gözenekli yapısı kağıdın bioreseptörlüğünü etkilemekte ve nemli ortamlar hızlı bir şekilde kağıdın mikrobiyal tahribatlarını hızlandırmaktadır.

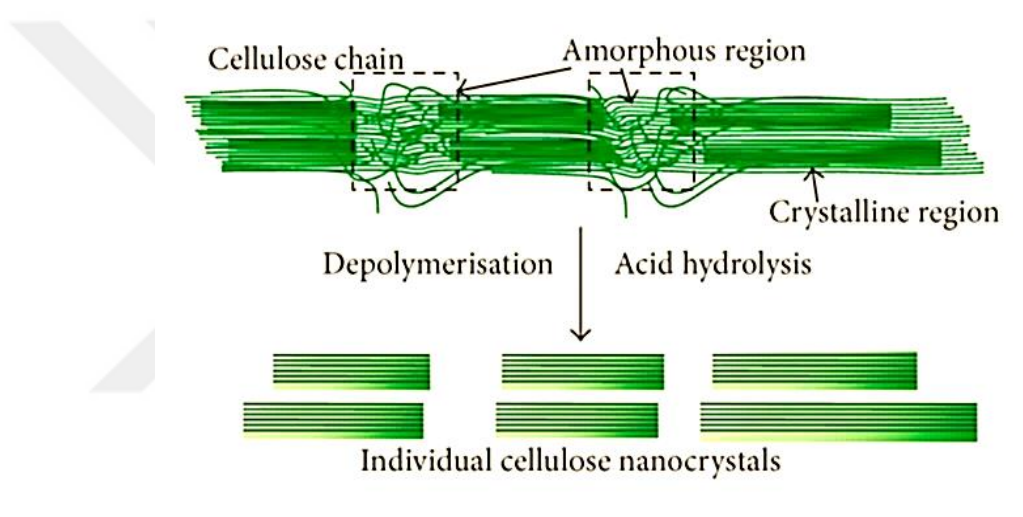


Şekil 2.4 Kağıdın çok katmanlı yapısı ve kimyasal bileşimi (Zhang v.d., 2023).

Kağıdın temel bileşeni olan selülozun yapısı ve mikrobiyal bozunması;

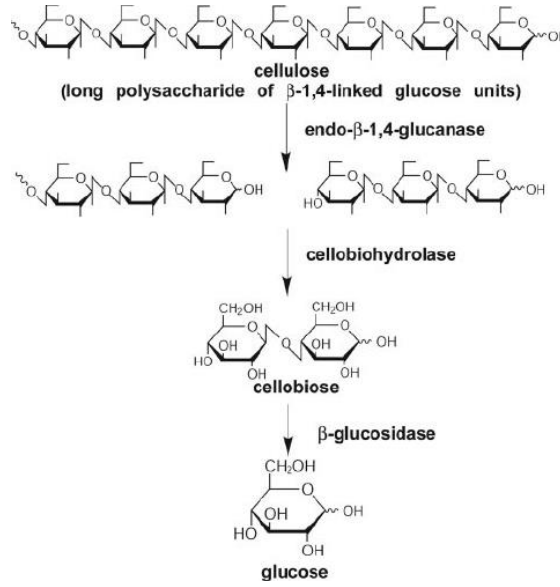
Bitkilerde hücre duvarının önemli bir bileşimi olan selüloz, binlerce D-glukoz

ünitelerinin $\beta(1-4)$ glikozidik bağlarıyla bağlandığı lineer bir polisakkarittir. Polimer zincirler birbirlerine hidrojen bağlarıyla paralel şekilde bağlanarak lifleri oluşturmaktadır. Selüloz lifleri kristalin ve amorf bölgeler içermektedir. Kristalin bölge güçlü hidrojen bağları içermekte ve dirençli bir yapıyı oluşturmaktadır. Amorf bölgeler ise daha düzensiz yapıya sahiptir ve kolay parçalanmaktadır (Lee v.d., 2014). Şekil 2.5’de selülozun yapısı ve nanokristallere parçalanması gösterilmiştir. Paralel çizgiler kristalin bölgeleri, dalgalı çizgiler amorf bölgeleri göstermektedir (Lee v.d., 2014). Doğal selüloz daha az amorfik bölgeleri olan kristalin yapıdadır. Lignin bulunmayan selüloz daha fazla amorfik bölgeye sahiptir ve mikroorganizmalar tarafından bozulmalara karşı daha elverişlidir.



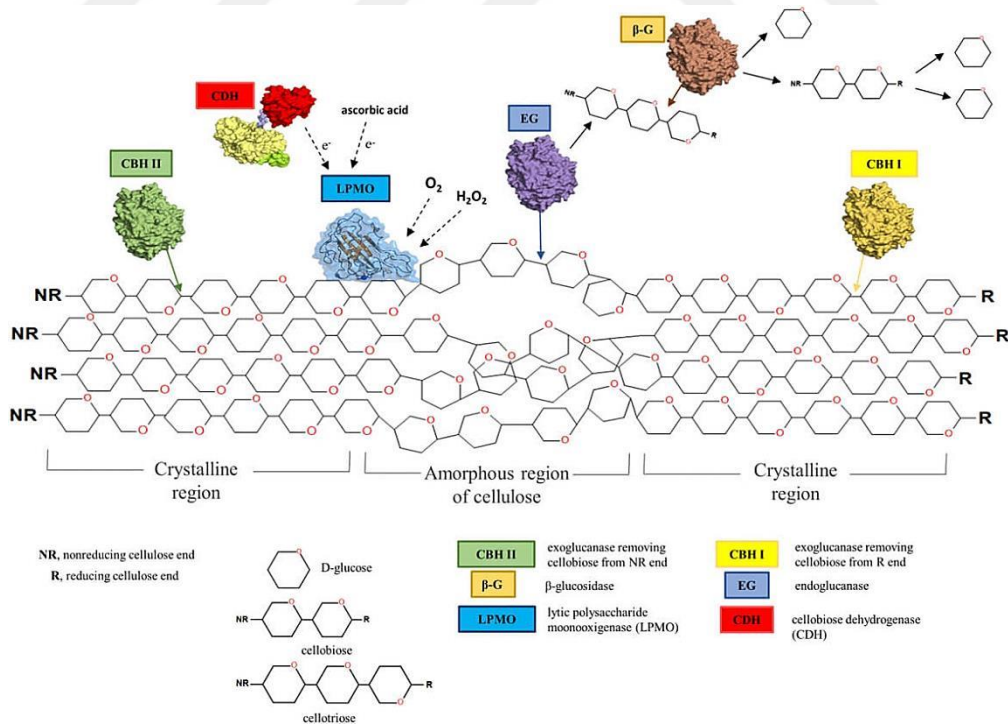
Şekil 2.5 Selüloz liflerindeki amorf ve kristal bölgeler.

Kağıdın bozunması temelde selülozun hidrolizi ile gerçekleşmektedir. Selülozun hidrolizinde rol oynayan selülazlar; sellobiohidrolaz içeren endo- β -1,4-glukanaz ve exo-1,4- β -glukanase ve β -glilozidazlardan oluşan bir grup enzimdir (Jayasekara ve Ratnayake 5). Endo 1,4- β - glukanaz selülozu parçalayarak rastgele serbest uçlar üretir. Exo-1,4- β -glukanaz linner zincirin azalmayan uçlarından sellobiyoz birimleri ve β -glukoz dimerleri ayırır ve β -glilozidaz glukozun oluşturmak için sellobiyozu hidrolize eder. Şekil 2.6 ve Şekil 2.7’de selülozun selülaz enzimleriyle glukozu parçalanması gösterilmiştir.



Şekil 2.6 Selüloz makromolekülünün sellülaz enzim gruplarıyla aşamalı olarak glukozaya parçalanması

Fungus, bakteriler ve actinomycetesler bu enzimleri salgılayan doğal mikroorganizmalardır. Çoğu bakteriyal selülotik enzimler *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Cellulomonas* ve *Clostridium* türlerinden sentezlenmektedir.



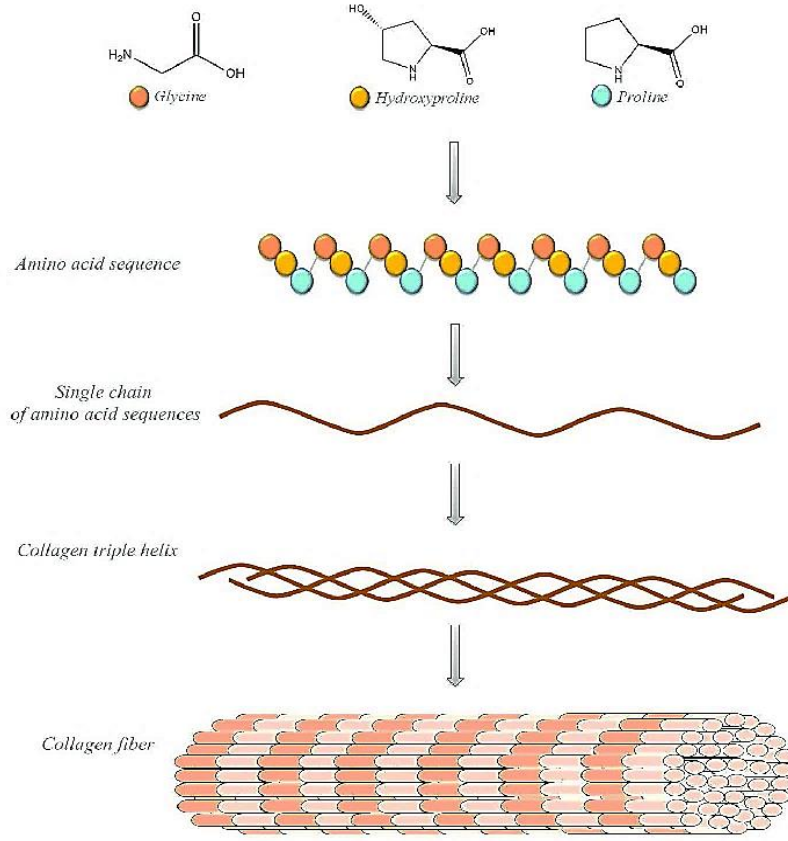
Şekil 2.7 Selülozların (endoglukonaz, Ekzoglukonaz ve β -glikozidaz) ve LPMO (AA9 ya da 10) enzimlerinin sinerjistik etkileşim yoluyla selülozun enzimatik degradasyonu

2.2.Cilt:

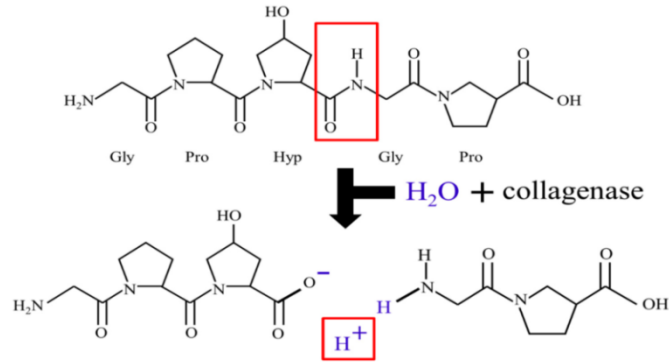
Hayvan derileri insanlar tarafından çok uzun yıllar farklı amaçlarla kullanılmıştır. Deri, yazma eserlerin cilt kapaklarında ve yazım materyali olarak parşömen şeklinde bulunmaktadır. Daha çok Avrupa’da yazım materyali olarak kullanılan parşömen derinin farklı işlemlerden geçirilmesiyle üretilmiştir. Yüksek pH derecesi nedeniyle deride bakterilerin gelişimi mantarlardan daha çok görülmektedir.

Derinin temel bileşeni kolajen hayvanlarda en sık bulunan proteindir. İçerdiği amino asit ve karbon saprofitik bakteriler için önemli bir gelişim kaynağıdır. Bakteriyal prolitik enzimlerin aktivitesi sonucu farklı hayvanlardan elde edilen yaş ham deri kolaylıkla bozulmaktadır. Bakteriyal gelişimi durdurmak ve bozulmayı önlemek amacıyla deriyi kurutma, tuzlama ve asitle temizleme işlemleri gerçekleştirilmektedir. Derinin özellikle parşömenin içeriğindeki protein yapıya rağmen higroskopik materyal olması nedeniyle içeriğinde mikroorganizmaların gelişmesi için gerekli olan su miktarı düşüktür. Derideki degradasyon süreci, çevresel bağıl nemin %65 ve materyalin su içeriğinin %15’in üzerinde olduğu zaman gerçekleşmektedir (Florian, 2007). Yapılan çalışmalara göre parşömenlerin bozulmalarında bakteriyal grup olarak Actinomyces bozulmalarda etkilidir. Actinomyces kolajenaz da dahil birçok enzim üretebildiği bilinmektedir (Blyskal v.d., 2017).

Derinin yapısındaki lifler ve lif demetleri kolajen proteinleri tarafından oluşmaktadır. Üçlü-heliks yapıya sahip kolajen proteininde dallanmamış makromoleküler zincirlerin her birinde 1000 den fazla amino asit bulunmaktadır. Şekil 2.8’de kolajenin yapısında bulunan 3 farklı amino asit ve amino asit bileşimi görülmektedir. Deri, bazı bakteriler tarafından salınan kolajenaz gibi özel proteinazlarla parçalanabilir. Bakteriyal kolajenazlar kolajeni birçok bölgeden kırarak peptidlerine ayırmaktadır (Hoppe v.d., 2021). Şekil 2.9’da kolajenin kolajenazın peptidlere parçalanması gösterilmiştir. Parşömenin degradasyonu da amino asit zincirlerinin oksidatif kimyasal reaksiyonu ve peptidlerin hidrolitik kırılmasını içeren kimyasal süreçlerle gerçekleşmektedir (Florian, 2007).



Şekil 2.8 Kolajenin yapısı ve yapısında bulunan 3 farklı amino asit



Şekil 2.9 Kolajenin kolejanaz enzimiyle peptidlere ayrılması

Tabaklama materyalleri; yağ ve aldehyitler, mineraller, bitkisel tabaklama şeklindedir. Tabaklanmış deriler bakteriyel bozulmalara karşı dirençli oldukları halde küflenmeye karşı daha hassastırlar. Yapılan çalışmalarda tabaklamada kullanılan bitkisel ekstraktlar, krom tabaklama materyallerinden daha fazla fungal bozulmalara neden olmaktadır. Bitkisel tabaklamada hidrolizlenebilir tanen kullanılan deriler,

yoğunlaştırılmış tanen kullanılan derilere göre fungal bozulmalara daha açıktır. Ayrıca yüksek yağ oranı bulunan derilerde düşük yağ oranı bulunan derilere göre daha fazla fungal bozulma görülmektedir.

2.3 Yazma Eserlerdeki mikrobiyal topluluğunun tanımlanmasında Yeni Nesil Dizileme teknolojisi

YND Teknolojileri, DNA'nın uygun maliyetli ve yüksek verimlilikle dizilenmesini mümkün kılmıştır. YND'nin antik DNA ve tarihi materyallerle kullanılmasıyla birlikte parşömen ve kağıt esaslı yazma eserler üzerindeki mikrobiyal toplulukların tanımlanmasına yönelik Moleküler Biyolojik Tekniklerine dayalı çalışmalar artmıştır. Son yapılan çalışmalarda YND teknikleri ile yüzyıllar boyunca eserler üzerinde gelişmiş canlı ve ölü mikroorganizmalar filogenetik sınıflandırma ile tespit edilebilmiştir. Tablo 2.5'de yazma eserlerde YND kullanılarak yapılmış çalışmalar ve kullanılan YND platformları verilmiştir.

Tüm genomun dizilenmesiyle (WGS) gerçekleştirilen Shot-gun metagenomiks ve hedef ampikon dizileme analizleri farklı çalışmalarda kullanılmıştır. Hedef ampikon dizilemede sadece spesifik marker genler YND ile dizilenmiş ve veritabanlarındaki referanslar ile karşılaştırılmıştır. Bakterilerin taksonomik sınıflandırılmasında yüksek oranda korunmuş olan 16S rRNA gen dizisi, mantarların taksonomik sınıflandırılmasında internal transcribed spacer (ITS) 1 ve 2. bölgeleri, 18S rRNA ve 28S rRNA gen dizileri kullanılmıştır. WGS ile örneklerden izole edilen tüm DNA kütüphanesinin dizilenmesi gerçekleştirilmiştir. Böylece WGS ile taksonomik sınıflandırmanın yanında bakteri ve mantarlar tür bazında tanımlanabilmektedir. Illumina ve Pyrosequencing gibi İkinci Nesil Dizileme ile yapılan çalışmalar dışında Üçüncü Nesil Dizileme olarak görülen Oxford Nanopore Teknolojisiyle geliştirilen MinION platformuyla da tanımlama çalışmaları yapılmıştır. Pinar'a göre tarihi kitaplardan elde edilen örneklerde DNA izolasyonunun konsantrasyonunun düşük olması nedeniyle Üçüncü Nesil Dizileme Platformları bu tarz çalışmalarda daha etkili olmuştur.

Kağıtta meydana gelen ve “foxing” olarak adlandırılan ve bir tür mikrobiyal bozulma olduğu düşünülen kahverengi lekelerden ekstrakte edilen DNA üzerinden yapılan metagenomik analizlerde baskın bakteri ve mantar türleri tanımlanmıştır. Çalışmada baskın türler bakterilerde *Ralstonia* sp. ve *Gluconobacter* sp., mantarlarda *Phoma* sp. ve *Cladonia* sp. olarak tespit edilmiştir (Szulc v.d., 2018). Mikroorganizmaların foxing lekelerinin oluşumunda direk etkili olmadığının belirtildiği çalışmada, Szulc v.d. foxing lekelerinin oluşumunda mikroorganizmaların bozucu aktivitesinin, leke üretiminin ve kağıtta selülozun oksidasyonuna bağlı olarak gerçekleşen kimyasal değişimlerin birleşiminin etkili olduğu hipotezini kurmuştur.

Leonardo da Vinci’ye ait çizimler üzerindeki mikrobiyal topluluklar Üçüncü Nesil Dizileme teknikleri ile MiniON platformunda tanımlanmıştır (Pinar v.d. 2020b). Tüm Genom Dizileme ile elde edilen mikrobiyom çeşitliliğinin, çizimlerin tarihi biyo-arşivini oluşturduğunu ve çizimlere spesifik olduğu bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre bakteriler mantarlara göre daha sık görülmüştür. Tanımlanan bakterilerin insan mikrobiyomunun bir parçası olması çizimlerin özellikle restorasyon esnasında yoğun bir şekilde ele alınmış olduğunu göstermektedir. Buna ek olarak da tanımlanan diğer bakteri türlerinin böceklerden ve böcek atıklarından bulaşmış olabileceği düşünülmüştür. Çizimlerde tespit edilen mikrobiyal çeşitliliğin farklı olması farklı müzelerde oldukları için coğrafi farklılıktan etkilendiği vurgulanmıştır.

Tablo 2.2 Yazma eserlerde Metagenomik ve YND analizleriyle yapılan çalışmalar

Örneğin kaynağı	Hedeflenen gen dizisi bölgesi	NGS Platformu	Kaynak
Kağıt parçası	Bakteriyal 16S rRNA V3-V4 bölgesi Fungal ITS1 bölgesi	Illumina platform Illumina MiSeq	Szulc v.d., 2018
Kağıt Parçası	Bakteriyal 16S rRNA Fungal 28S rRNA	Illumina platform Illumina MiSeq	Krakova v.d., 2017
Kağıt Parçası + Swab	Bakteriyal 16S rRNA Fungal ITS bölgesi	Illumina platform Illumina MiSeq	Raesnia v.d., 2022
Kağıt yüzeyinden Swab ile örnekleme	Bakteriyal 6S rDNA Fungal ITS rDNA	Illumina platform Illumina MiSeq	Zhou v.d., 2024
Kağıt yüzeyinden steril nitoselüloz membran ile örnekleme	Bakteriyal 16S rRNA Fungal 28S rRNA	Nanopore Üçüncü nesil dizileme platformu MiniON	Pavlovic v.d., 2023
Parşömen parçası + Parşömen yüzeyinin silinmesiyle elde edilen bilgi parçaları	Tüm genom Dizilenmesi (WGS) Shot-gun Kütüphanesi	Illumina Platform Illumina HiSeq 2500	Pinar v.d., 2020a
Kağıt yüzeyinde mikro aspirasyon yöntemiyle toplanan toz partikülleri ve mikrobiyal hücreler	Tüm Genom Dizilenmesi (WGS)	Nanopore Üçüncü nesil dizileme platformu MiniON	Pinar v.d., 2020b
Parşömen parçası	16S rRNA geni	Pyrosequencing Platform 454-pyrosequencing	Migliore v.d., 2017
Parşömen parçası	16S rRNA geni V4 bölgesi	Illumina platform Illumina MiSeq	Migliore v.d., 2019
Parşömen yüzeyinin silinmesiyle elde edilen bilgi parçaları	Tüm Genom dizileme (WGS) Shot-gun metagenomik	Illumina platform Illumina Nextseq	Cappa v.d., 2022
Parşömen yüzeyinin silinmesiyle elde edilen bilgi parçaları	Tüm Genom Dizileme	Illumina platform Illumina MiSeq	Teasdale v.d., 2017

Hayvan derisinden üretilmiş bir materyal olan parşömen uzun yıllar yazım malzemesi olarak kullanılmıştır. Parşömende de kağıtdaki gibi mikrobiyal bozulmalar meydana gelmiştir. Parşömenlerde sık görülen üst katmanın ayrılmasına ve yazılı metnin kaybına neden olan pembe renkli lekelerde YND teknolojileri kullanılarak yapılan çalışmada biyobozucu ajanlar tanımlanmıştır. Migliore v.d. tarafından tanımlanan

mikroorganizmalar ile mikrobiyal ardılık modeli ve tahribat mekanizması ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır (Migliore v.d., 2019) Çalışmada; parşömenin yapım aşamasında derinin tuzlanmasıyla birlikte gelişen halofilik ve halotolerant mikroorganizmaların yüzyıllar öncesinden ilk kolonileştiriciler olduğu belirtilmiş, ikincil kolonileştiricilerin birincil kolonileştiricilerin ortama saldıkları metabolit ve parçalanmış hücresel bileşenler üzerinden gelişen bakteriler olduğu gösterilmiştir. Daha çok çevresel kontaminant Actinobacteria türlerinin tanımlandığı ikincil kolonileştirici bakterilerin tahribatsız alanlardan da izole edilmesi parşömenin bozulmasında tuzlanma aşamasında bulaşan bakterilerin öncülük ettiğini düşündürmüştür. Deriyi çürümekten korumak için yapılan tuzlama işlemi deriye bakteri bulaşmasına neden olmuş ve zaman içerisinde deride diğer mikroorganizmaların gelişmesine de imkan sağlamıştır. Bu çalışma parşömen üzerindeki tahribatları mikrobiyal ardılık modeliyle tanımlaması nedeniyle önem kazanmıştır (Migliore v.d. 2017). Tüm Genom Dizileme analizleriyle yapılan çalışmada kiliselerde okutulan bir yazma eserde insan derisinde ve burun içinde bulunan bakteri türleri tespit edilmiştir. Eserde en sık görülen bakteri türleri, insanda akneye neden olan *Propionibacterium* türleri ve Staph enfeksiyonuna neden olan *Staphylococcus* türleri olarak tanımlanmıştır. Eserin kiliselerde farklı insanlar tarafından sık sık ele alınmış, yüze sürülmüş ve öpülmüş olmasından dolayı bu türlerin baskın olduğu bildirilmiştir (Teasdale v.d. 2017).

Krakov v.d., mikrobiyal çeşitlilik analizlerinde kültür bağımsız Illumina Miseq kullanılmasının klasik kültüre dayalı metodların kullanılmasına göre daha yüksek biyoçeşitliliğin saptanmasında etkili olduğunu göstermiştir (Krakov v.d., 2017). Kültür bağımsız YND çalışmalarında besiyeri ortamında gelişme göstermeyen bakteri ve fungus familya ve cins düzeyinde tanımlanmıştır. İki tarihi parşömende Illumina Hiseq dizileme platformu kullanılarak Shot-gun metagenomik analizler yapılmıştır. Parşömendeki tahribata neden olan halofilik ve halotolerant mikroorganizmaların DNA dizileri tespit edilmiştir. Tanımlanan *Nocardiopsis*, *Gracilibacillus* ve *Saccharopolyspora* türlerinin ve *Aspergillaceae* familyası üyelerinin parşömenin biyobozulmasına neden olabilecek enzimatik kapasiteye sahip olduğu belirtilmiştir. Metagenomik analizlerde nükleik asit dizilemesi sonucu ilk defa bir yazma eserde bir virüse ait baz dizisi tespit edilmiştir (Pinar v.d, 2020a). Dizilerin çoğunluğu dsDNA *Propionibacterium* phage-P101A virüsü ile ilişkilendirilmiştir. Üç tarihi parşömen

üzerinde mikrobiyal kontminasyonun tanımlanmasına yönelik yapılan farklı bir çalışmada, tahribatsız alandan ve farklı derecelerdeki tahribatlı alanlardan alınan örneklerde biyolojik bozulmanın hangi aşamalarla meydana gelebileceğine dair mikrobiyal ardılık modeli kurulmuştur (Migliore v.d., 2019). RAMAN ve metagenomik analizlerin gerçekleştirildiği disiplinler arası çalışmada; YND Illumina platform ile *Halobacterium salinarum* DNA dizisi tanımlanmıştır. Buna göre, parşömenin yapım aşamasında derinin tuzlanmasıyla birlikte gelişen halofilik ve halotolerant mikroorganizmaların yüzyıllar öncesinden ilk kolonileştiriciler olduğu ve ikincil kolonileştiricilerin, birincil kolonileştiricilerin ortama saldıkları metabolit ve parçalanmış hücresel bileşenler üzerinden gelişen bakteriler olduklarını göstermiştir.

Kültür temelli teknikler eserlerden izole edilen mikroorganizmaların fizyolojik ve biyokimyasal potansiyellerinin anlaşılabilmesi için kültür bağımsız tekniklerle birlikte sıklıkla kullanılmıştır (Tarsitani v.d., 2014; Krakova v.d., 2017).

Bu çalışmalarla canlı ve cansız tüm mikrobiyal topluluğun tanımlanması ile mikrobiyal ardılığın kurulması ve tahribatın kaynağının bilinmesi açısından metagenomik analizler önem kazanmıştır. Taksonomik tanımlama ile biyokimyasal süreçler hakkında bilgi edinilmese de potansiyel mikrobiyal bozucuların metabolik işlevselliğine yönelik (hangi mikroorganizma gruplarının bozulmalardaki etkisi) veri sağlamaktadır. Tablo 2.3’de İkinci ve Üçüncü Nesil Dizileme Platformlarıyla tanımlanan bakteri cinsleri tablo halinde verilmiştir.

Tablo 2.3 Yazma ve Nadir Matbu Eserlerde Metagenomik analizlerle en sık tanımlanan bakteri cinsleri. 1-10 arası yapılan çalışmalar.

Bakteri Cinsi	Kağıt	Parşömen	Referans
Acidovorax	5		
Acinetobacter	2,5,7	3,4,6	
Actinomyces		4	
Aerococcus		1	
Aeromonas		3	
Agrobacterium	8		
Aliivibro		3,4	
Alkalimonas	2		
Alkandiges	2		
Allomonas		3	
Alcanivorax	7		
Amycolotopsis	2		
Anabaena	7		1-Cappa v.d.,
Anaerococcus	5		2-Krakova v.d.,
Aquabacterium	5		3- Migliore v.d.
Arthrobacter	8		4-Migliore v.d.
Aurantimonas	8		5- Pavlovic v.d.
Bacillus	2,5,7,8,9		6-Pinar v.d.
Brachybacterium	8	4	7-Pinar v.d.
Bradyrhizobium	5		8-Raesnia v.d.
Brevibacillus	9	4	9-Szulc v.d.
Brevibacterium	8	4,6	10- Zhou v.d.
Brevundimonas		6	
Buchnera	7		
Burkholderia	7,9		
Carnobacterium	8		
Caulobacter	5,7		
Cellvibrio	8		
Cladonia	9		
Christensenellaceae	10		
Citricoccus	8		
Cornobacteriaceae		6	
Corynebacterium	2,5	3,6	
Cryobacterium	7		
Cupriavidus	7		
Cutibacterium	5,7		
Delftia	9		
Dermabacteraceae		6	
Dolosigranulum		1	
Escherichia/Shigella (E. Coli)	2,7,8	3	
Enhydrobacter		3,6	
Enterobacter	2,8	6	
Enterococcus	2	3	
Finegoldia	5	3	
Gemella		1,3,6	
Gluconabacter	5		
Gracibacillus		6	
Granulicatella		1	
Haererehalobacter	8		
Halobacillus		6	

Tablo 2.3 Yazma ve Nadir Matbu Eserlerde Metagenomik analizlerle en sık tanımlanan bakteri cinsleri. 1-10 arası yapılan çalışmalar.

Bakteri Cinsi	Kağıt	Parşömen	Referans
Halomonas		3,4	
Hyphomicrobium	5		
Intrasporangium	7		
Isosphaera	7		
Kocuria		1	
Lactobacillus		2,7,10	
Lactococcus	7		
Leuconostoc	7	6	
Lysinibacillus	9,10		
Massilia	2		
Marinomonas		3	
Megaspheara		6	
Methylovulum	7		
Methylobacterium	5,10	4	
Microbacterium	2	4	
Microbiospora	8		
Micrococcus		1,3	
Moraxella	5,7		
Mycobacterium	2,7		
Nocardia	7		
Nocardiopsis		6	
Neiseseria		6	
Oryzihumus	2		
Oscillatoria	7		
Paenibacillus		4	
Pandora		4	
Pannonibacter	7		
Pantoea	2	6	
Paracoccus	5,7,8		
Pedobacter		6	
Phoma	9		
Photobacterium		3	
Porphyromonas		6	
Prevotella		6	
Promicromonospora	5,8		
Propionibacterium		1,6	
Proteus	7		
Pseudomonas	5,7,8,9	3,4,6	
Pseudoalteromonas		3	
Psychrobacillus	5		
Psychrobacter	7		
Ralstonia	5,7,9		
Rheinheimera	8	3	
Rhizobium	5		
Rothia	5	1,6	
Rubrobacter	10		
Saccharomonospora		6	
Saccharomyces	9		
Saccharopolyspora	2	1,6	
Salinibacterium	8		
Salinicoccus		1	
Salmonella	7		
Sediminibacterium	5		

1-Cappa v.d.,
2-Krakova v.d.,
3- Migliore v.d.
4-Migliore v.d.
5- Pavlovic v.d.
6-Pinar v.d.
7-Pinar v.d.
8-Raesnia v.d.
9-Szule v.d.
10- Zhou v.d.

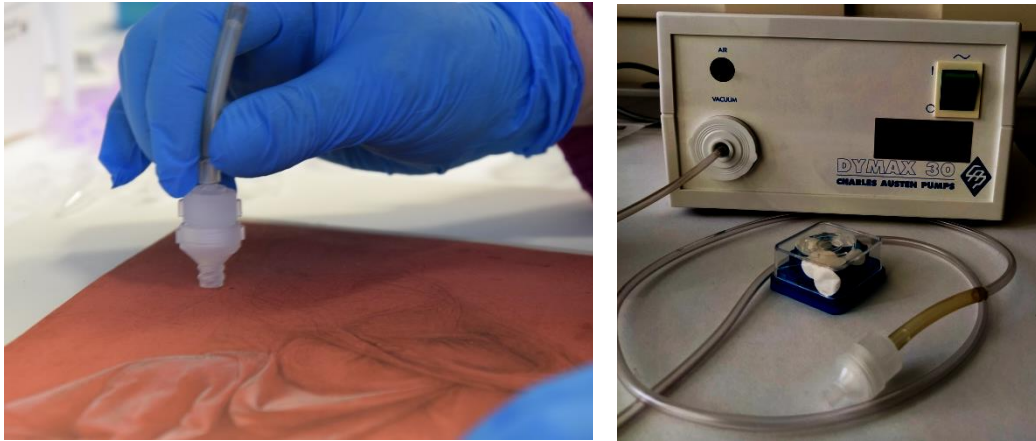
Bakteri Cinsi	Kağıt	Parşömen	
Shewanella		3,4	
Sphingobacterium		6	
Sphingomonas	5,8	4	
Sphingopyxis	7		
Staphylococcus	2,5,7,9,10,	1,3,4,6	
Stenotrophomonas	2,7	4	
Streptococcus	2,5,7,10,	1,3,4,6	
Streptomyces	2,7		
Thermonosporaceae		6	
Undibacterium	5		
Xenorhabdus	7		
Xanthomonas		4	
Vibrio		3,4	
Virgibacillus	8		
Yaniella		6	

1-Cappa v.d.,
2-Krakova v.d.,
3- Migliore v.d.
4-Migliore v.d.
5- Pavlovic v.d.
6-Pinar v.d.
7-Pinar v.d.
8-Raesnia v.d.
9-Szulc v.d.
10- Zhou v.d.

3. MİKROBİYAL KONTAMİNANTLARIN TANIMLANMASI

3.1. Örneklem (Sampling)

Yazma eserlerin bütünlüğünün bozulmaması için örnek alma işlemi tahribatsız ya da mikro tahribatlı olmalıdır. Bu nedenle daha çok steril swablar ve nitro selüloz membran kullanılmaktadır (Cappitelli v.d., 2010). Fakat örneklerde analizler için gerekli mikrobiyal yoğunluk azdır. Özellikle metagenomik analizlerde mikroorganizmalar kültüre alınmadığı için analiz için gerekli olan mikrobiyal DNA örneğin kendisinden izole edilmektedir. Yazma eserlerde bu örnek yoğunlukla tahribat nedeniyle kopmuş ve restorasyon ile yerine konulamayacak olan minik kağıt ya da deri parçalarıdır. Metagenomik analizler için kağıt parçasının alınmasının mümkün olmadığı durumlarda PVC silgilerin kullanıldığı yeni bir method geliştirilmiştir (Fiddymen v.d., 2019). Bu örnek alma metodunda parşömen sayfaların yüzeylerinin PVC silgilerle silinmesi sonucu oluşan silgi artıkları toplanarak DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Farklı bir çalışmada mikro-aspirasyon yöntemiyle kağıt yüzeyindeki toz ve mikrobiyal hücreler toplanarak, filtreler üzerinden DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir (Pinzari v.d., 2020b). Pinzari v.d.'nin çalışmalarında gerçekleştirdiği örneklemeye ait görseller Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1 Pinzari v.d.'nin çalışmasında metagenomik analizler için gerçekleştirdiği mikro aspirasyon örneklem yöntemi

3.2. Kùltür Temelli Teknikler

Kùltür temelli teknikler mikroorganizmaların tanımlanması için yapılan en eski yöntemlerdendir. Bakterilerin standart laboratuvar şartları altında ve seçili mediada gelişim göstermesine ve görünür koloniler oluşturmaya dayalı bir yöntemdir. Standart koşullar dışında özel besin, pH koşulları, inkübasyon sıcaklıkları ve oksijen seviyesine ihtiyaç duyan zor gelişen mikroorganizmalar için koşullar sağlanamadığında gelişim görülmemektedir. Bu nedenle çevrede var olan mikroorganizmaların sadece %1'i laboratuvar ortamında kùltüre alınabilmekte ve tanımlanabilmekte olduğu düşünölmektedir.

Mikrobiyolojik analizler sadece standart laboratuvar ortamında kùltüre alınabilen mikroorganizmalar ile çalışıldığı için mikrobiyal topluluğun çeşitliliğı hakkında kısıtlı bilgi sağlamaktadır. Ayrıca mikrobiyolojik yöntemler ve biyokimyasal testler ile tanımlamalar uzun sürmekte, iş gücü gerektirmekte ve çok sayıda sarf malzemesi kullanılmakta buna karşılık sınıflandırmanın bazı durumlarda geçerliliğı ve doğruluğı tartışılmaktadır (Güngör, 2015).

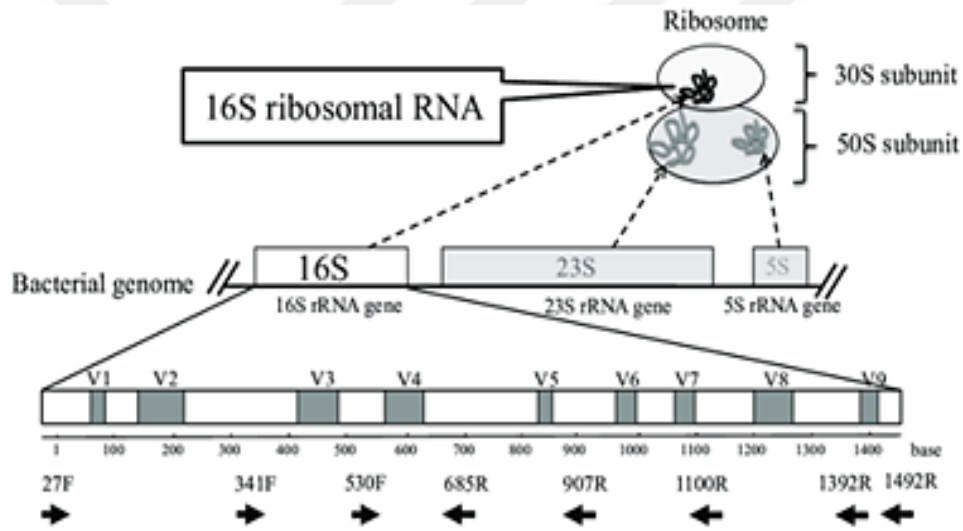
Mikroskobik ve makroskobik tanımlamaya dayalı geleneksel kùltür temelli yöntemlerde tanımlamalar biyokimyasal analizlerle de desteklenmektedir. Mikrobiyal toplulukların tanımlanmasında kùltürlerden izole edilen bakteriler üzerinden moleküler biyolojik teknikler ve GC-MS, LC-MS, MALDITOF-MS gibi spektroskopik yöntemlerle biyomarkerların analizine dayalı teknolojiler kullanılmaktadır.

3.3 16S rRNA Amplifikasyonu ve Sanger Dizileme

Mikroorganizmaların tanımlanmasında ribozomal RNA (rRNA) genlerinin (16S bakteriler için, mantarlar için 18S rRNA) amplifikasyonu ve dizilemesine dayalı moleküler analizler 1990'lı yıllardan itibaren kullanılmaktadır. “Birinci Nesil Dizileme” olarak bilinen Geleneksel Sanger Dizileme yöntemi PCR amplifikasyonu, ürün kalitatif tespiti ve jel elektroforezle ayırıştırma, ethanol çöktürmeyle amplikonların saflaştırılması, amplikon dizileme ve son olarak kapilari elektroforez şeklinde gerçekleştirilmektedir. Elde edilen diziler BLAST ile GenBank

veribankasında (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) çalışılan organizmanın referans genleriyle karşılaştırılarak benzerlik oranı en yüksek olan cins ya da tür seçilmektedir.

Bakteriyal taksonomik çeşitliliğin tanımlanmasında ve sınıflandırılmasında bakteriyal 16S rRNA geni sıklıkla kullanılmaktadır (Fukuda v.d, 2016). Tüm prokaryotlarda bulunan ribozomun 30S küçük alt biriminin bir parçası olan 16S rRNA geni yaklaşık olarak 1500 bp uzunluğundadır. Çoğu bakteri arasında hiper değişken ve yüksek oranda korunmuş bölgeler bulunmaktadır. Şekil 3.2’de gri (V1- V9) ve beyaz kutular korunmuş ve hiper değişken bölgeleri göstermektedir (Fukuda v.d., 2016).



Şekil 3.2 Ribozom kompleksi ve 16S rRNA geni şeması. Ok işaretleri ile E. Coli 16S rRNA gen dizisindeki üniversal primerler gösterilmiştir.

Değişken bölgelerde üniversal primerler oluşturulmuştur. Korunmuş bölgeler primer bağlanma bölgeleri olarak kullanılmaktadır.

3.4. Metagenomik Analizler

Mikroorganizmalar doğal ortamlarında fiziksel (biyofilm şeklinde) ve metabolik olarak birbiriyle bağlantılı kompleks topluluk halinde bulunabilirler. Mikrobiyal topluluktaki her bir üyenin tanımlanması kültür temelli tekniklerle mümkün olmamaktadır. Metagenomik, bir örnekteki kültüre edilebilen ya da edilemeyen tüm

mikrobiyal topluluğun direkt olarak doğal ortamında DNA analizleriyle tanımlanmasıdır. Metagenomik analizlerle mikrobiyal topluluktaki ölü ya da canlı tüm hücrelerdeki DNA için taksonomik veri elde edilebilmektedir. Metagenomik çalışmalar; DNA ekstraksiyonu, DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile amplifikasyonu, Metagenomik klon kütüphanesi oluşturulması, YND teknikleri ile amplikonların dizilenmesi ve biyoinformatik analizler ile gerçekleştirilmektedir.

Herhangi bir ekosistemdeki tüm mikrobiyal topluluğun etkili bir şekilde açığa çıkarılması için mikrobiyal DNA'nın etkili ve yeterli bir şekilde ekstraksiyonunun gerçekleştirilmesi önemlidir.

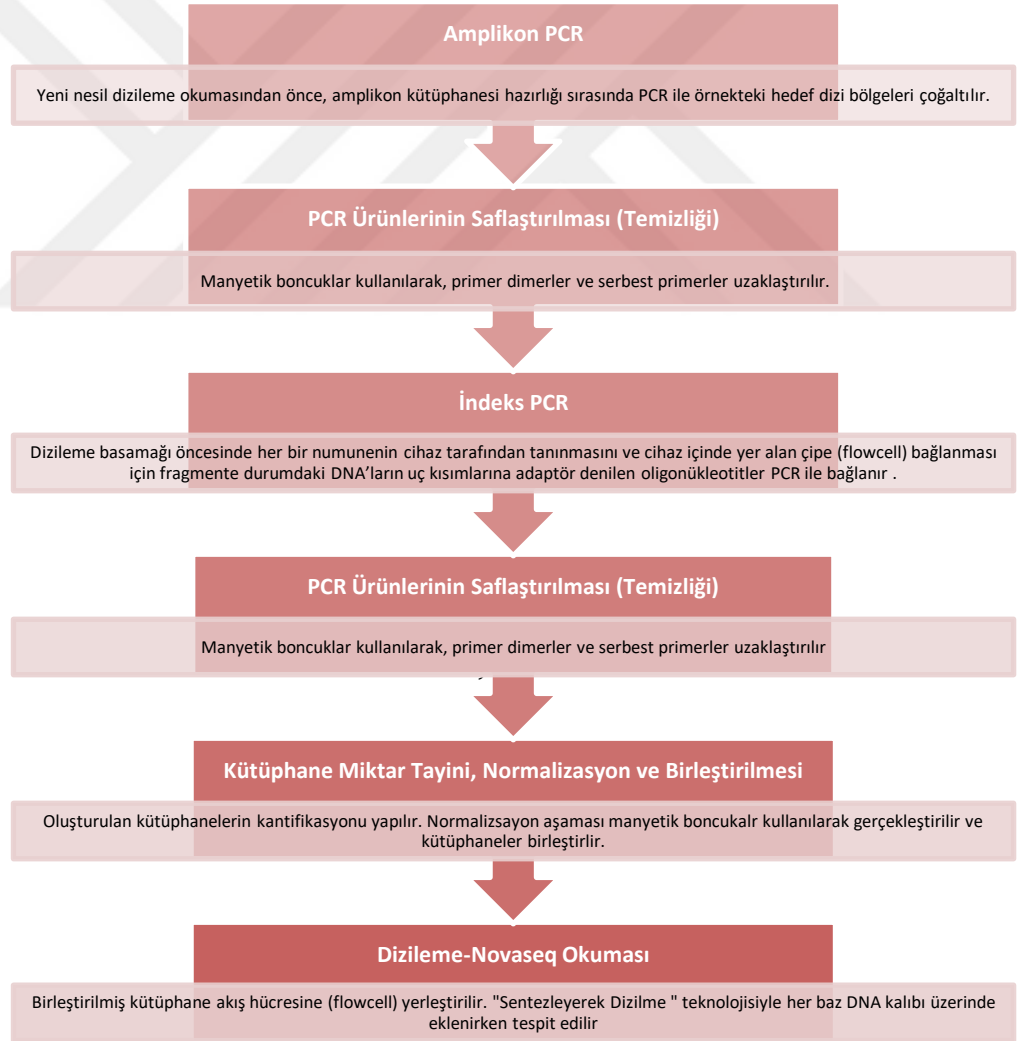
Metagenomik analizler, tüm genomun dizilenmesi ile Shot-gun metagenomik ve hedef-amplikon dizisinin dizilenmesi şeklinde gerçekleştirilir. Shot-gun metagenomikte tüm DNA küçük fragmanlara bölünür ve bağımsız olarak dizilir. DNA dizileri mikrobiyal olmayan genomlar da dahil birçok bölgeye atanır. Bazı diziler taksonomik bilgi içeren 16S gibi genlere, diğer diziler genomdaki biyolojik fonksiyonları kodlayan genlere atanır. Sonuç olarak shot-gun metagenomik mikrobiyal topluluklar hakkında taksonomik çeşitlilik ve metabolik fonksiyonlar hakkında veri sağlamaktadır (Sharpton, 2014).

Hedef-amplikon dizilenmesi mikrobiyal toplulukların taksonomik sınıflandırılmasında etkilidir. Bakterilerin taksonomik ve filogenetik sınıflandırılmasında en sık kullanılan değişken bölge, 16S ribozomal RNA geninin V3 ve V4 bölgeleridir. Yeni nesil dizileme okumasından önce, amplikon kütüphanesi hazırlığı sırasında PCR ile örnekteki 16S rRNA V3 ve V4 bölgeleri yaklaşık ~460 bp amplikon olarak çoğaltılır.

YND ile paralel dizileme teknolojilerinin gelişmesi, genom ve hedef amplikon dizilemelerini daha hızlı ve düşük maliyetli hale getirmiştir. YND teknolojilerinde farklı platformlar geliştirilmiş ve yaygın olarak kullanılmıştır. Ligasyon vasıtasıyla dizileme (SOLiD-Applied Biosciences/Life Teknolojileri), sentezleyerek dizileme (Solexa/Illumina), yarı iletken çip taraması (Ion Torrent/Life teknolojileri) ve pirosekanslamadır (454/ROCHE). Üç önemli YND teknolojisi de belirli konumlarda

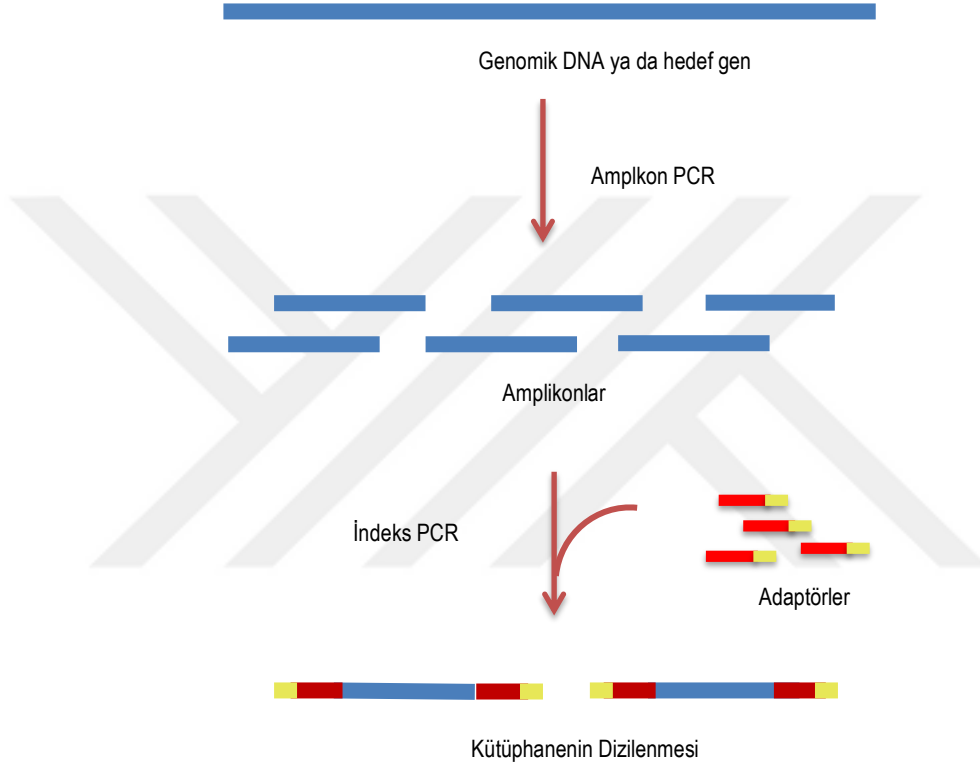
kullanılmasını mümkün kılan spesifik özelliklere sahiptir. Roche/454 platformu 800 baza kadar uzun dizi okumaları gerçekleştirebilirken, Illumina ve SOLiD platformları yüksek işlem hacmi ile 100 bazdan düşük okumaları bile daha düşük maliyetle gerçekleştirir (Rizzi v.d., 2013). Üçüncü nesil dizileme olan Oxford Nanopore teknolojisinin ürettiği tek molekül dizilemeye dayalı MiniON platformu da mikrobiyal topluluk araştırmalarında sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır.

Illumina dizileme platformu sentezleyerek dizileme prensibi ile çalışmaktadır. DNA ekstraksiyonundan sonra ampikon PCR, PCR ürünlerinin saflaştırılması, İndeks PCR, PCR ürünlerinin saflaştırılması, Kütüphane miktar tayini, normalizasyon ve birleştirilmesi ve Novaseq okuması sırası ile gerçekleştirilmektedir. Illumina MiSeq 16S Metagenomik Dizileme iş akışı şeması Şekil 3.2’de verilmiştir



Şekil 3.3 Illumina Miseq 16S rRNA metagenomik dizileme iş akışı şeması

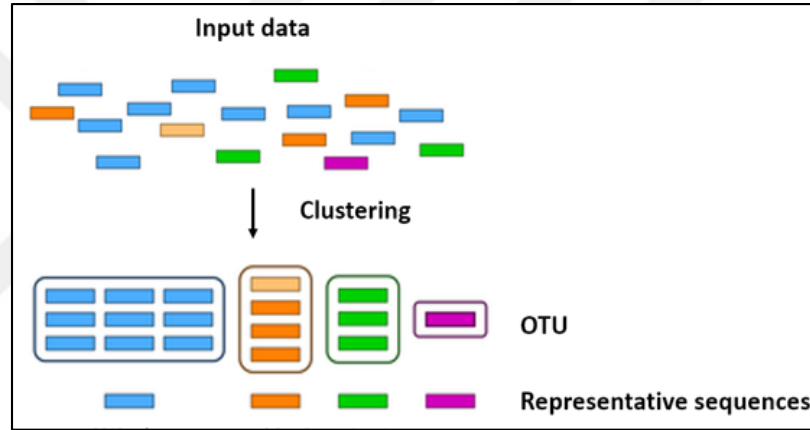
İndeks PCR’da Amplikon PCR ürünlerine, yeni nesil dizileme okuması sırasında farklı örneklerin ayırt edilebilmesi ve birden fazla örneğin tek okumada sonuç verebilmesi için “indeks barkod” görevi gören özel baz dizileri ve PCR ürünlerinin yeni nesil dizileme cihazındaki özel oligo bağlanma bölgelerine tutunabilmesini sağlayan “adaptör” denilen oligo nükleotidler eklenmektedir. Şekil 3.4’de indeks PCR şeması verilmiştir.



Şekil 3.4 İndeks PCR şeması

Dizileme platformu okuma verileri, *.bcl formatında oluşturulmaktadır. Bu verilerden Bcl2fastq v.2.1 (illumina) programı kullanılarak *.fastq dosyaları elde edilmektedir. fastq verileri, içerdiği index verilerine göre farklı örneklere ayrıştırılabilmektedir (Demultiplexing). Kalite kontrol işlemleri amaçlı FASTQC programı (www.bioinformatics.babraham.ac.uk) kullanılmaktadır. Dizileme sürecinde, Fastq okuma verilerindeki düşük kalitedeki baz okumaları, sonraki analiz basamaklarında false positif sonuçlara neden olmaması için, okumalardan çıkarılmaktadır. Kalite filtreleri ve kesim işlemleri için Trimmomatic uygulaması (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>) kullanılmaktadır.

Biyoinformatik Analizlerle örneklerin taksonomik olarak sınıflandırılması, referans dizilere göre hizalanması, OTU-opesyonel taksonomik ünite tespiti ve türlerin benzerliklerine göre gruplandırılması gerçekleştirilmektedir. Tanımlanan 16S rRNA gen dizileri benzerliklerine göre “Operasyonel Taksonomik Ünitelere” kümelenir. OTU’lar sayısal taksonomide temel birim olarak görülmektedir. Genellikle 16S amplikon analizleri ile milyonlarca okuma gerçekleştirilmekte, bu okumalar OTU’larla binler ve yüzler şeklinde temsil edilmektedir ve tür, cins, sınıf ya da şubelere atanmaktadırlar. Şekil 3.5’de okumaların OTU’lara atanmasını gösteren şema verilmiştir. Bu şekildeki kümeleme ile ampikon veri setlerinin analizi kolaylaşmaktadır. OTU’lar tür düzeyinde taksonomik (OTUs) tanımlamada %97 oranında benzer diziler bulunmalıdır.



Şekil 3.5 YND ile elde edilen verilerin (okumaların) OTU’lara atanmasını gösteren şema düzeni

Referans genlerin karşılaştırılmasında SILVA ve Greengenes veritabanları öne çıkmaktadır. SILVA veritabanına <https://www.arb-silva.de> adresinden, Greengenes veritabanına ise [http://greengenes.lbl.gov/ Download/](http://greengenes.lbl.gov/Download/) adresinden ulaşılabilir.

Son yıllarda YND teknolojilerindeki gelişmelerle birlikte yazma eserler üzerindeki biyolojik bozulmalarla ilgili çalışmalarda metagenomik analizler kullanılmaya başlanmıştır. YND yöntemiyle daha önce laboratuvar ortamında mikrobiyolojik analizlerle tespit edilemeyen 58 cinse ait bakteri tanımlanmıştır (Pinzari ve Gutarowska, 2021). Pirodizileme (Migliore v.d., 2017) ve illumina dizileme (Pinar v.d. 2020a; Migliore v.d., 2019; Perini v.d., 2019; Krakov v.d., 2017) teknolojileri ile kağıt ve parşömen eserlerde çalışmalar yürütülmüştür.

4- MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada, Süleymaniye Yazma Eser Kütüphanesi'nde bulunan 2 farklı koleksiyondaki tarihi 6 farklı yazma eserlerden örnek alınmıştır. Mehmet Hilmi-Fethullah Fehmi Koleksiyonu, Serez'de müftülük yapmış Mehmed Hilmi ve Fethullah Fehmi'nin (M. Hilmi ve F. Fehmi'nin şahsi koleksiyonu olduğu düşünülen) torunları tarafından 1970 yılında Süleymaniye Yazma Eser Kütüphanesi'ne bağışlanmıştır. (Süleymaniye Yazma Eser Kütüphanesi Arşivi) Serez Koleksiyonu'ndaki yazma eserler Serez ve civarındaki kütüphane ve medreselerden Balkan Harbi esnasında toplanarak bir müddet Sultan Ahmet Camii mahfelinde muhafaza edildikten sonra 1925 yılında Süleymaniye Yazma Eser Kütüphanesine nakledilmiştir. Yazma eserlerin Serez'de ve Süleymaniye Yazma Eser Kütüphanesi'nde belli bir zaman diliminde coğrafi ortak koşullarda tutulmuş olabileceği düşünülmektedir. Mehmed Hilmi-Fethullah Fehmi Koleksiyonu 17, 54, 71, 90, 231 numaralı eserlerde ve Serezli Koleksiyonu 3647 numaralı eserlerde görsel olarak kağıt ve cilt kapaklarında yoğun mikrobiyal tahribat görülmektedir. Yazma eserlerin tümünde kağıt metin kısmında kopmalar ve lekeler bulunmaktadır. Kağıdın hammaddesi selülozun degradasyonuna bağlı olarak kağıt liflerine ayrılmış ve pamuksu bir görünüm almıştır. Kemirgen aktivitesine bağlı olarak tahribat görülmektedir. M.Hilmi F.Fehmi 54 numaralı eserin deri olan cilt kapaklarında büyük oranda parça kayıpları ve lekeler mevcuttur. 231 numaralı eserde kemirgenlerin meydana getirdiği kemirme izleri belirgin bir şekilde görülmektedir. Eserlerin künye bilgileri ve tahribat tanımları Tablo 4.1'de ve tahribatlarına ait görseller Şekil 4.1'de verilmiştir.

Eserler 2012 yılından itibaren yenilenen depo ortamında kontrollü iklimik koşullarda tutulmaktadır. Depo alanlarında iklimik koşullar IFLA'nın kütüphaneler için belirlemiş olduğu standartlar çerçevesinde sıcaklık 18 ± 2 C°, bağıl nem %45-55 olacak şekilde düzenlenmiştir. Eserlerdeki yoğun mikrobiyal tahribatının ve kemirgen hasarının kütüphane ortam şartları ve iklimik koşullar düzenlenmeden ya da

kütüphaneden önceki tutuldukları ortamlarda meydana gelmiş olabileceği düşünülmüştür.

Tablo 4.1 Örnek alınan eserler hakkında künye bilgileri ve tahribat detayları

Koleksiyon isim ve numarası	Örnek Kodu	Eser Hakkında Bilgi	Tahribatlı alan
M.Hilmi F.Fehmi Koleksiyonu 54	T1	Şeyhülislam Çatalca Ali Efendi'nin fetvalar kitabı. Tarih bilgisi yok. 17-18. Yüzyılda yazılmış olabileceği düşünülüyor.	Kağıtta pamuklaşma, kopmalar,parça kaybı, Deride pembe mor leke oluşumu, deride parça kaybı
M. Hilmi F.Fehmi Koleksiyonu 231	T2	Konusu Arap Edebiyatı. 1613 yılında yazılmış	Etek kısımlarında pamuklaşma, kağıtta parça kaybı ve kopmalar
M.Hilmi F.Fehmi Koleksiyonu 17	T3	Fetva Kitabı olarak başvuru kitapları arasında. 1422 yılında yazılmış.	Baş kısmından çok büyük parça kayıpları, pamuklaşma, iç kısımda lekeler
M.Hilmi F.Fehmi Koleksiyonu 71	T4	Fetva kitabı olarak başvuru kitapları arasında yer almaktadır. 1502 yılında yazılmış.	Başkısmında çok büyük parça kayıpları ve kopmalar, Pamuklaşma
M.Hilmi F.Fehmi Koleksiyonu 90	T5	Fetva kitapları arasında önemli bir eser. 1490 yılında yazılmış.	Kağıtta pamuklaşma, kopmalar,parça kaybı, deride parça kaybı
Serezli Koleksiyonu 3647	T6	Konusu Arap edebiyatı. 1237 yılında yazılmış.	Kağıtta pamuklaşma, lekeler ve parça kaybı



Şekil 4.1 A-B) 17 no’lu eserde baş kısmındaki pamuk su görünümü almış kağıt ve parça kayıpları. C) 231 no’lu eserde kemirfen tahribatı ve mikroorganizma nedeniyle meydana gelen kağıt üzerindeki lekeler. D) 54 no’lu eserde ciltte meydana gelen parça kayıpları E) 71 no’lu eserde meydana gelen lekeler ve pamuksu görünüm.

Mikrobiyal tahribat görülen alanlarda pH değişiminin ölçülmesi için tahribat görülen ve görülmeyen alanlarda pH değeri ölçülmüştür. Kağıdın pH derecesini belirlemek amacıyla Strlic ve Kolar’ın belirtmiş olduğu metoda göre ölçüm yapılmıştır (Strlic ve Kolar, 2004). Bir damla distile su elektrod ucuna damlatılmış ve Ph metre elektrodları değer sabitlenene kadar kağıt yüzeyine temas ettirilmiştir.



Şekil 4.2 Eserler üzerindeki PH ölçümleri A) Tahribatlı alandan ölçüm B) Tahribatsız alandan ölçüm

4.1. Kültür temelli Analizlerle Bakterilerin Tanımlanması

4.1.1 rnek alma

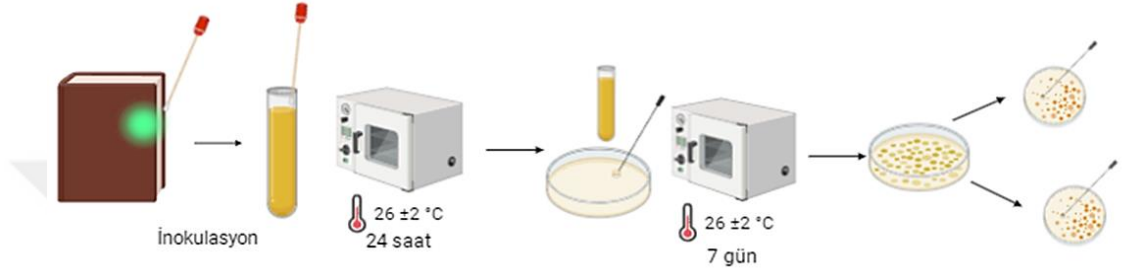
Süleymaniye Yazma Eser Kütüphanesi M. Hilmi F. Fehmi koleksiyonuna ait 5 farklı yazma eserden ve Serezli Koleksiyonuna ait 1 adet yazma eserden kültür esaslı analizler için tahribat görülen alanlardan steril swabla (Cultiplast-LOT:Z1080A) rnekleme yapılmıştır. Örnekleme işleminde, steril swablar 10 saniye süre ile kağıt yüzeyine temas ettirilmiş ve koruyucu tüplerin içerisine konularak laboratuvara taşınmıştır. Her bir eser için 2 örnekleme işlemi gerçekleştirilmiştir. şekil 4.2 de eserlerden steril swabla örnek alınması gösterilmektedir.



şekil 4.3 Eserlerden steril swaplarla örnek alınması

4.1.2 İnokulasyon ve İnkübasyon

Steril swabların 5 ml lik tüplerdeki Nutrient Broth besiyerine ekimi yapılmıştır. Sıvı besiyeri çalkalamalı inkübatörde 150 RPM ve 26 ± 2 sıcaklıkta 24 saat inkübe edilmiştir. Örneklerin Nutrient Broth sıvı besiyerinden steril swablar kullanılarak yayma plaka ekim yöntemi ile petriler içindeki TSA besiyerine ekimi yapılmıştır. Petriler inkübatörde 26 ± 2 sıcaklıkta 7 gün inkübe edilmiştir. Karışık popülasyonlu besiyerlerinden alt kültür yapılarak saf bakteri kolonileri elde edilmiştir.



Şekil 4.4. Örnek alımından itibaren TSA üzerinde saf kolonilerin izole edilmesine kadar geçen iş akışı

Koliform bakterilerin ve E. Coli türü bakterinin izole edilmesi ve canlılığın saptanması için kromojenik ECC agar (Laborlar-LB.709) (LOT:1003) kullanılmıştır. Kromojenik ECC agar E.coli ve diğer koliform bakteriler için seçici bir besiyeridir. Enterobakterilerden E. Coli kolonileri ECC besiyerinde mor renkli bir görünüm vermektedir. Kültür temelli ve Metagenomik analizler için örnek alınan 6 yazma eserdeki tahribatlı bölgelerden swablarla örnekleme işlemi yapılmış, swabların yayma plaka ekim yöntemi ile ECC agarlara ekimi gerçekleştirilmiştir. Örnekleme işlemi 3 defa tekrarlanmıştır. Agarlar 36 ± 1 derecede 48 saat süre ile inkübe edilmiştir.

4.1.3 İzole edilen bakterilerin 16S rRNA analizleri

TSA besiyerinde izole edilen 16 bakteri üzerinde 16S rRNA amplifikasyonu ve Sanger dizileme gerçekleştirilerek tür düzeyinde tanımlama yapılmıştır. Bakteri DNA izolasyonu ZYMO Research Quick DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Catalog No. D6005) ile üreticinin vermiş olduğu protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Kolonilerden ekstrakte edilen DNA'ların PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. PCR'da hedeflenen bölgelerin çoğaltılması için universal primerler 27F 5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3' ve 1492R 5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT3' kullanılmıştır. Yaklaşık 1470 bazlık

bölgeyi çoğaltmak için tek aşamalı PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

PCR karışımında 12,5 µl 1X DNA Taq Polimeraz (Solis Biodyne, FIREPol DNA Polymerase); 5 µl reverse primer; 5 µl forward primer ve 3 µl kaynak bakteriyal DNA kullanılmıştır. Karışım Toplam 35 µl olacak şekilde su ile tamamlanmıştır. Amplifikasyon programı; 95°C de 5 dakika ilk denatürasyon uygulanmış; 95°C de 45 saniye denatürasyon, 57°C de 45 saniye bağlanma ve 72°C de 60 saniye uzama basamakları 30 döngü şeklinde ve son olarak 72°C de 5 dakika son uzama şeklinde yürütülmüştür. PCR Amplifikasyonu Kyratec Thermocycler ile gerçekleştirilmiştir.

PCR sonrası elde edilen amplifikonlar 1x TAE tampon ile hazırlanan %1,5 agaroz jelde 100 volt akımda 90 dakika elektroforezde yürütülmüş ve ethidium bromide boyası kullanılarak UV ışığında görüntüsü alınmıştır.

Amplifikasyon sonrası elde edilen DNA, Sanger Dizileme Teknolojisi ile çift yönlü olarak dizilenmiştir. Elde edilen ham veri hizalanmış ve kimerik diziler çıkarılmıştır. (BioEdit programı kullanılmıştır.) Elde edilen diziler BLAST programı kullanılarak NCBI veribankasındaki referans genlerle karşılaştırılmıştır.

4.2 Metagenomik Analizler

4.2.1 Örnekleme

Metagenomik analizler için tahribatlı alandan steril şartlarda kağıt parçası alınmış ve 1,5 ml. lik steril tüplere konulmuştur. Örnekler tahribat nedeniyle kendiliğinden kopmuş olan ve restorasyonda yerine konulamayacak olan kağıt parçalarıdır.



Şekil 4.5 A) Çalışılan yazma eserden yoğun tahribat görülen alan B) Tahribatlı alandan kopmuş ve dökülmüş kağıt parçalarının steril 1,5 ml.lik tüplere konulması

4.2.2 DNA izolasyonu ve 16S rRNA Amplikasyonu

Kağıt parçaları üzerinden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyon GeneMATRIX Tissue & Bacterial DNA Pürifikasyon kiti (EurX cat no.3550) kullanılarak üretici firmanın vermiş olduğu protokol ile gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA'nın konsantrasyonu Victor 3 Florometre ile picogreen boyası kullanılarak ölçülmüştür.

16S rRNA V3-V4 bölgeleri forward ve reverse primerler (Klindworth, 2013) kullanılarak çoğaltılmıştır. Kullanılan primerlere ait baz dizisi Tablo 4.2.'de verilmiştir. Toplam 25 µl. lik PCR karışımında 12,5 µl 2X KAPA HotStart PCR mix; 5 µl reverse primer; 5 µl forward primer ve 2,5 µl kaynak bakteriyel DNA kullanılmıştır.

Amplifikasyon programı; 95°C de 3 dakika ilk denatürasyon uygulanmış; 95°C de 30 saniye denatürasyon, 55°C de 30 saniye bağlanma ve 72°C de 30 saniye uzama basamakları 25 döngü şeklinde ve son olarak 72°C de 5 dakika son uzama şeklinde yürütülmüştür. PCR amplikonlarının saflaştırılması AMPure XP (Beckman Coulter) kullanılarak standart protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Primer dimerlerden ve serbest primerlerden temizlenen saf PCR amplikonlar %1,2 lik agaroz jelde TAE buffer kullanılarak görüntülenmiştir.

Tablo 4.2 Metagenomik PCR amplifikasyonunda kullanılan primer çifti

Primer Dizisi (5'-3')	Gen	Baz uzunluğu
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG	16S rRNA (V3-V4)	50
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAA TCC	16S rRNA V3-V4)	54

4.2.3 İndeks PCR ve Kütüphane oluşturulması

Illumina MiSeq dizilemesi için kütüphane oluşturma aşamasında, Nextera XT indeks kiti kullanılarak İndeks PCR gerçekleştirilmiştir. PCR ürünlerine 2 indeks barkod bölgesi bağlanmıştır. Toplamda 50 µl'lik PCR karışımında; 25 µl 2X KAPA HotStart PCR Mix, 5 µl Nextera XT İndeks Primer 1(N7xx), 5 µl Nextera XT İndeks Primer 2 (S5xx), 5 µl DNA ve 10 µl su kullanılmıştır. İndeks PCR protokolü aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir.

- 1) 95 °C'de 3 dakika
- 2) Takip eden 8 döngü için
95 °C'de 30 saniye
55 °C'de 30 saniye
72 °C'de 30 saniye
- 3) 72 °C'de 5 dakika

İndeks PCR ürünleri AMPure XP (Beckman Coulter) kullanılarak saflaştırılmıştır. Oluşturulan Kütüphanelerdeki örnekler havuzlama yöntemi ile birleştirilmiştir.

4.2.4 Dizileme:

Dizileme Illumina'nın 'Sentezleyerek dizileme' (Sequencing by Synthesis) teknolojisi ile gerçekleştirilmiştir. Dizilemede Illumina Novaseq 6000 cihazı kullanılmıştır. Dizileme BM Laboratuvar Sistemleri tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen tüm ham diziler GenBank'taki Dizi Okuma Arşivinde (Sequence Read Archive-SRA) erişim no. SAMN42359052; Bioproje no. PRJNA1132802 olarak kaydedilmiştir.

4.2.5 Biyoinformatik Analizler:

Illumina Novaseq 6000 cihazı ile Novaseq Control Software programıyla okuma görüntülerini işlenmiş ve Real Time Analysis programı kullanılarak bazlar tayin edilmiştir. Dizileme sonrasında üretilmiş olan veri, analiz için FASTA formatında veriye dönüştürülmüştür. Fastqc dosyalarının kalitesinin kontrolü FASTQC ile gerçekleştirilmiştir. QIIME 2 programı ile ilk adımda ham okumaların kalite kontrolü, kalite filtrelemesi, kimerik sekansların filtrelenmesi ve paired end okumaların birleştirilmesi yapılmıştır. Okuma sayısı, GC yüzdesi, kalite skorları ve okumaların uzunluğu belirlenmiştir. Skorları 20'den küçük olan okumalar, primerler ve barkodlar filtrelenmiştir. Dizileme sonucu oluşan okumaların kalitesini doğrulamak için PHRED algoritma skorunu kullanılarak Q20 ve Q30 kalite skorları belirlenmiştir. Q(20) 100'de 1 yanlış olma olasılığı veya %99 doğruluğu, Q(30) ise 1000'de 1 yanlış olma olasılığı veya %99,9 doğruluğu olan baz tanımlanmasını ifade eder. Q(20) veya üzeri bir phred puanı sekansların biyoinformatik analiz için yeterli kalitede olduğunu gösterir (Ewing ve Green).

Taksonominin belirlenebilmesi için ilk olarak benzer diziler kümelenmiş ve kümeleme analizleri ile ait oldukları OTU'lara ayrılmıştır. OTU dizilerinin karşılaştırıldığı taksonomik analizler, BLAST programı kullanılarak SILVA (<https://www.arb-silva.de/>) ve NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) veritabanlarında gerçekleştirilmiştir. Taksonomik Analizlerde OTU'lar %97 ve üzerinde benzerlik gösteren gruplara atanmıştır. Taksonomik çeşitlilik analizlerinde Krona Analizi ve cins düzeyinde nispi bolluk analizleri gerçekleştirilmiştir. Krona Analizinde, örnek metagenomun taksonomik hiyerarşisi daire grafiği şeklinde görselleştirilmiştir. Farklı örneklerden elde edilen bakteriyal topluluğa ait diziler cins düzeyinde değerlendirilmiştir. Bazı bakterilere ait dizilerin tür düzeyinde tanımlanması da mümkün olmuştur. Çeşitlilik yüksek olarak tanımlandığından cins düzeyinde nispi bolluk oranı %1'in üzerinde olan bakteri gruplarının her bir örnekteki farklılaşması bar grafiği olarak düzenlenmiştir.

Örneklerin Filogenetik açıdan ilişkilerini göstermek amacıyla UPGMA ağaç grafiği oluşturulmuş ve Python ETE tool kit "Tree of Life" web uygulaması üzerinden

görüntülenmiştir.(<http://etetoolkit.org/treeview/?treeid=dcbe982338e09c3af313ea111cfb48bc&algid=ce443ed1e53858bf4e11d1e069c7a927>")

Örnekler arası karşılaştırmalı Alfa Seyreltme, Alfa Çeşitlilik ve Beta çeşitlilik Analizleri Gerçekleştirilmiştir. Örnekler arasındaki farklılıkları standardize etmek için veriler normalleştirilmiş ve Alfa Seyreltme Analizi gerçekleştirilmiştir. Örnekleme çalışmalarındaki farklılıkların değerlendirilmesi için dizi derinliği ve observed_features kullanılarak Seyreltme (Rarefaction) eğrileri grafiği oluşturulmuştur. Bu grafik örneklem zenginliğinin veya dizilenmesinin tam olarak gözlenip gözlenmediğini belirlemek için kullanılmaktadır. Grafikte çizgiler x eksenini boyunca düzleşmekte (platoya ulaşmakta) ise bu örnekleme derinliğinin yeterli olduğunu göstermektedir. Rarefaction eğrilerinin kullanılması, dizileme işleminin örnekteki mikrobiyal çeşitliliğin doğru bir şekilde yakaladığına dair bilgi sunmaktadır.

Bir örnekte bulunan türlerin çeşitliliğini belirlemek amacıyla Shannon's, Chao1 ve Simpson's indisleri hesaplanarak alfa çeşitlilik analizleri gerçekleştirilmiştir. Örnekler; Shanon's indisi ile cins zenginliği ve çeşitliliği açısından ölçülmüş, Chao1 indisi ile verideki cins çeşitliliği ve yetersiz veri nedeniyle gözden kaçabilecek cinsler hesaplanmış, Simpson's indisi ile farklı cinslerin göreceli bolluğu ve zenginliği hesaplanmıştır. İndisler PAST 4.0 programı kullanılarak hesaplanmıştır. Bu indislere ait xy koordinat grafikleri oluşturulmuştur.

Beta çeşitlilik analizi QİİME Emperor plot komutu ile gerçekleştirilmiştir. PcoA-Temel Bileşenler analizi için Ağırlıksız Unifrac metriksi ile örneklerin birbirlerine uzaklıkları hesaplanmış ve 3D grafiği oluşturulmuştur. Ağırlıksız Unifrac uzaklık tanımlayıcı örnekler arasındaki filogenetik farklılığı içeren topluluğun zenginliğinin nitel ölçümüdür. Toplulukta bulunan taksonomik birimlerin çeşitliliği hakkında bilgi vermektedir.

5. SONUÇLAR

5.1 Kağıtta pH Ölçümleri

Tahribatlı ve tahribatsız alanlarda ölçülen pH değerleri Tablo 5.1’de verilmiştir. T2 ve T3’de değerler yükselirken, diğer örneklerde düşmüştür.

Tablo 5.1 Kağıtta pH ölçüm değerleri

Örnek	Tahribatsız alan pH değeri	Tahribatlı alan pH değeri	Değişim değeri
Örnek T1	6,65	5,58	-1,07
Örnek T2	5,40	6,10	+0,70
Örnek T3	7,03	7,48	+0,43
Örnek T4	6,13	5,22	-0,91
Örnek T5	6,22	5,57	-0,65
Örnek T6	5,50	4,96	-0,54

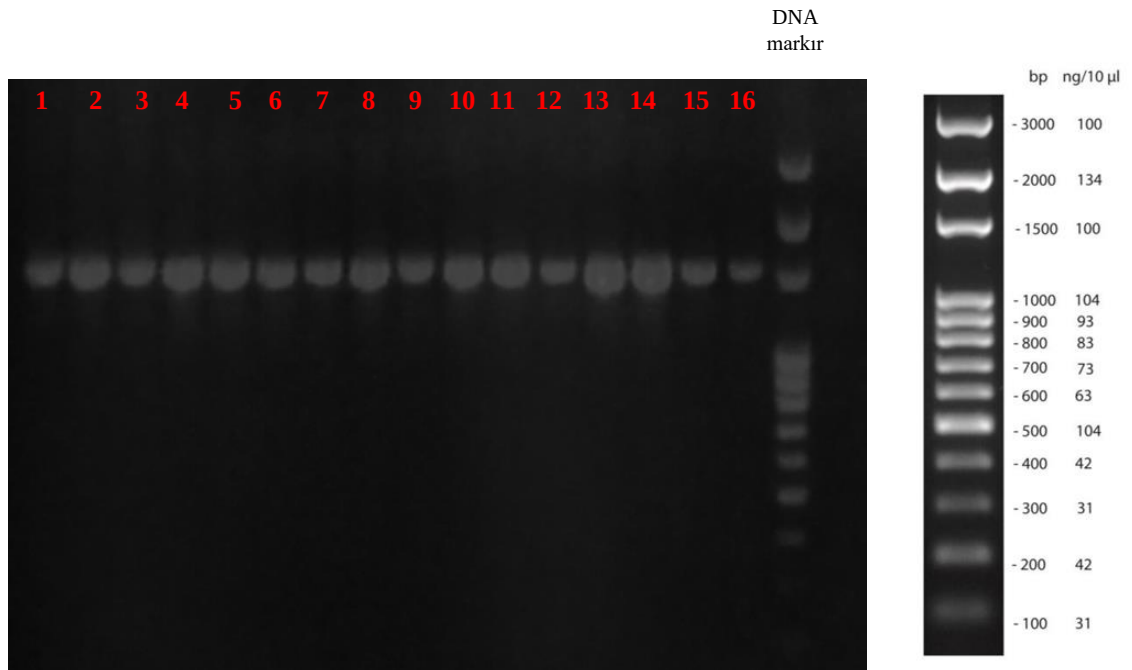
5.2 İzole edilen bakteri kolonilerinin 16S rRNA Analizleri

Kültür temelli yöntemlerle izole edilen bakterilerden DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. 16S rRNA amplifikasyonu sonrası PCR ürünleri saflaştırılmış ve konsantrasyonları ölçülmüştür. Tüm izolatları PCR ampliconlarının konsantrasyonları Tablo 5.2’de verilmiştir.

Tablo 5.2 Örneklerde PCR sonrası ölçülen DNA konsantrasyonları

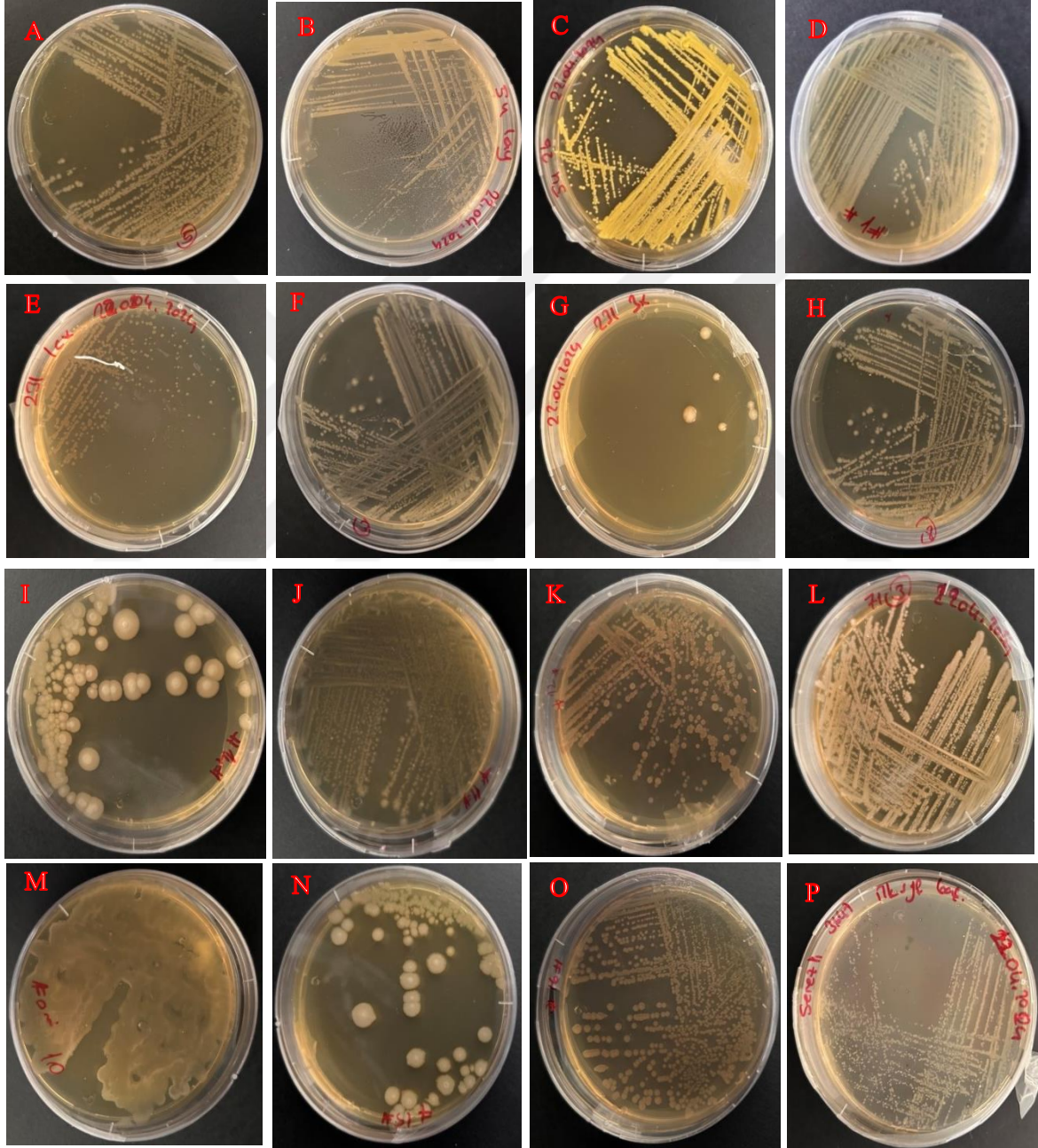
İzolat Numarası	İzole edilen DNA konsantrasyonu	260/280
1	76 µg/ µl	1,66
2	126,1 µg/ µl	1,96
3	50,7 µg/ µl	1,92
4	36,3 µg/ µl	1,91
5	78,1 µg/ µl	1,92
6	156,5 µg/ µl	1,89
7	19,7 µg/ µl	1,99
8	153,3 µg/ µl	1,83
9	135,8 µg/ µl	1,87
10	67,3 µg/ µl	1,82
11	61,3 µg/ µl	1,92
12	67,7 µg/ µl	1,91
13	62,3 µg/ µl	1,93
14	239,8 µg/ µl	1,88
15	58,2 µg/ µl	1,91
16	33,3 µg/ µl	1,94

PCR amplikonları %1,5 agaroz jel elektroforez sonrası jelde yürütülerek Etidyum bromür ile görüntülenmiştir. PCR amplikonlarının jeldeki görüntüleri Şekil 5.1’de verilmiştir. Jelde amplikonların boyutları DNA markır’la yaklaşık olarak 1500bp olarak görüntülenmiştir.



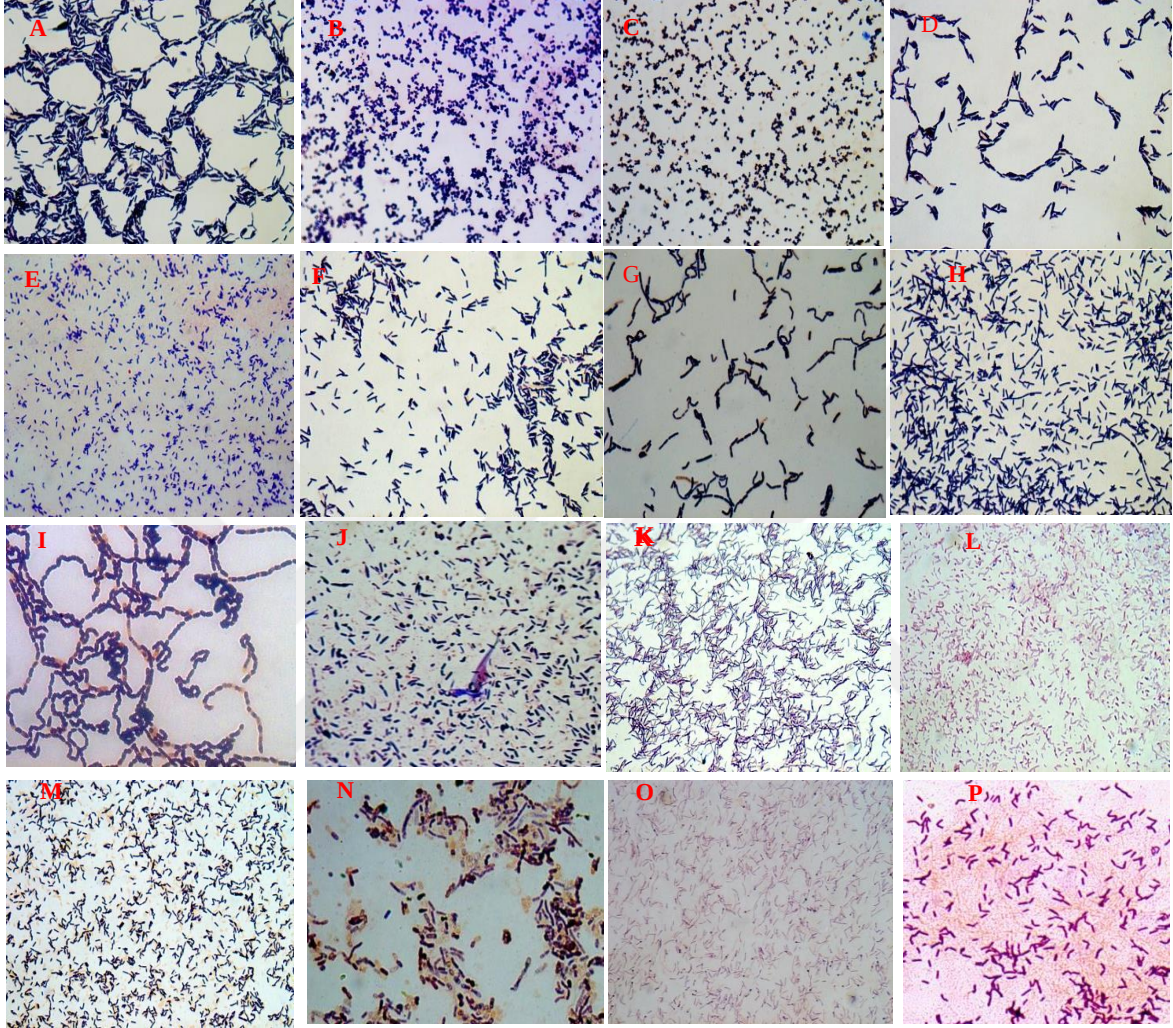
Şekil.5.1 Amplikonların %1,5 agaroz jeldeki görüntüsü B) Solis Biodyne 3000 bp DNA markır

İzole edilen bakterilerin TSA besiyeri üzerinde koloni morfolojileri gözlenmiştir. Besiyerdeki koloni görüntüleri Şekil 5.2’de görülmektedir. A-C) T1 örneğinden, D-G) T2 örneğinden, H-I) T3 örneğinden, J-L) T4 örneğinden M-O) T5 örneğinden P) T6 örneğinden izole edilmiştir.



Şekil 5.2 . TSA üzerinde izole edilen bakteri kolonileri: A-C) T1 örneğinden, D-G) T2 örneğinden, H-I) T3 örneğinden, J-L) T4 örneğinden M-O) T5 örneğinden P) T6 örneğinden izole edilmiştir.

İzole edilen bakteri hücrelerinde Gram Boyama yapılmıştır. Şekil 5.3'te izolatların Mikroskop altında X100 de görüntüleri verilmiştir.



Şekil 5.3 İzole edilen bakterilerin mikroskop görüntüsü X100

PCR Amplikonları dizileme işlemi hizmet alımı ile BM Labortuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Dizileme çift yönlü Sanger dizileme şeklinde gerçekleştirilmiştir.

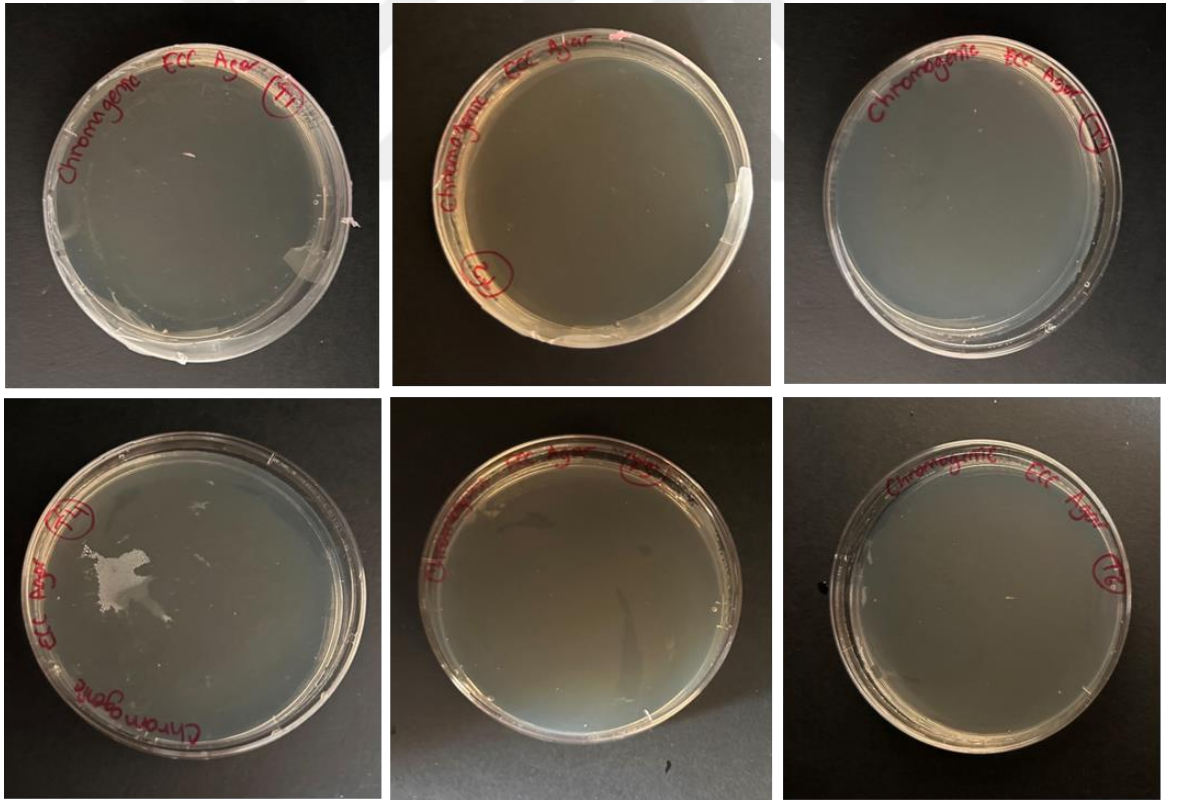
Tablo 5.3 İzole edilen bakterilere ait tür düzeyinde tanımlama, benzerlik oranı ve erişim numaraları

İzole edildiği örnek	İzolat numarası	Bakteri Türü	Benzerlik oranı	NCBI'da referans gösterilen erişim numarası
T1	İ5	Niallia circulans	99,11	NR_112632.1
	İ6	Micrococcus luteus	99,87	NR_075062.2
	İ7	Micrococcus luteus	99,87	NR_075062.2
T2	İ1	Niallia Circulans	98,55	NR_112632.1
	İ2	Fredinandcohnia humi	98,46	NR_025626.1
	İ3	Niallia Circulans	99,13	NR_112632.1
	İ4	Priestia Megaterium	99,85	NR_117473.1
T3	İ8	Niallia Circulans	98,86	NR_112632.1
	İ14	Priestia megaterium	99,86	NR_117473.1
T4	İ11	Neobacillus niacini	98,85	NR_113777.1
	İ12	Ornithinibacillus scarpharcae	90,72	NR_117927.1
	İ13	Psychrobacter pulmonis	100	NR_118026.1
T5	İ10	Bacillus haynesii	99,71	NR_157609.1
	İ15	Priestia megaterium	100	NR_117473.1
	İ16	Ornithinibacillus scarpharcae	100	NR_117927.1
T6	İ9	Microbacterium foliorum	99,24	NR_025368.1

6 örnekte toplam 16 bakteri izole edilmiştir. İzole edilen bakteriler, Sanger çift yönlü dizileme ile elde edilen diziler hizalanmıştır. Hizalanan diziler NCBI'daki referans genlerle karşılaştırma sonrasında benzerlik oranına göre tür düzeyinde tanımlanmıştır. Tüm bakterilerdeki benzerlik oranı %90,72-100 arasında değişmektedir. T1'de M.

luteus ve *N. Circulans*; T2’de *N. Circulans*, *P. Megaterium* ve *Fredinandcohnia humi*; T3’de *N. Circulans* ve *P. Megaterium*; T4’de *Neobacillus niacini*, *Ornithini scarpharcae* ve *Psychrobacter pulmonis*; T5’de *B. Haynesii*, *P. Megaterium* ve *O. Scarpharcae*; T6’da *Microbacterium foliorum* türleri tanımlanmıştır. Tür düzeyinde benzerlik oranı %98 ve üzeri olması tanımlamanın güvenilirliğini arttırmaktadır. İzole edilen bakterilerin NCBI’deki referans genlerle karşılaştırılması sonucu belirlenen türler, benzerlik oranları ve erişim numaraları tablo 5.3’de verilmiştir.

Koliform bakterilerinin izole edilmesi için Kromojenik agarda yapılan ekim işlemi sonunda besiyerinde bir gelişme görülmemiştir. *E. Coli* ve diğer koliform bakteriler için seçici besiyerinde 3 kez tekrarlanan analiz sonrasında koliform bakterilerin canlı olmadığı düşünülmüştür. Şekil 5.4’de ekim yapılan kromojenik agarların yer aldığı petriler görüntülenmiştir.



Şekil 5.4 Swablarla örnek alındıktan sonra ekimi yapılan Kromojenik ECC Agarlarda gelişim

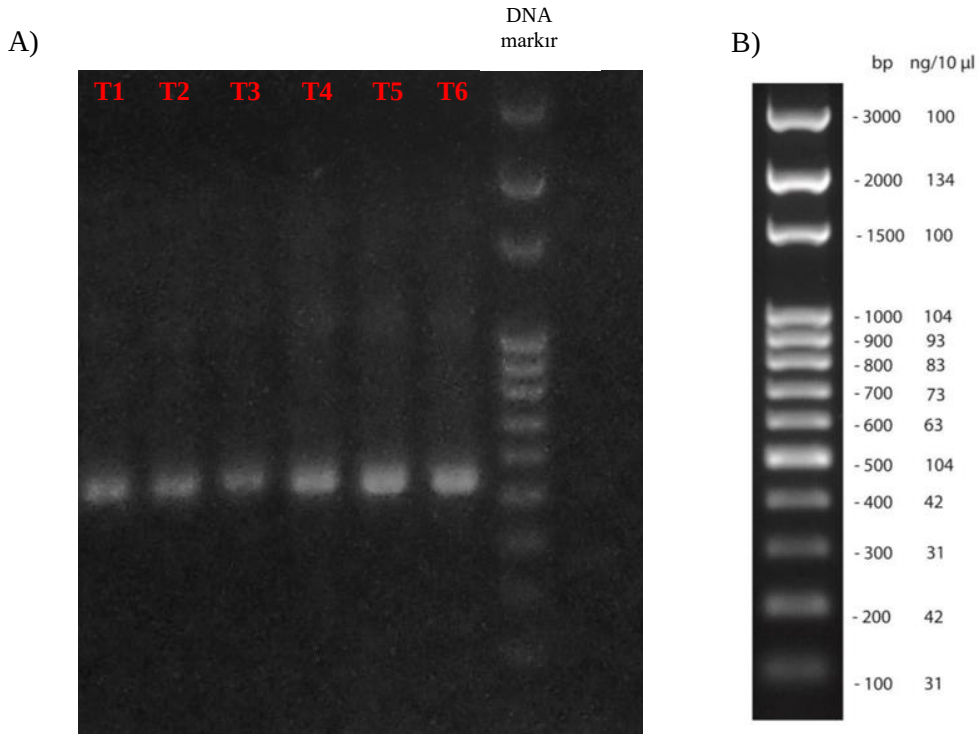
5.2 Metagonomik 16s rRNA Analizleri

Kağıt parçalarından ekstrakte edilen DNA konsantrasyonları ölçülmüştür. Kağıt parçalarından izole edilen DNA konsantrasyonları Tablo 5.4. de verilmiştir.

Tablo 5.4 İzolasyon sonrası DNA konsantrasyonları

Örneklerin alındığı eser Koleksiyon adı ve numarası	Kağıt parçasının kodu	İzole edilen DNA konsantrasyonu ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	260/280
M.Hilmi F.Fehmi 54	T1	27,9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	2,16
M.Hilmi F.Fehmi 231	T2	25,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1,83
M.Hilmi F.Fehmi 17	T3	32,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1,96
M.Hilmi F.Fehmi 71	T4	33,9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1,92
M.Hilmi F.Fehmi 90	T5	28,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1,68
Serezli 3647	T6	32,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	2,32

DNA ekstratlarının 16S rRNA amplifikasyonları gerçekleştirilmiştir. PCR amplifikasyon ürünlerinin %1,2'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Amplikonların jeldeki görüntüsü Şekil 5.5'de verilmiştir. Çoğaltılan DNA parçaları, DNA markır üzerinde 500-600 bp aralığında görüntülenmektedir.



Şekil 5.5 A)PCR ürünleri %1,2'lik agaroz jel görüntüsü B) Solis Biotek 3000 bp DNA markır

5.2.1 Dizileme:

En fazla okuma 378425 ile T2 örneğinde gerçekleştirilirken en az okuma T5 örneğinde 46232 olarak gerçekleştirilmiştir. Okumaların baz çağırma kalite skorlarını belirleyen Q20 ve Q30 değerleri belirlenmiştir. Phred Kalite skorları değerlendirildiğinde baz arama (base call) hata oranının düşük olduğu görülmüştür. Q20 ve Q30 değerleri en yüksek T3 örneğinde %100-%96,15 olarak ölçülmüştür. En düşük değerler %99,38-%90 olarak T2’de ölçülmüştür. Tüm örneklerle ait toplam okuma sayısı, filtrelenen ve birleştirilen okuma sayıları ile Q20, Q30 kalite skorları değerleri Tablo 5.5. ‘de verilmiştir. Örneklere ait forward ve reverse ham sekans kalite skorları EK A’da verilmiştir.

Tablo 5.5 Örneklerdeki okunan dizi sayısı ve kalite skorları değerleri

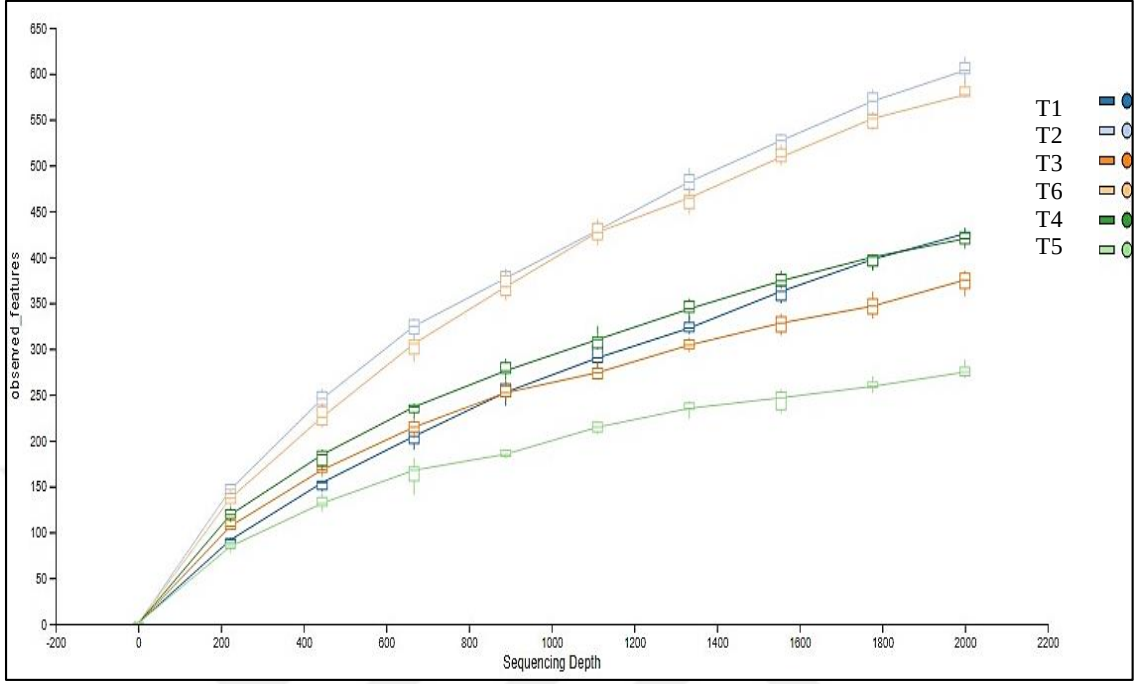
Örnek	Toplam okuma sayısı	Filtrelenen	Birleştirilen	Q20 (%)	Q30 (%)
T1	205584	182932	145233	99,9	95,6
T2	378425	282551	193395	99,38	90
T3	58498	46341	34553	100	96,15
T4	60537	47527	36523	99,9	95,16
T5	46232	35911	26520	99,9	95,14
T6	95562	83730	79918	100	97,65

5.2.2 Biyoinformatik Analizler:

Dizileme sonrası biyoinformatik analizler QIIME2 ile gerçekleştirilmiştir. Tanımlanan diziler referans genlerle benzerliklerine göre cins düzeyinde OTU’lara kümelenebilirlerdir. Filogenetik ağaç, alfa çeşitlilik, beta çeşitlilik ve taksonomik analizleri gerçekleştirilmiştir.

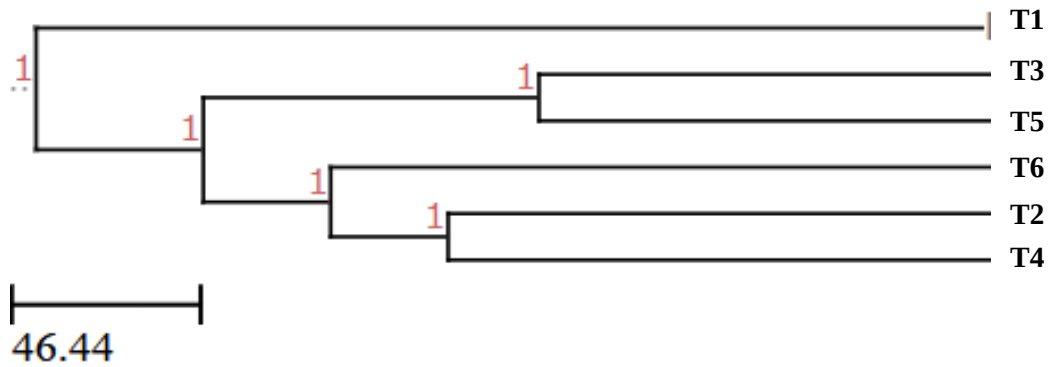
Alfa Seyreltme Analizinde, eğriler 6 örnekteki bakteriyal çeşitliliğinin zenginliğini göstermektedir. Dizi derinliğine bağlı olarak oluşturulan Observed features (ASV) dağılımına göre, dizi derinliği değerinin 2000’lerde plato oluşturmaya başlamış olduğu görülmektedir. Eğrilerin örnekleme etkinliği ile örtüşmekte olduğunu ve elde edilen verilerin biyoinformatik analizler için yeterli olduğunu göstermektedir. Şekil

5.6’da okumaların dizi derinliğine bağlı observed-features dağılımı grafiği görülmektedir.



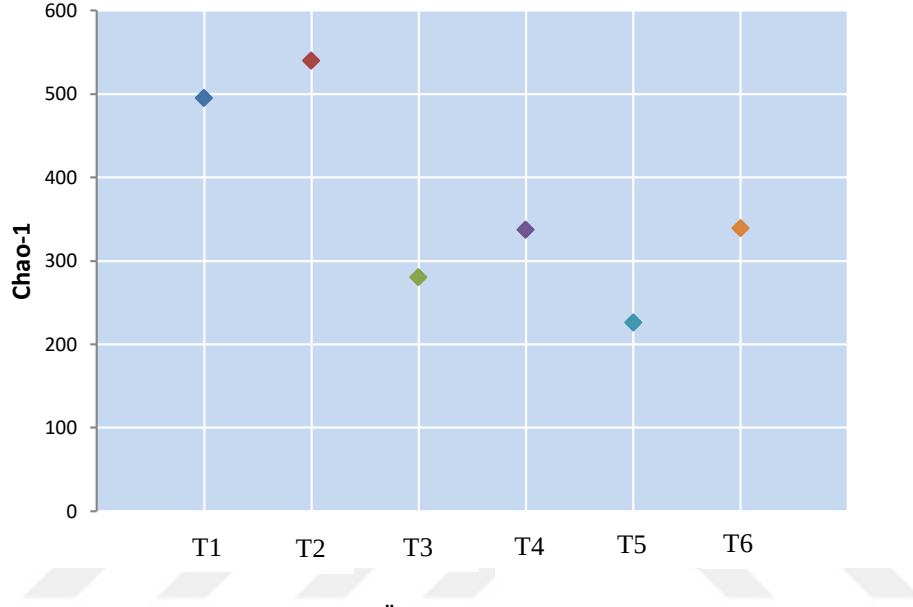
Şekil 5.6 Okumaların dizi derinliğine bağlı Observed features (ASV) dağılımı grafiği

Bakteriyal topluluk yapısı içim oluşturulan UPGMA kümeleme analizine göre örnekler arasında farklılıklar bulunmaktadır. Görüntülenen filogenetik ağaç grafiğinde tanımlanan bakteri toplulukları arasında T3-T5 ve T2-T4 örneklerinde en fazla kümeleşme görülürken T1 örneğinde diğer örneklerle göre uzaklık görülmüştür. Şekil 5.7’de UPGMA filogenetik ağaç grafiği verilmiştir.



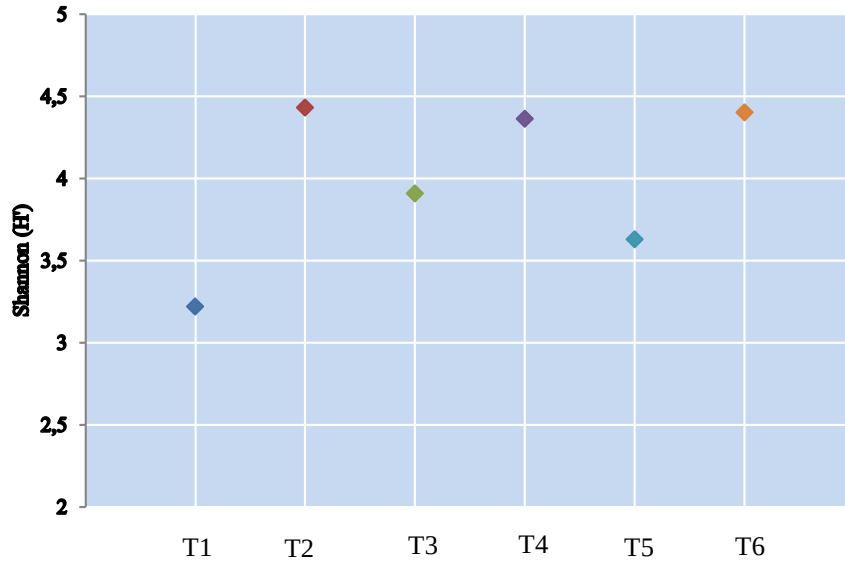
Şekil 5.7 6 örnekte bakteri toplulukları için oluşturulan UPGMA filogenetik ağacı

Chao_1 indisi: T1’de 495,4; T2’de 540,1; T3’de 280; T4’de 337; T5’de 226 ve T6’da 339 olarak hesaplanmıştır. Chao-1 indisi biyoçeşitlilik analizlerinde sadece cins çeşitliliği açısından ele almaktadır ve göreceli bolluk açısından düşük olan cinsleri de çeşitlilik açısından değerlendirmektedir. En yüksek çeşitlilik T2’de, en düşük çeşitlilik T5’de görülmektedir. Şekil 5.8’de örneklerdeki Chao-1 indisinin xy koordinat grafiği üzerinde dağılımı görüntülenmiştir.



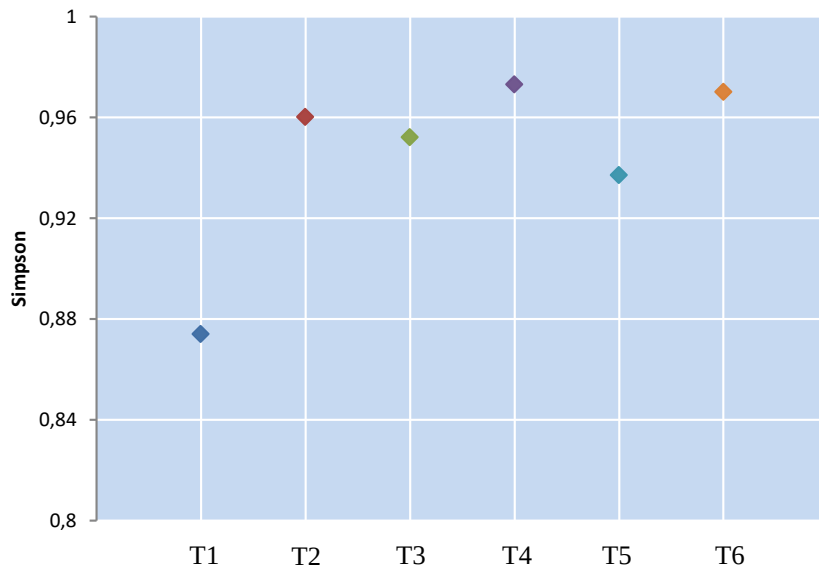
Şekil 5.8 Örneklerdeki Chao-1 indisi dağılımı

Tüm veride hesaplanan Shannon indisi (H') tüm örneklerde kıyaslanmıştır: T1’de 3,21; T2’de 4,43; T3’de 3,90; T4’te 4,36; T5’de 3,62 ve T6’da 4,4 olarak hesaplanmıştır. Shannon indisleri tüm örneklerde yakın olarak gözlenmiştir. Cins çeşitliliği açısından en yüksek çeşitlilik T2, T4 ve T6’da gözlenirken, en düşük çeşitlilik T1’da gözlenmiştir. Şekil 5.9’da örneklerdeki Shannon indisi değerlerinin xy koordinat grafiği üzerinde dağılımı görüntülenmiştir.



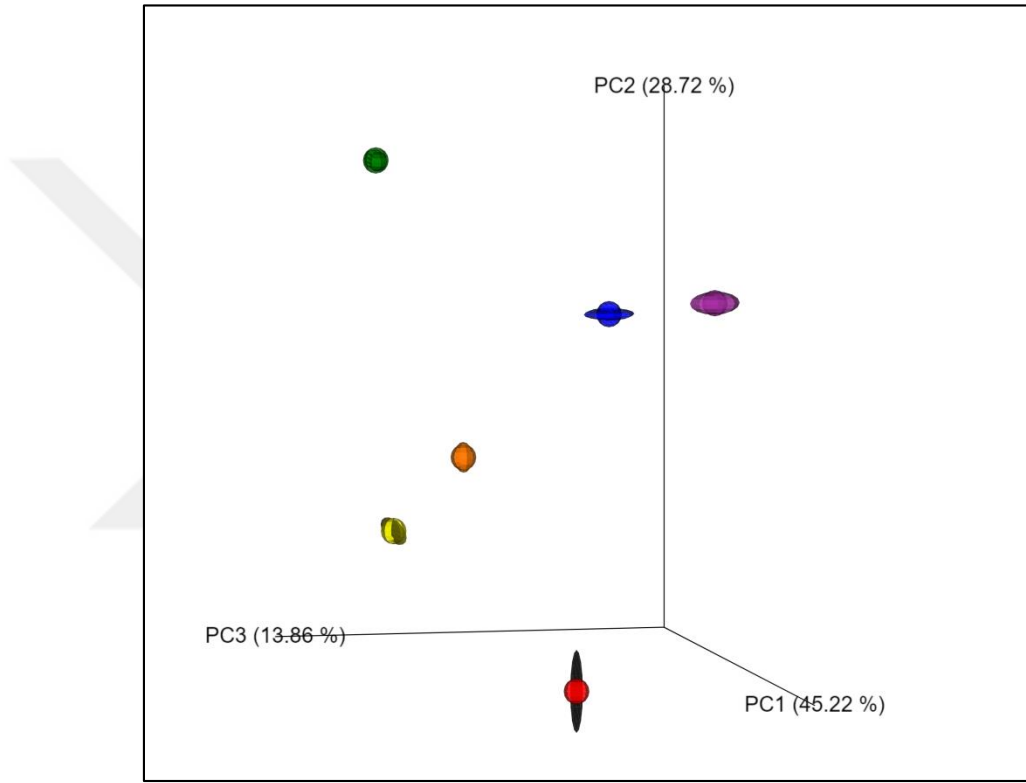
Şekil 5.9 Örneklerdeki Shannon (H') indisi dağılımı

Simpson indisi; T1’de 0,87; T2’de 0,96; T3’de 0,95; T4’de 0,97; T5’de 0,93 ve T6’da 0,97 olarak hesaplanmıştır. Düşük göreceli bolluk gösteren cinsler Simpson indis değerinde çok etkilememektedir. Simpson indislerine göre tüm örneklerdeki değerler yüksek bolluktaki cinsler için çeşitlilik ve topluluklardaki dağılımı açısından dengelidir. Birbiriyle kıyaslandığında T1 örneğindeki çeşitlilik ve cinslerin çeşitlilik dağılımı en düşük olarak belirlenmiştir. Şekil 5.10’da simpson indisi değerlerinin dağılımı grafikte görüntülenmiştir.



Şekil 5.10 Örneklerdeki Simpson 1-D İndisi dağılımı

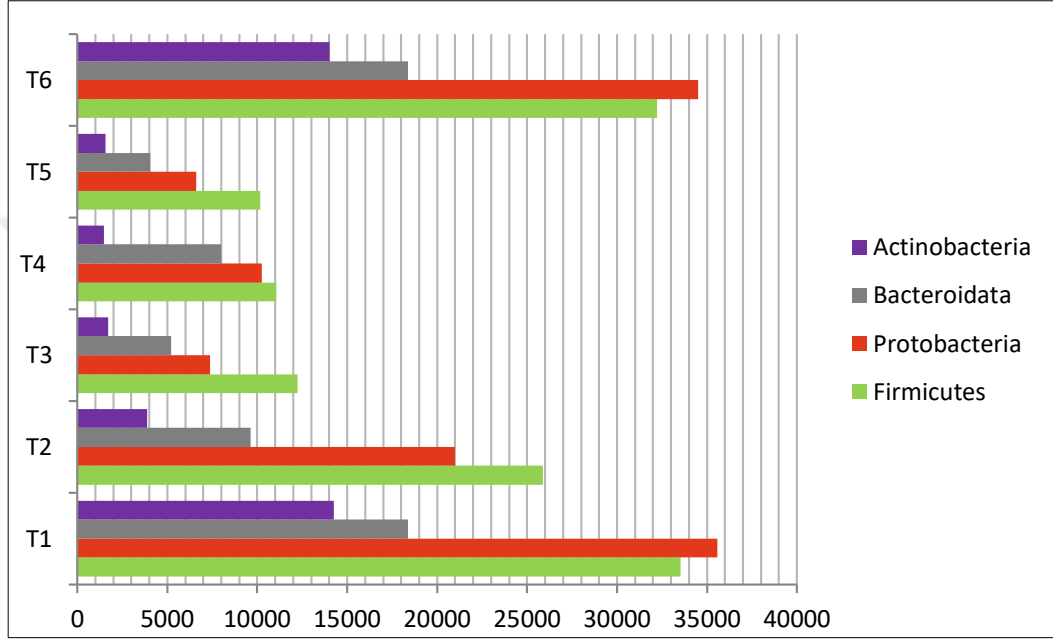
Örnekler arasında benzerlikleri ve farklılıkları göstermek için beta çeşitlilik analizi yapılmıştır. Örnekler arası farklılığı göstermek için PCoA (metrik çok boyutlu ölçeklendirme metodu) Unifrac distance'a göre örneklerde net bir gruplaşma görülmemiştir. Eksenler; PC1 %45,22, PC2 %28,72 PC3 %13,86 olarak hesaplanmıştır. Şekil 5.11'de ağırlıksız Unifrac uzaklık grafiği verilmiştir.



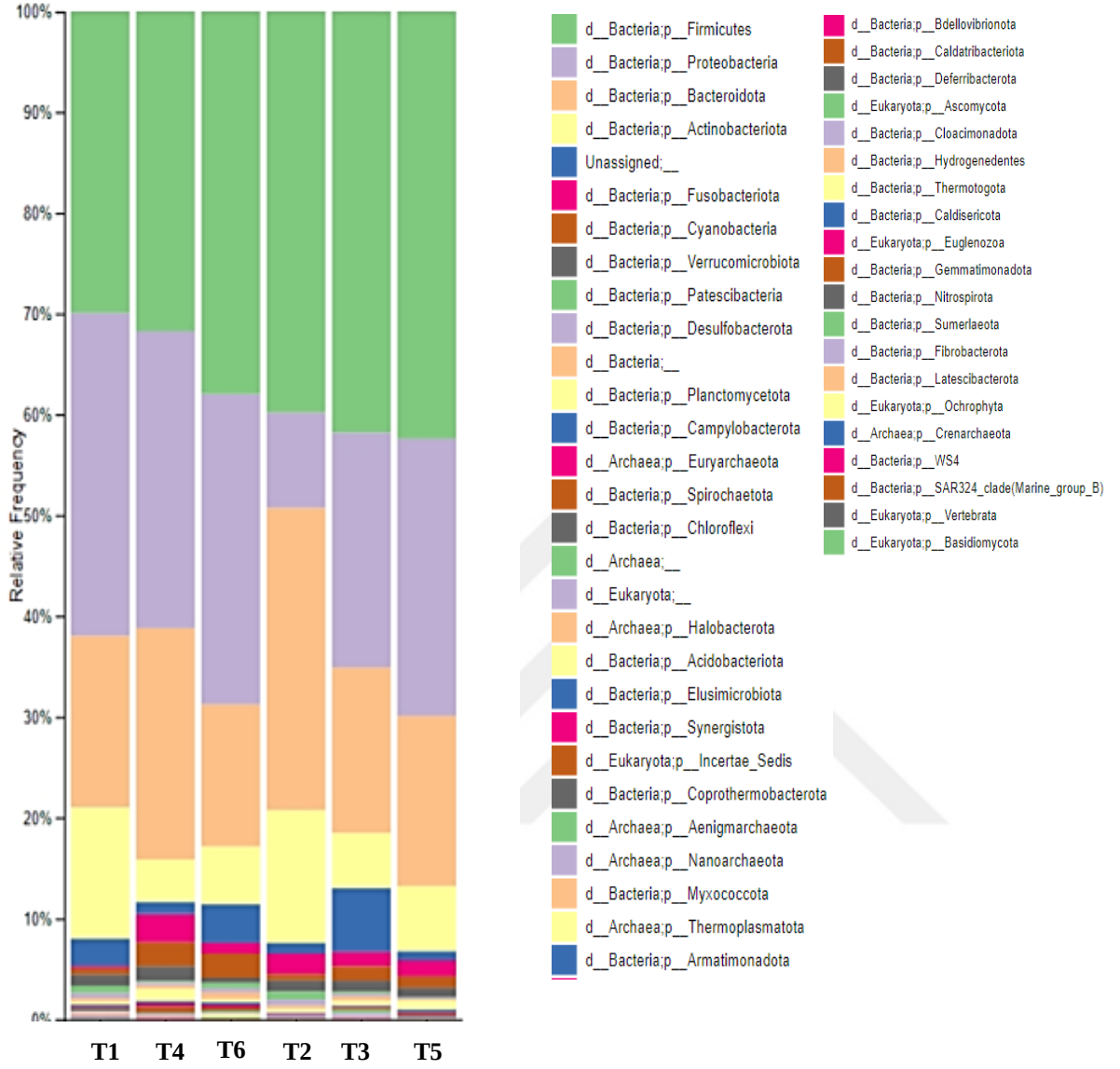
Şekil 5.11 Örneklerdeki ağırlıksız Unifrac uzaklık (Kırmızı T1, mavi T2, turuncu T3, Yeşil T6, Mor T4 ve Sarı T5 örneğini temsil etmektedir.)

Taksonomik analizlerde; tüm örneklerde tanımlanan baskın bakteriyel şubeler Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidota, Actinobacteria'dır. En baskın görülen Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidota ve Actinobacteria şubelerinde sırasıyla T1 Örneğinde 33523, 35584, 18378 ve 14252 okuma; T2 örneğinde 25868, 20993, 9628 ve 3891 okuma; T3 örneğinde 12234, 7381, 5207 ve 1725 okuma; T4 örneğinde 11048, 10257, 7992 ve 1468 okuma, T5 örneğinde 10163, 6597, 4048 ve 1554 okuma; T6 örneğinde 32222, 34500, 18368 ve 14025 okuma gerçekleştirilmiştir. Bu

şubelere ait her örnekteki okuma sayısı Şekil 5.12’de grafikte verilmiştir. Örneklerdeki tanımlanan tüm bakteriler arasında şubelere ait yüzdelik görülme sıklığı bar taxa grafiği şeklinde Şekil 5.13’de verilmiştir. Örneklerdeki her bir şubedeki o şube içerisindeki tanımlanan cinslerin yüzdelik oranlarını gösteren Krona grafikleri EK B’de verilmiştir.



Şekil 5.12 Baskın bakteriyel şubelerin 6 örnek arasındaki sekans dağılımı

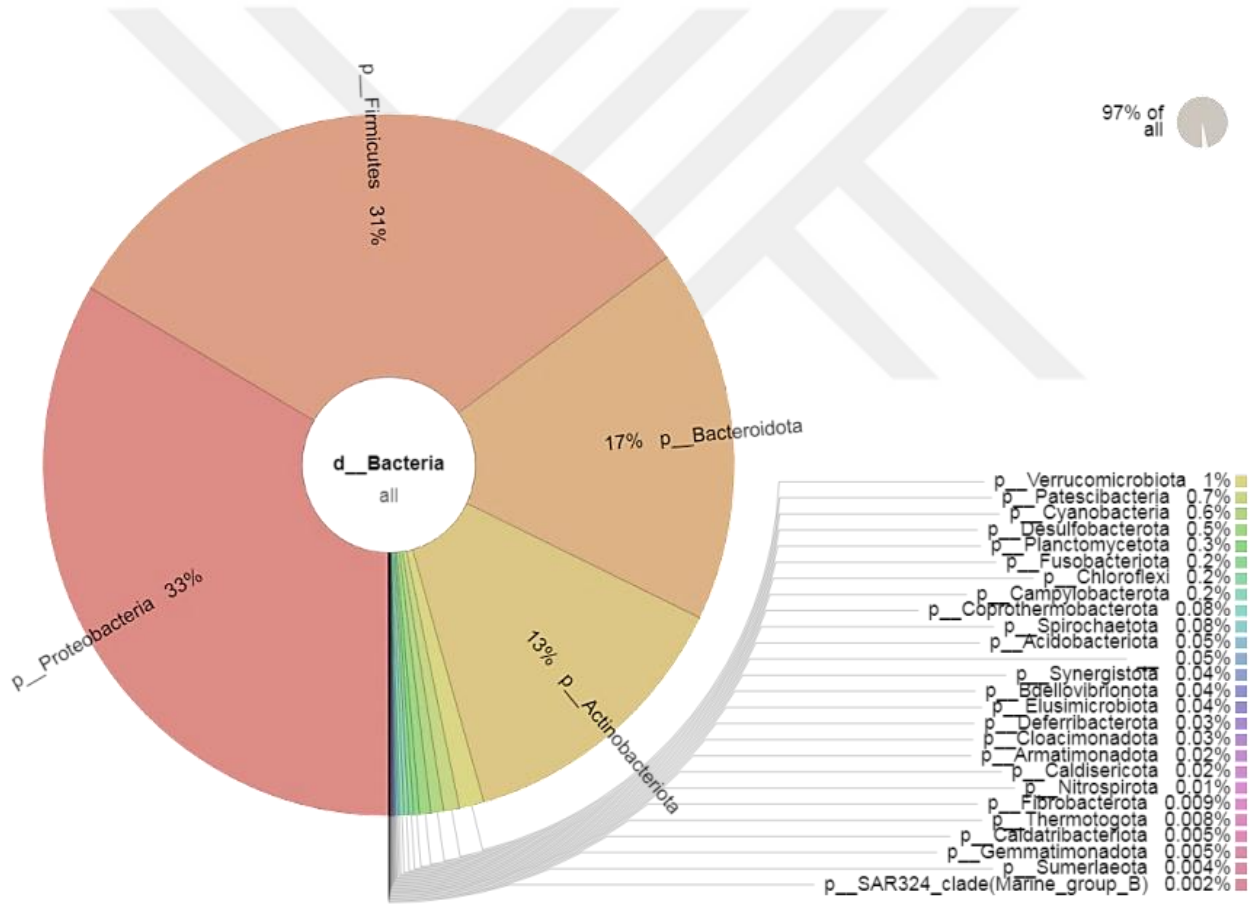


Şekil 5.13 Örneklerde tanımlanan tüm şubelerin yüzdelik dilimlerde görülme sıklığını gösteren bar grafiği

Taksonomik analizlere göre cins düzeyinde T1 örneğinde 100718 okuma ile 495 OTU, T2 örneğinde 159904 okuma ile 540 OTU, T3 örneğinde 31668 okuma ile 280 OTU, T4 örneğinde 34816 okuma ile 337 OTU, T5 örneğinde 23977 okuma ile 226 OTU, T6 örneğinde 68159 okuma ile 338 OTU belirlenmiştir. OTU'lara atanamayan okumalar 'atanmamış' (Unassigned) olarak belirlenmiştir. T1'de 2898, T2'de 1659, T3'de 1996, T4'de 412, T5'de 210 ve T6'da 2595 okuma atanamamıştır.

OTU'ların çeşitliği yüksek olduğundan görece bollukta tüm toplam okumalarda %1'in altında kalan ve düşük yoğunlukta kabul edilen OTU'lar "diğer" olarak tanımlanmıştır. Cins sayısı açısından en düşük çeşitlilik T5 örneğinde en yüksek çeşitlilik T2 örneğinde görülmüştür. Nispi bolluk oranında %1'in üzerinde hesaplanan verilere göre T1 örneğinde 8, T2 örneğinde 18, T3 örneğinde 18, T4 örneğinde 23, T5 örneğinde 14 ve T6 örneğinde 20 cins tanımlanmıştır.

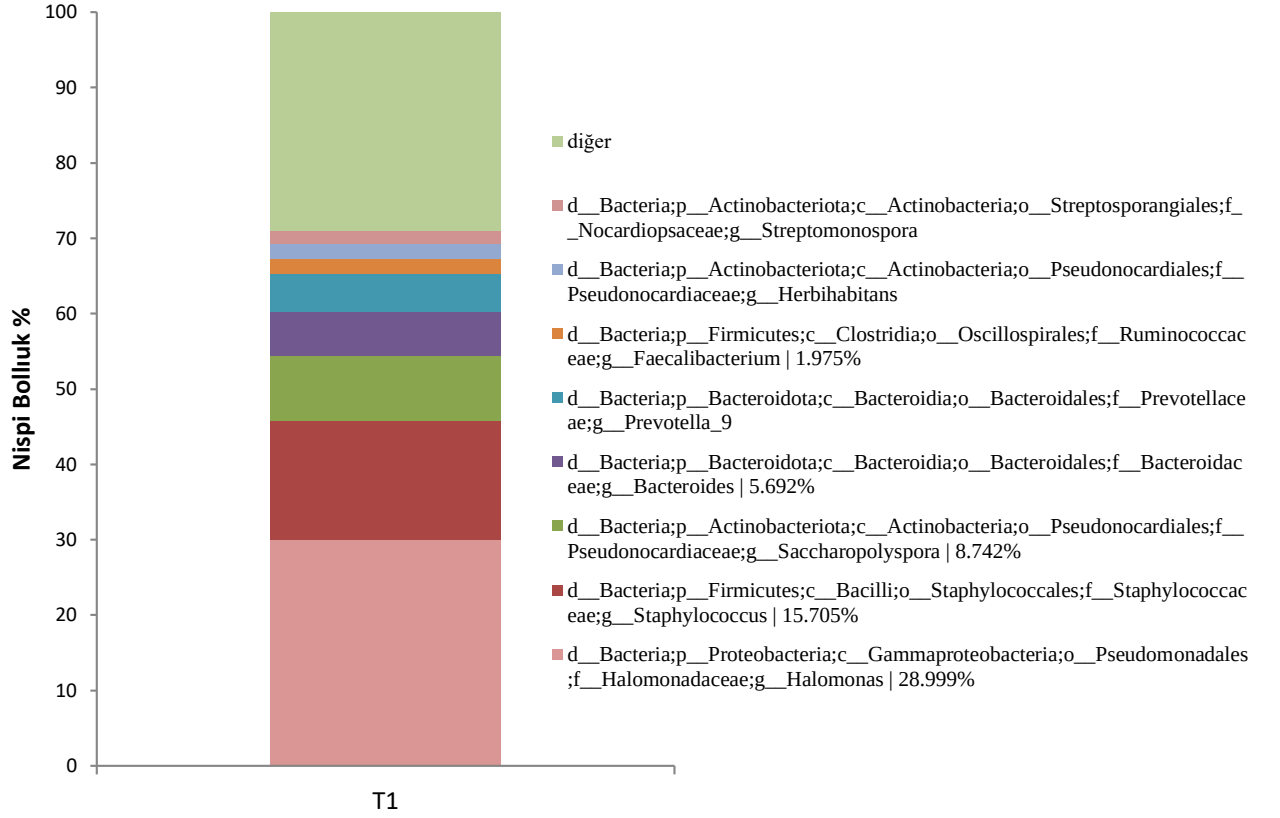
T1 örneğinde 4 baskın şubede toplam 8 baskın bakteri cinsi tanımlanmıştır. En yüksek çeşitlilikteki şubeler %33 Proteobacteria, %31 Firmicutes, %17 Bacteroidota ve %13 Actinobacteria olarak tanımlanmıştır. Baskın olarak görülen şube düzeyindeki OTU lar Krona grafiğiyle Şekil 5.14 de verilmiştir.



Şekil 5.14 Örnek T1 de şube düzeyinde en yaygın görülen bakterilerin Krona Tablosu

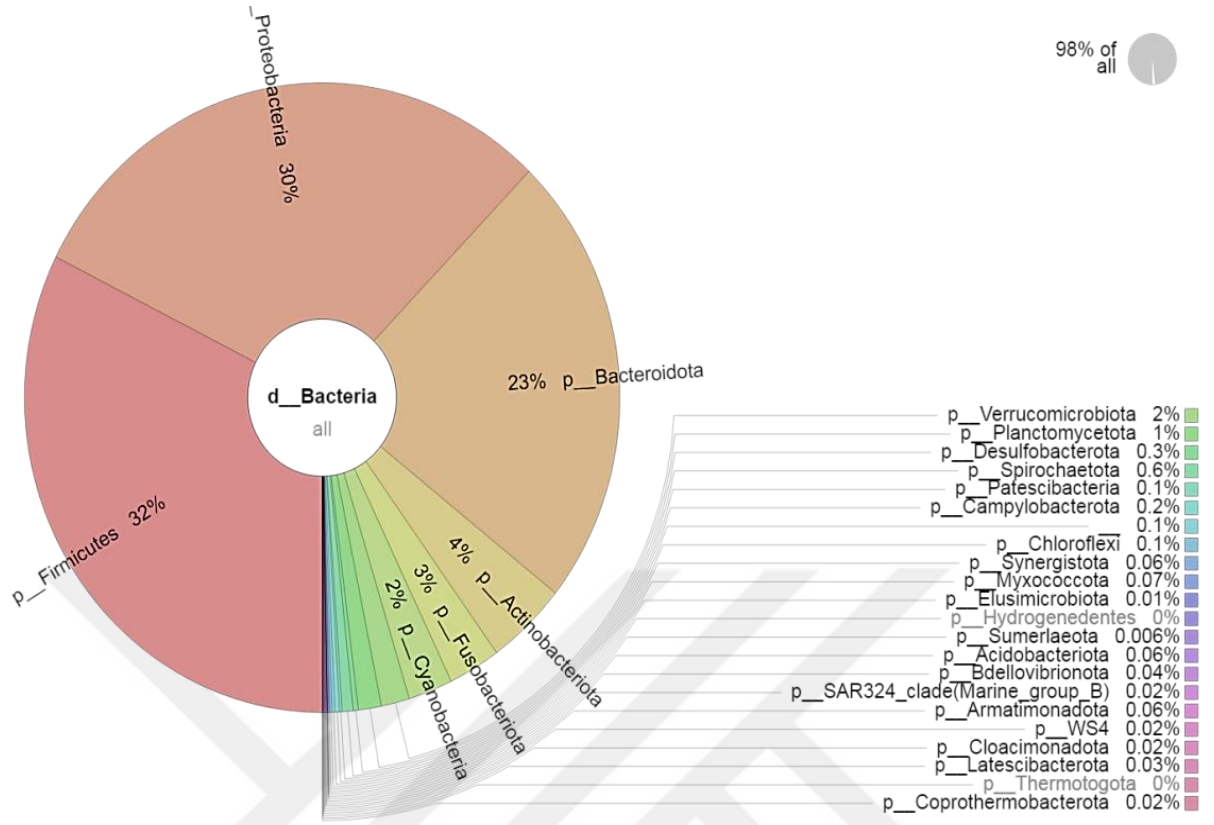
T1 örneğinde tanımlanan tüm bakteriler arasında Proteobacteria şubesinde %29 sıklıkla Halomonas cinsi en yüksek bollukta (high abundance) görülmüştür. Actinobacteria şubesi üyeleri Saccharopolyspora cinsi (%8,74), Herbihabitans (%2) cinsi ve Streptomonospora cinsi (%1,69) olarak; Firmicutes şubesinde Staphylococcus

cinsi (%15,71), *Faecalibacterium* (%1,97) cinsi; Bacteroidota şubesinde *Bacteriodes* cinsi (%5,69) ve *Prevotella* cinsi (5,17) tanımlanmıştır. Cins düzeyinde baskın olarak tanımlanan OTU lar bar taxa grafiğiyle Şekil 5.15 de verilmiştir.



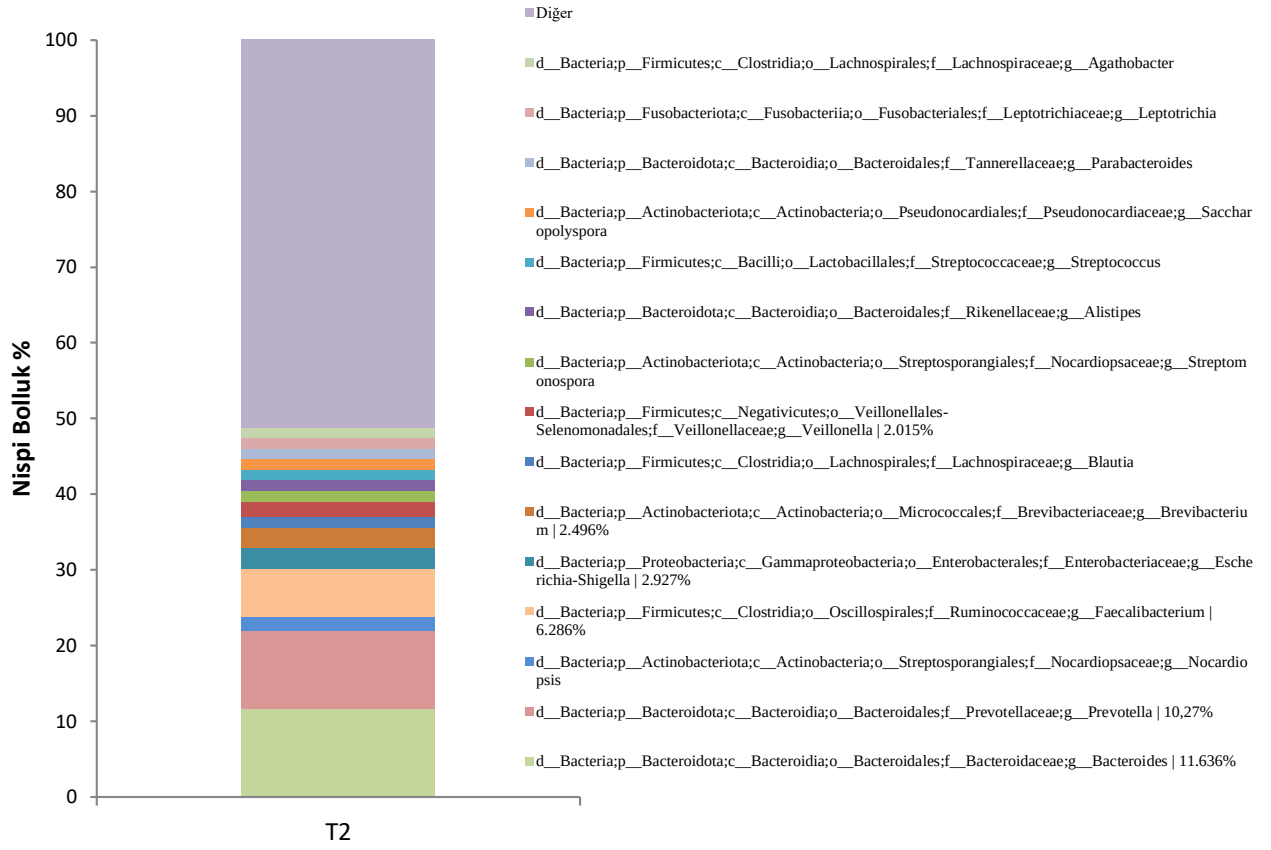
Şekil 5.15 T1 örneğinde%1 ve üzeri sıklıkla görülen bakteri cinsleri

T2 Örneğinde 4 baskın şubede toplam 18 baskın bakteri cinsi tanımlanmıştır. En yüksek çeşitlilikteki şubeler %40 Firmicutes, %31 Bacteroidota, %13 Actinobacteria ve %9 ile Proteobacteria olarak tanımlanmıştır. Baskın olarak görülen şube düzeyindeki OTU lar Krona grafiğiyle Şekil 5.16 da verilmiştir.

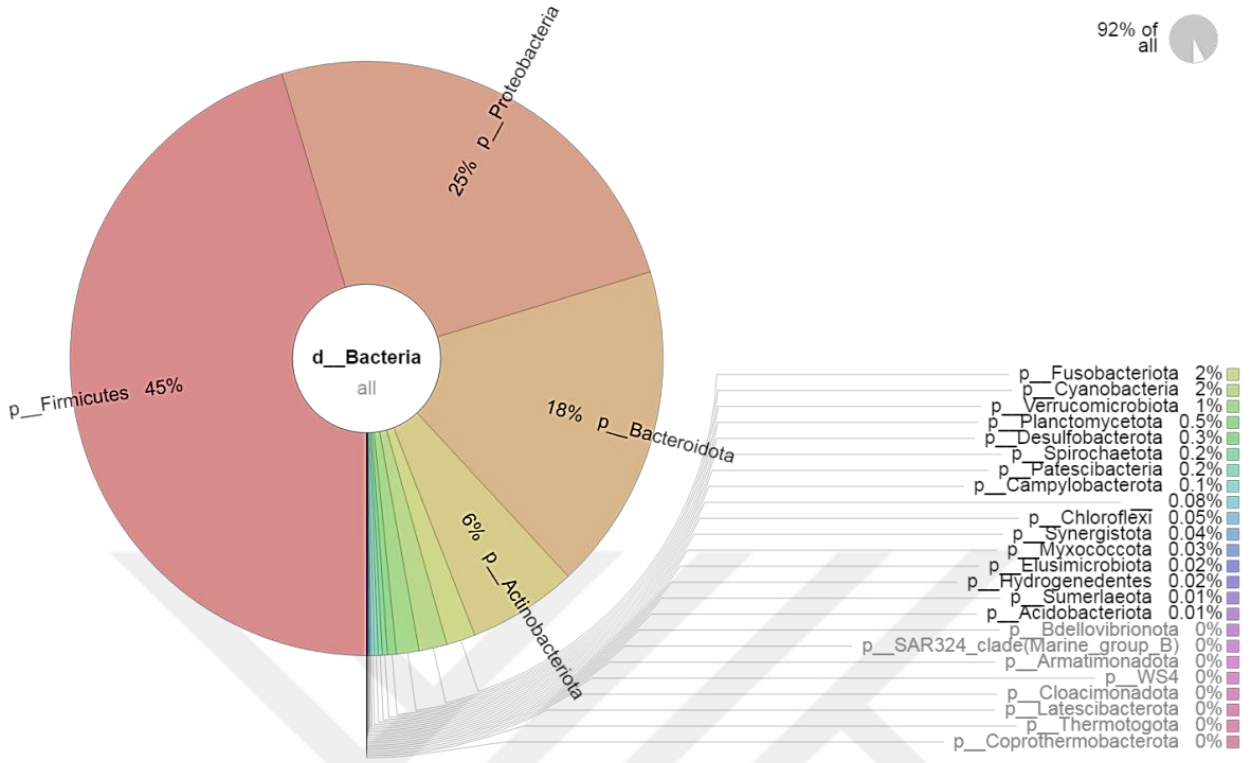


Şekil 5.16 Örnek T2 de şube düzeyinde en yaygın görülen bakterilerin Krona Tablosu

T2 Örneğinde tanımlanan tüm bakteriler arasında Bacteroidota şubesinde % 11,64 sıklıkla Bacteroides cinsi en yüksek bollukta tanımlanmıştır. Bu şubede Prevotella cinsi (% 10,27), Alistipes cinsi (%1,39), Parabacteroides cinsi (%1,16); Firmicutes şubesinde Faecalibacterium cinsi (%6,29), Lachnospira cinsi (%2,47), Veillonella cinsi (% 2,0), Agathobacter cinsi (%1,15), Blautia cinsi (%1,58); Actinobacteria şubesinde Brevibacterium (%2,5), Saccharopolyspora (%1,19) cinsi, Streptomonospora (%1,43) cinsi, Nocardiosis (%1,89) cinsi; Proteobacteria şubesinde E. Shigella (%2,93) cinsi üyeleri tanımlanmıştır. Cins düzeyinde baskın olarak tanımlanan OTU lar bar taxa grafiğiyle Şekil 5.17 de verilmiştir.

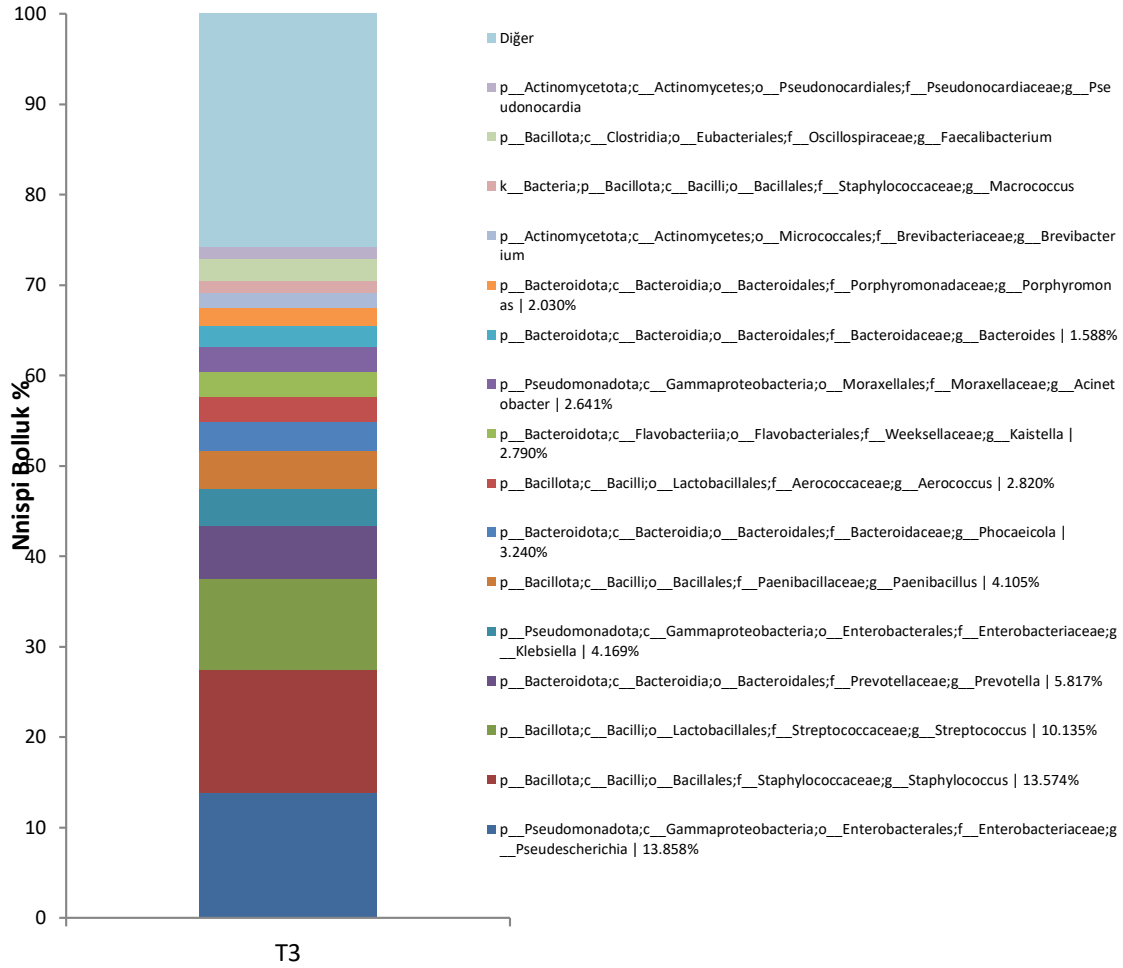


T3 örneğinde 4 baskın şubede toplam 18 baskın bakteri cinsi tanımlanmıştır. En yüksek çeşitlilikteki şubeler %45 Firmicutes, %25 Proteobacteria, %18 Bacteroidota ve %6 Actinobacteria olarak tanımlanmıştır. Baskın olarak görülen şube düzeyindeki OTU lar Krona grafiğiyle Şekil 5.18 de verilmiştir.



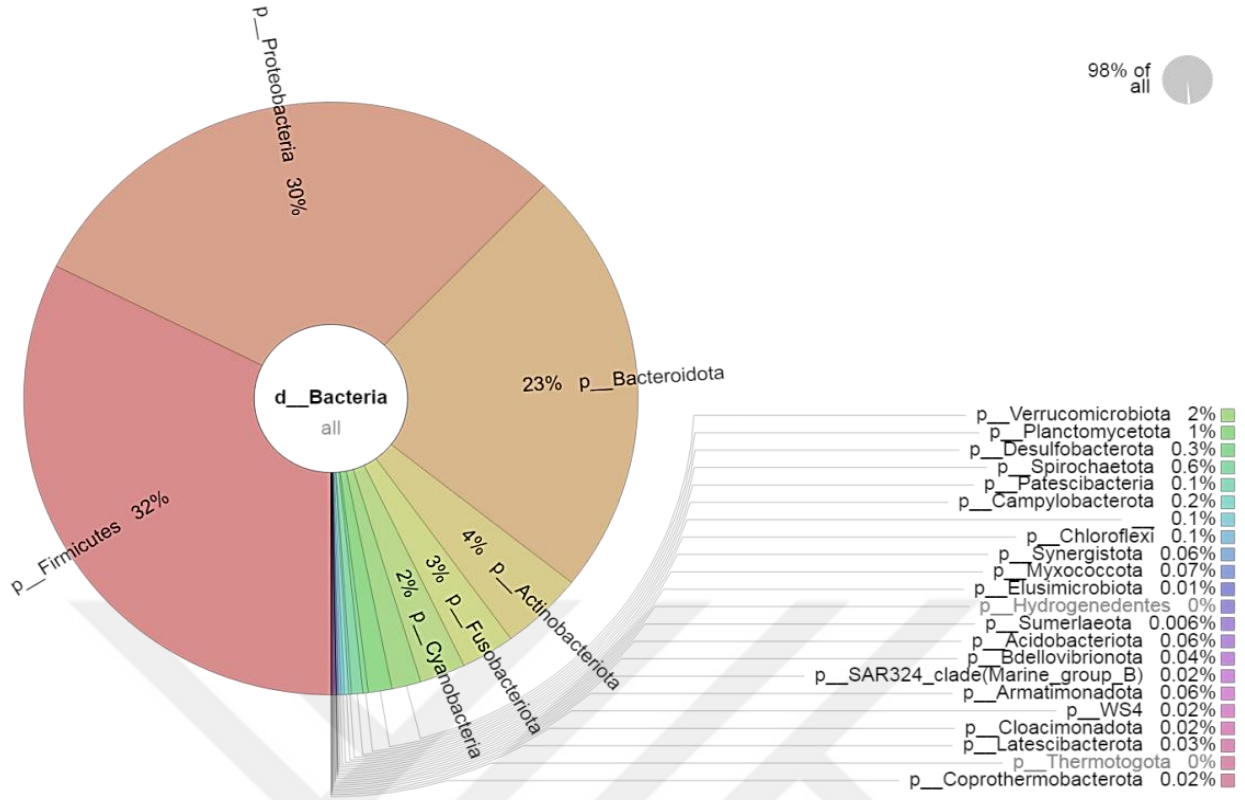
Şekil 5.18 Örnek T3 de şube düzeyinde en yaygın görülen bakterilerin Krona Tablosu

T3 Örneğinde tanımlanan tüm bakteriler arasında Proteobacteria şubesinde % 13,86 sıklıkla *Pseudoescherichia* en yüksek bollukta tanımlanmıştır. Bu şubede *Klebsiella* (%4,16) cinsi, *Acinetobacter* (%2,64) cinsi ve *Stenotrophomonas* (% 1) cinsi; Firmicutes şubesinde *Staphylococcus* (%13,57) cinsi, *Streptococcus* (%10,13) cinsi, *Paenibacillus* cinsi (% 4,1), *Aerococcus* cinsi (%2,82), *Macrococcus* cinsi (%1,38), *Faecalibacterium* (2,37); Actinobacteria şubesinde *Brevibacterium* (%1,6) ve *Pseudonocardia* (%1,8) ; Bacteroidata şubesinde *Prevotella* (%5,81), *Porphyromonas* (%2,03), *Phocaeicola* (%3,24) ve *Bacteroides* (%1,58) cinsi üyeleri tanımlanmıştır. Cins düzeyinde baskın olarak tanımlanan OTU lar bar taxa grafiğiyle Şekil 5.19 de verilmiştir.



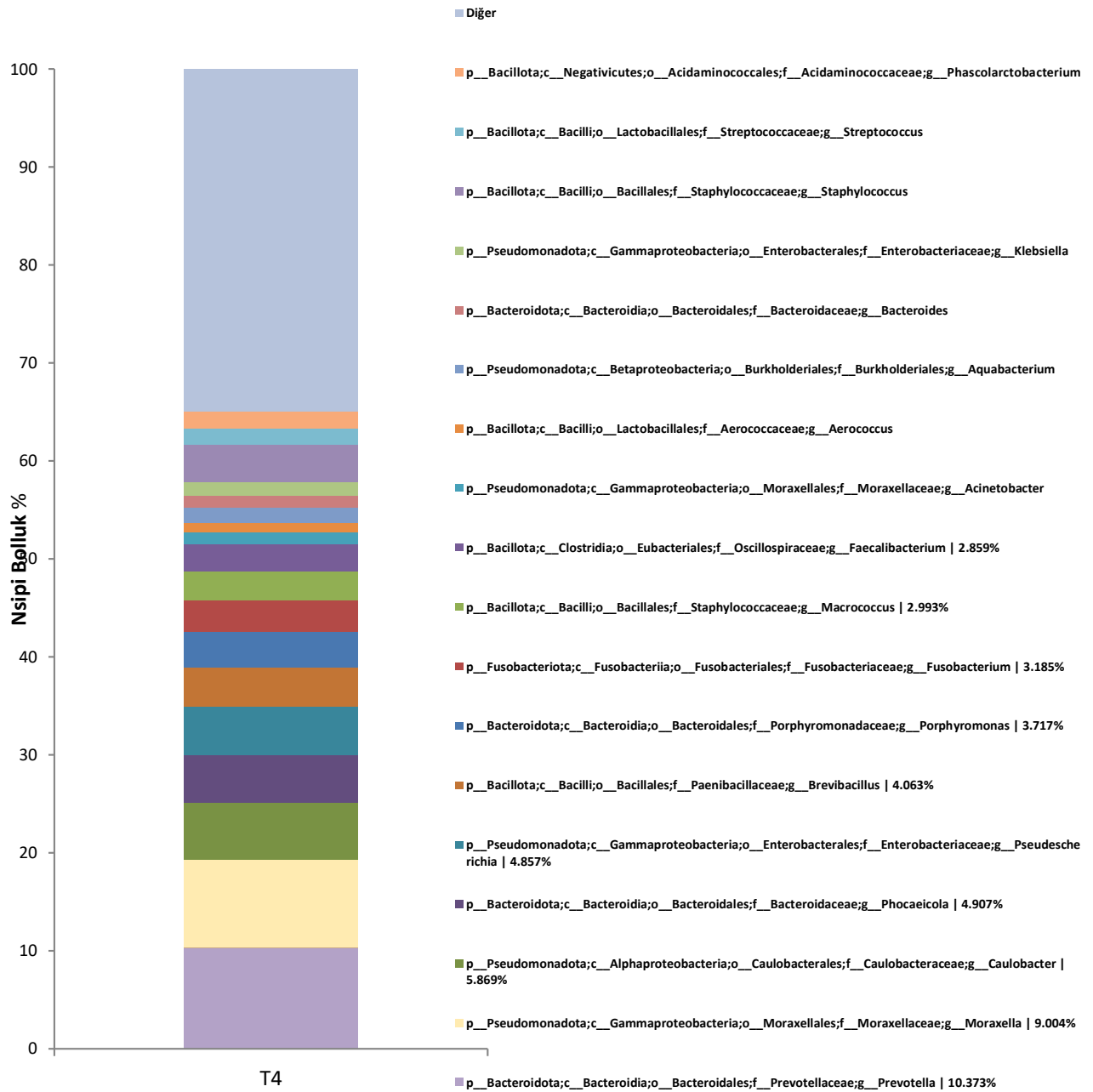
Şekil 5.19 T3 örneğinde %1 ve üzeri sıklıkla görülen bakteri cinsleri

T4 Örneğinde 4 baskın şubede toplam 23 baskın bakteri cinsi tanımlanmıştır. En yüksek nispi bollukta görülen şubeler %30 Proteobacteria, %32 Firmicutes, %23 Bacteroidota ve %4 Actinobacteria olarak tanımlanmıştır. Şekil 5.20'de Şube düzeyinde tanımlanan bakterilerin yüzdelik dilimler şeklinde Krona tablosu verilmiştir.



Şekil 5.20 Örnek T4 de şube düzeyinde en yaygın görülen bakterilerin Krona Tablosu

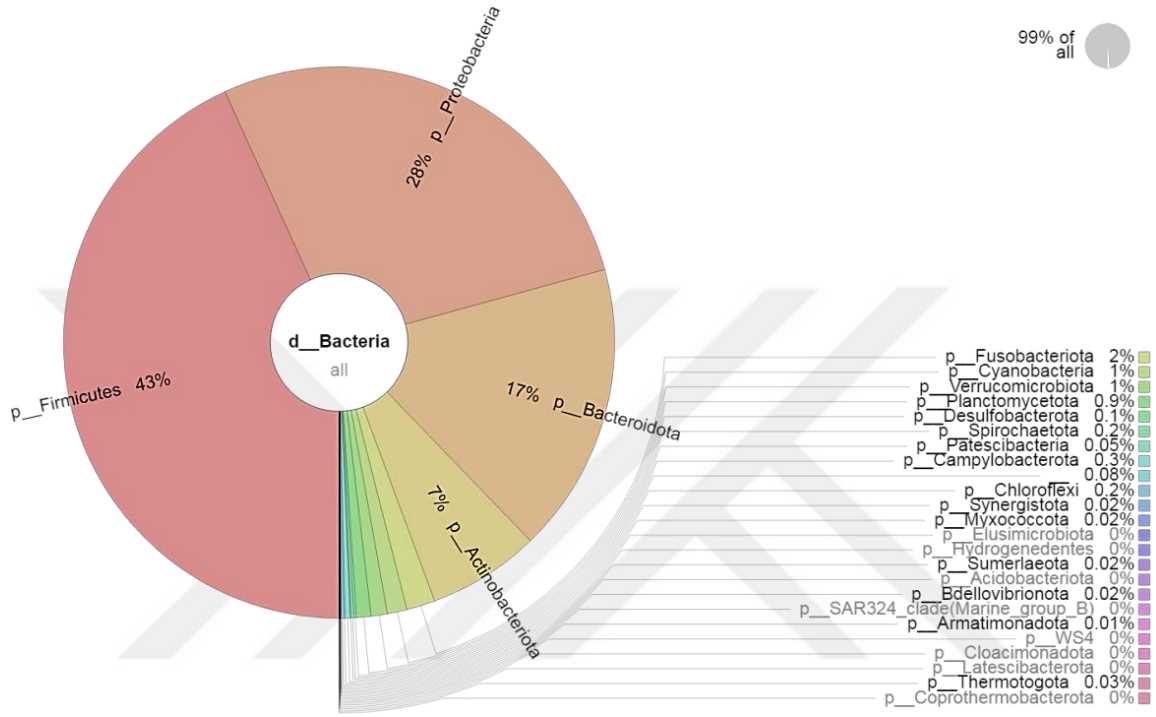
T4 örneğinde tanımlanan tüm bakteriler arasında Bacteroidota şubesinde % 10,3 sıklıkla Prevotella cinsi en yüksek bollukta tanımlanmıştır. Bu şubede Porphyromonas (%3,71), Phocaeicola (%4,9) ve Bacteroides (%1,4) cinsi, Firmicutes şubesinde Staphylococcus (%3,8) cinsi, Streptococcus (%1,66) cinsi, Aerococcus cinsi (%1,02), Macroccoccus cinsi (%2,99), Faecalibacterium (2,85), Brevibacillus (%4,0) cinsi, Dialister (%1,04) cinsi, Lactiplantibacillus (%1,09) cinsi ve Phascolabacterium (%1,74) cinsi; Actinobacteria şubesinde Acidipropionibacterium (%1,19) cinsi üyeleri tanımlanmıştır. Proteobacteria şubesinde Pseudoescherichia (%4,85), Aquabacterium (%1,54), Moraxella (%9), Caukobacter (%5,86), Acinetobacter (%1,14), Klebsiella (%1,41), Sphingomonas (%1,31) ve Methyloversatilis (%1,74) cinsi tanımlanmıştır. Tüm bakteriler arasında Fusobacteriota şubesi düşük bollukta tanımlanırken bu şube üyesi Fusobacterium %3,18 oranla cinsler arasında yüksek bollukta görülmüştür. Cins düzeyinde baskın olarak tanımlanan OTU lar bar taxa grafiğiyle Şekil 5.21 de verilmiştir.



Şekil 5.21 T4 örneğinde%1 ve üzeri sıklıkla görülen bakteri cinsleri

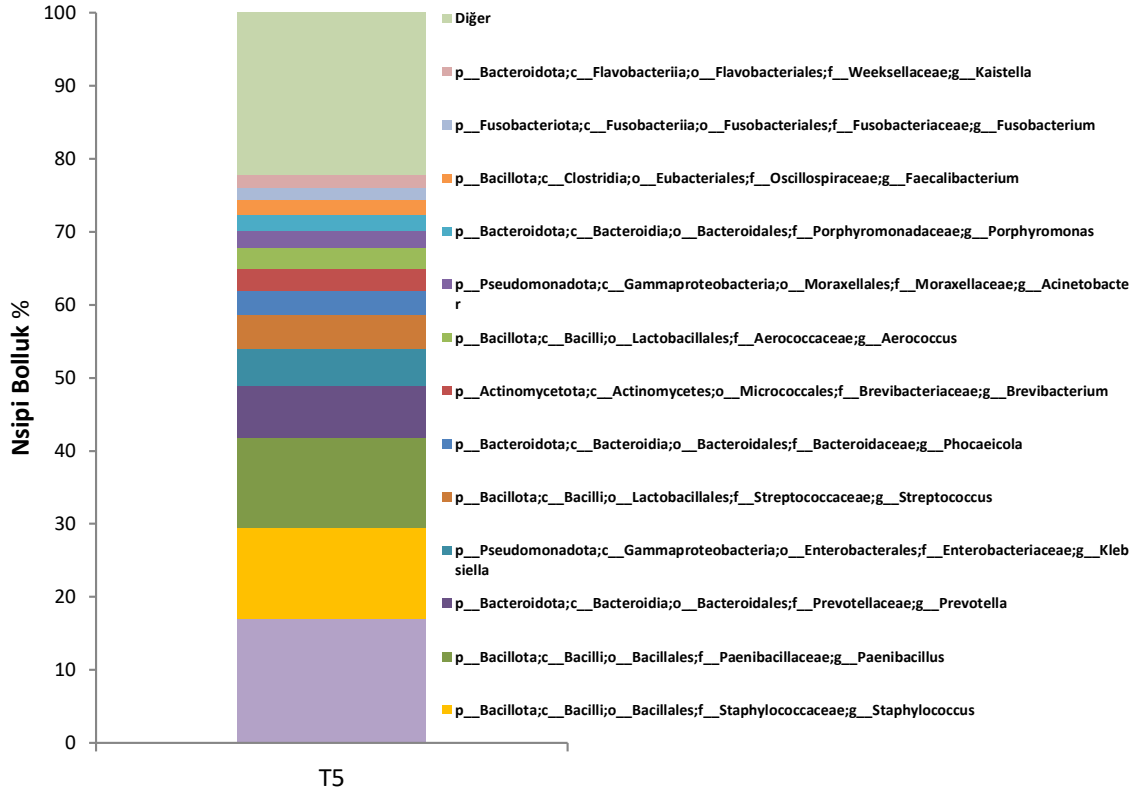
T5 örneğinde en yüksek çeşitlilikteki şubeler %44 Firmicutes, %29 Proteobacteria, %17 Bacteroidata ve %7 Actinobacteria olarak tanımlanmıştır.

T5 örneğinde 4 baskın şubede toplam 14 baskın bakteri cinsi tanımlanmıştır. En yüksek nispi bollukta görülen şubeler %30 Proteobacteria, %32 Firmicutes, %23 Bacteroidota ve %4 Actinobacteria olarak tanımlanmıştır. Şekil 5.22’de Şube düzeyinde tanımlanan bakterilerin yüzdelik dilimler şeklinde Krona tablosu verilmiştir.



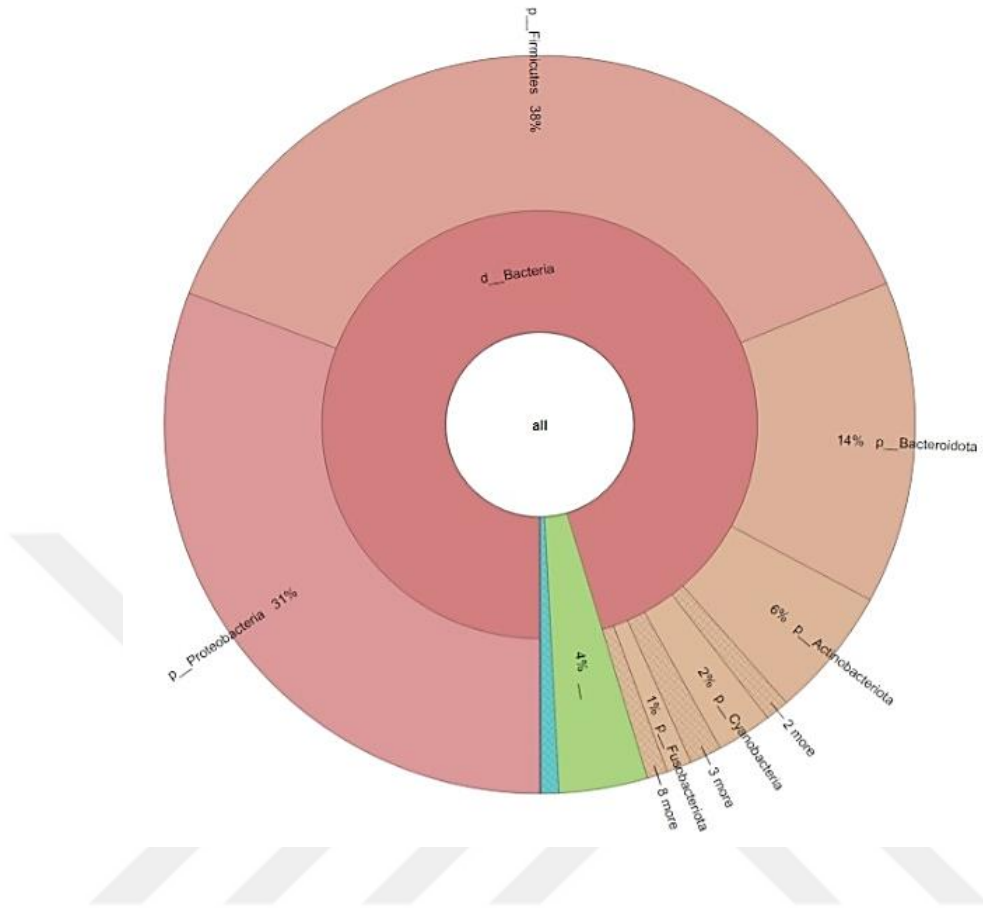
Şekil 5.22 Örnek T5 de şube düzeyinde en yaygın görülen bakterilerin Krona Tablosu

T5 örneğinde tüm bakteriler arasında tanımlanan Firmicutes şubesinde Paenibacillus (%12,4), Streptococcus (%4,8), Staphylococcus (%12,48), Aerococcus (%2,84), Faecalibacterium (%1,97); Proteobacteria şubesinde Klebsiella (%4,99), Pseudoescherichia (%17,00), Acinetobacter (%2,43); Bacteroidata şubesinde, Porphyromonas (%2,2), Phocaeicola (%3,28) Prevotella (%7,02) ve Actinobacteria şubesinde Brevibacterium (%2,98) olarak görülmüştür. Fusobacteriota şubesinde Fusobacterium (%1,7) olarak tanımlanmıştır. Cins düzeyinde baskın olarak tanımlanan OTU lar bar taxa grafiğiyle Şekil 5.23 de verilmiştir.



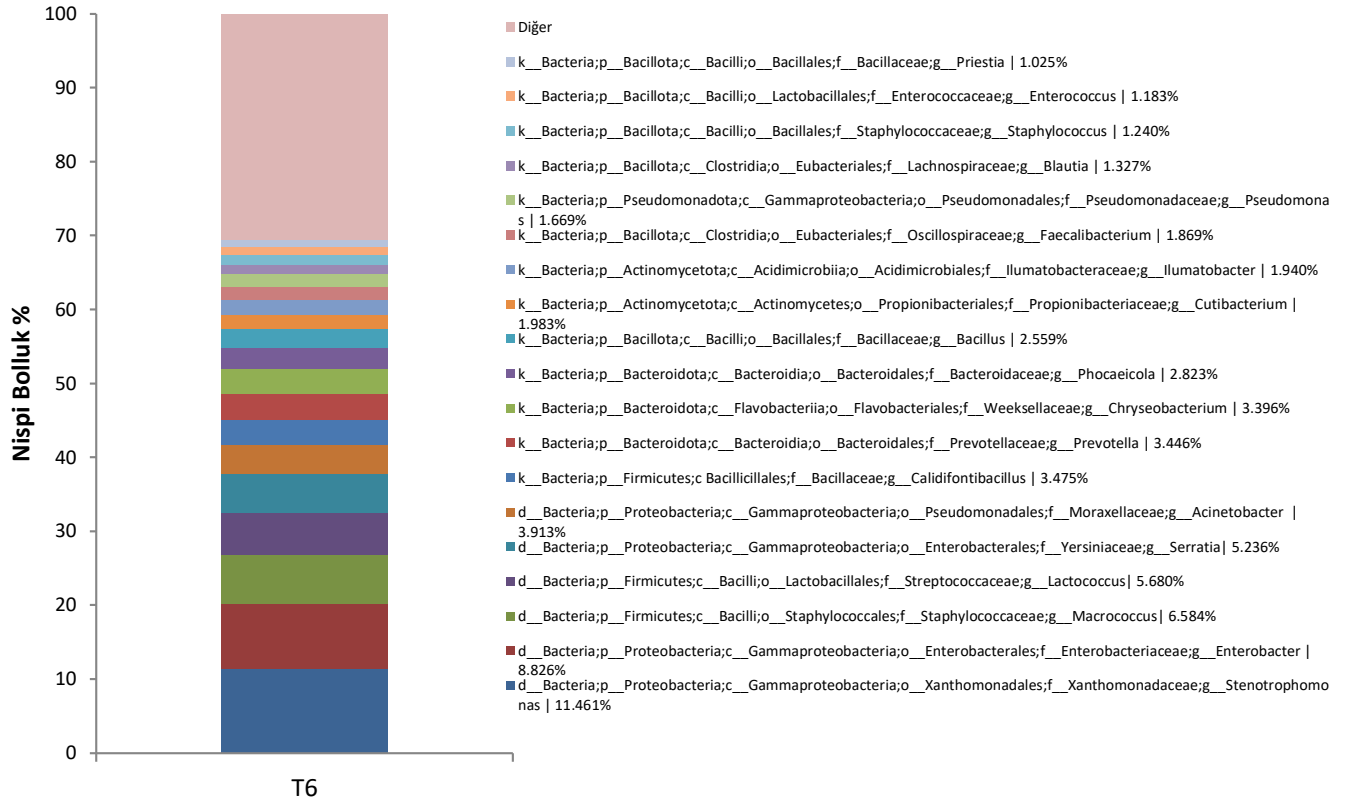
Şekil 5.23 T5 örneğinde %1 ve üzeri sıklıkla görülen bakteri cinsleri

T6 örneğinde 4 baskın şubede toplam 20 baskın bakteri cinsi tanımlanmıştır. En yüksek nispi bollukta görülen şubeler %38 Firmicutes, %31 Proteobacteria, %14 Bacteroidota ve %6 Actinobacteria olarak tanımlanmıştır. Şekil 5.24’de şube düzeyinde tanımlanan bakterilerin yüzdelik dilimler şeklinde Krona tablosu verilmiştir.



Şekil 5.24 T6 Örneğinde bakteriyel toplulukta en yüksek bollukta temsil edilen şubeler

T6 örneğinde tüm bakteriler arasında tanımlanan Proteobacteria şubesinde *Stenotrophomonas* (%11,46) *Acinetobacter* (%3,91) *Enterobacter* (%8,82) *Serratia* (%5,23), *Pseudomonas* (%1,66), *Faecalibacterium* (%1,97); Bacteroidata şubesinde *Bacteroides* (%1), *Chryseobacterium* (%3,39), *Phocaeicola* (%2,82), *Prevotella* (%3,44); Firmicutes şubesinde *Macrococcus* (%6,58), *Lactococcus* (%5,68), *Bacillus* (%2,55), *Balutia* (%1,32), *Calidifontibacillus* (%3,47), *Staphylococcus* (%1,23), *Enterococcus* (%1,18), *Priestia* (%1,02); Actinobacteria şubesinde *Cutibacterium* (%1,98), *Illumatobacter* (%1,93) olarak görülmüştür. Cins düzeyinde baskın olarak tanımlanan OTU lar bar grafiğiyle Şekil 5.18 de verilmiştir.



Şekil 5.25 T6 örneğinde %1 ve üzeri sıklıkla görülen bakteri cinsleri

5. TARTIŞMA

Yazma eserlerin organik ve inorganik unsurları mikrobiyal bozulma tehdidi altındadır. Literatüre bakıldığında farklı tekniklerle tanımlanan bakteri cins ve türlerinin çeşitliliğinin önemli derecede farklılaşması (bkz: Tablo 2.1 ve Tablo 2.2), yazma eserlerin ya da nadir matbu eserlerin önemli bakteri rezervuarı olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada bozulmalara neden olan bakteri gruplarının tanımlanması için 2 farklı yöntem kullanılmıştır. Çalışmalar 2 farklı koleksiyondan 6 adet yazma eserde görsel olarak yoğun mikrobiyal tahribat görülen alanlardan alınan örnekler üzerinden yürütülmüştür. Kültür temelli tekniklerle izole edilen bakteri kolonileri 16S rRNA Amplikon Dizileme ile tür düzeyinde tanımlanmıştır. Metagenomik analizlerde 16S rRNA amplifikasyonu ve Illumina YND teknolojisiyle taksonomik çeşitlilik analizleri gerçekleştirilmiştir.

Kültür temelli yöntemlerle 16 bakteri izole edilmiş ve 16S rRNA Amplikon Sanger dizileme ile tür düzeyinde 9 farklı bakteri tanımlanmıştır. Tanımlamalarla; *Niallia circulans* (4 izolat), *Micrococcus luteus* (2 izolat), *Priestia Megaterium* (3 izolat), *Microbacterium foliorum*, *Bacillus haynesii*, *Ornithinibacillus scarpharcae* (2 izolat), *Psychrobacter pulmonis*, *Neobacillus niacini*, *Fredinandcohnia humi* (*Bacillus humi*) türlerine ait canlı bakterilerin varlığı tespit edilmiştir. *Niallia circulans* (*Basionym Bacillus circulans*), *Priestia megaterium* (*Basionym Bacillus megaterium*), *Fredinandcohnia humi* (*Basionym Bacillus humi*), *Bacillus* cinsi ile ilişkili olarak değerlendirilmektedir. Önceki çalışmalarda da farklı *Bacillus* türlerinin kağıt esaslı materyallerde sık görülmesi *Bacillus* türlerinin selülitik aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir (Okpalanozie v.d., 2018). *B. Circulans*'ın toprakta, kanalizasyonda ve gıdalarda bulunduğu bildirilmiştir (Russo v.d., 2021). *M. foliorum* çoğunlukla toprak, bitki, su ve süt ürünlerinden izole edilen bir bakteri türüdür (Russell v.d., 2019). Farklı *Microbacterium* türleri kitaplar üzerinden izole edilmiş (Krakova v.d., 2012;Gutarowska, 2016), parşömen ve kağıt yazma eserlerde YND analizleriyle tanımlanmıştır (Krakova v.d., 2017; Migliore v.d., 2017).

Micrococcus luteus kağıt esaslı materyallerden kültür temelli tekniklerle tür bazında izole edilmiştir (Carlo v.d., 2016; Karakasidou v.d., 2018). Arşiv havasından alınan örneklerde *M. luteus* baskın tür olarak tanımlanmıştır (Branysova v.d., 2024).

Bu tez çalışmasında Illumina ‘Sentezleyerek Dizileme’ teknolojisi ile gerçekleştirilen metagenomik analizlerde, kültüre dayalı teknikler kullanılarak gerçekleştirilen moleküler analizlere kıyasla daha yüksek biyoçeşitlilik görülmüştür. Diziler cins düzeyinde tanımlanırken, bazı dizilerin tür düzeyinde tanımlanabilmesi mümkün olmuştur. Tür düzeyinde tanımlanabilen diziler baskın cinsler değerlendirilirken bu bölümde verilmiştir. T1-T6 örneklerinde cins düzeyinde sırasıyla 495, 540, 280, 337, 226, 338 OTU tanımlanmıştır. Tarihleri 13-18 yüzyıl arasında değişen kitapların üretim aşamalarının, farklı coğrafyalara taşınmasının ve çok kişi tarafından ele alınmasının, tanımlanan bakteriyal OTUların çeşitliliğin ve yoğunluğunun yüksek olmasında etkili olduğu düşünülmektedir. 2 farklı koleksiyonun bulunduğu ortam şartlarının, bakteriyal çeşitliliği üzerindeki etkisinin belirlenmesi için yazma eserlerde tanımlanan baskın bakteri cinsleri (Nispi göreceli bolluk oranı %1’in üzerinde) karşılaştırılmıştır. Baskın cins düzeyinde 6 farklı yazma eserde benzer biyoçeşitlilik görülmesinin yanısıra farklılıkların da mevcut olduğu görülmüştür.

T1 örneği, Chao-1 değerinin yüksek çıkmasına rağmen çeşitlilik ve zenginlik açısından (Simpson 1-D, Shannon) en düşük değerlere sahiptir. Alfa çeşitlilik indisleri dizilerin baskın cinslerde kümелendiğini göstermektedir. T1 örneğinde diğer örneklerden farklı olarak *Halomonas* cinsi baskın olarak tanımlanmıştır. Bu cinse ait üyeler halofilik türlerdir ve gelişmek için tuzlu ortama ihtiyaç duymaktadır. Daha önce parşömen yazma eserlerin ve derinin bozulmasıyla ilişkilendirilmiştir. Bu örnekte *Halomonas* cinsinin, yazma eserin cilt kapaklarından kağıda bulaşmış olduğu düşünülmektedir. Eserde örnekleme için cilt kapaklarına yakın olan alandan yapılmış olması nedeniyle *Halomonas* cinsinin olası bulaşma kaynağı cilt kapaklarında kullanılan deridir. Derinin üretimi esnasında gerçekleştirilen tuzlama işlemi sonucunda oluşan tuzlu ortamın, *Halomonas* türlerinin kolajen liflerinde gelişmesine neden olduğu ve kağıt üzerinde de taşındığı düşünülmüştür. Aynı eserde toprakta bulunan *Herbihabitans* türlerinin görülmesi ve eserde görsel incelemelerde kapak üzerindeki

toprak benzeri materyalin bulunması toprak kontaminasyonu olabileceği yönündeki görüşleri arttırmaktadır.

Her örnekte yüksek bollukta tanımlanan *Prevotella*; T1, T2, T4, T5 ve T6 örneğinde farklı oranlarla tanımlanan *Faecalibacterium* (T3'te %1'in altında kalmıştır); T1, T2, T3, T4, T6'da tanımlanan *Bacteroides* (T5'te göreceli bolluk oranı %1'in altında kalmıştır) ve T3, T4, T5'te tanımlanan *Porphyromonas* cinsi üyeleri bağırsak mikrobiyotasında bulunan bakteri cinsleri arasında yer almaktadır (Yılmaz ve Karlı, 2023). Bu çalışmada tanımlanan T2'de *Alistipes*, *Parabacteroides* ve *Lachnospira*; T2 ve T6'da *Balutia*; T4'te *Phascolactobacterium*; T3, T4, T5 ve T6'da *Phocaeicola* ve *Pseudoescherichia* cinsleri de bağırsak florasında ve bazı hayvanların sindirim sistemlerinde baskın olarak tanımlanmıştır. Pavlovic v.d (2023) tarafından *Prevotella* ve *Porphyromonas* cinsi üyeleri Üçüncü Nesil Dizileme teknolojisiyle tarihi kitaplar üzerinde tanımlanmıştır. T6'da *Lactococcus* cinsine ait dizilerin çoğunluğu *Lactococcus lactis* alt türü *cremoris* olarak tanımlanmıştır. Memelilerin sindirim sistemlerinden izole edilmiştir. Farklı *Lactococcus* türleri Pinar v.d. (2020b) tarafından tarihi kağıt yüzeyinde YND ile tanımlanmıştır.

Bağırsak mikrobiyotasındaki bakteriler kompleks selülaazlarla, bitkilerdeki selülozu parçalayarak basit şekerlere dönüştürebilmektedir. Selülaaz aktivitesi yüksek olan bu bakterilerin kağıttaki selülozun degradasyonuna neden olabileceğini ve tahribatlarla ilişkilendirilebileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada kağıtta yüksek çeşitlilikte ve bollukta bulunmaları, yazma eserlerin bu bakterilere yoğun bir şekilde maruz kaldığını ve kağıdı gelişim ortamı olarak kullanabildiklerini göstermektedir. Eserlerdeki tahribatlı alanlar ile (baş ve etek kısmında kağıt kısımların kopması ve parçalanması, pamuklaşma) ortak görülen bakteriyel bağırsak florası korelasyon göstermektedir. Bu bakteri cinslerinin su kaynaklarında, toprakta, bitkilerde ve solucan gibi hayvanların dışkılarında da bulunması nedeniyle kontaminasyon bir çok kaynaktan gerçekleşmiş olabilir. Fare bağırsak florası bakteriyel topluluk açısından insan bağırsak florası ile benzerlik göstermektedir (Wang v.d., 2016). Eserlerde görülen kemirgen tahribatları bu türlerin fare artıklarından bulaşmış olabileceğini de düşündürmüştür. Görsel olarak tahribatlı alanlarda su lekelerinin varlığı, yazma eserlerde sadece lokal olarak (tahribat görülen alanlarda) şebeke suyu kaynaklı insan fekal kontaminasyonunun gerçekleşmiş

olabileceğini düşündürmüştür. Bağırsak bakteri florasına ait bakteri cinsleri ilk defa bu çalışmada yazma eserlerde yüksek bollukta ve çeşitlilikte tespit edilmiştir.

T6'da *Enterobacter*, *Entorococcus* ve *Serratia*; T2'de *E. Shigella*; T3, T4 ve T5'te *Klebsiella* ve T6'da *Serratia* gibi koliform bakteri cinsleri düşük yoğunlukta tanımlanmıştır. Kromojenik ECC Agar üzerinde gelişim göstermemeleri ve bulundukları depo alanında uzun bir süredir optimal gelişimleri için gerekli olan 35-37 C sıcaklığın olmaması, bu türlerin canlılığını koruyamadığını düşündürmektedir. Reisnia v.d. (2022), kağıt üzerindeki koliform bakterilerin kontaminasyonunun hijyenik olmayan eller ya da hayvan dışkıları olabileceğini belirtmiştir. Pinar v.d. (2020b), bakteri cinslerinin kağıt yüzeyine vektörlerle, özellikle böceklerin atıklarıyla taşınmış olabileceğini bildirmiştir. Bu bakterilerin varlığı, eserlerin tahribatlı alanlarından kirli/hijyenik olmayan su kaynaklarına maruz kalmış olabileceğini ve kontaminasyonun bir zaman diliminde tahribat meydana getirdiğini düşündürmüştür.

Tüm örneklerde cins düzeyinde tanımlanan *Staphylococcus* ve *Streptococcus* üyeleri baskın bakterileri (*Staphylococcus* T2'de %1'in altında, *Streptococcus* T1'de %1'in altında kalmıştır) temsil etmektedir. *Staphylococcus* ve *Streptococcus* cinsi üyeleri kütüphane ve arşiv materyallerinde ve tarihi yazma eserlerde sıklıkla izole edilen türlerdir (Krakova v.d., 2012; Pavlovic v.d., 2023; Pinar v.d., 2020b; Migliore v.d., 2017; Migliore v.d., 2019; Cappa v.d., 2022). *Staphylococcus* cinsi insan deri mikroflorasının bir parçasıdır ve kitaplarda insan teması ile ilişkilendirilmiştir. *Streptococcus* cinsi üyeleri insan tükürük ve oküler yüzeyinin kor mikrobiyomunu oluşturan bakteriler arasındadır (Karadayı ve Karadayı, 2021; Delbeke v.d., 2021). T4'te *Moraxella* cinsine ait dizilerin çoğunluğu saprofitik bir tür olan ve insan derisi ve mukoz membranda bulunan üst solunum yollarında hastalık yapan patojen tür *M. osloensis* olarak tanımlanmıştır. Daha önce Leonarda da Vinci'nin çizimlerinde ve 19. yüzyıl kütüphane materyallerinde (Pavlovic v.d., 2023) YND teknolojileri ile ve Jurado v.d. tarafından Papanın 15-16. yüzyıllarda yazmış olduğu mektuplarda tanımlanmıştır (Jurado v.d., 2010). T2, T3, T5'te *Brevibacterium* ve *Fusobacterium*; T6'da *Cutibacterium*; T3, T4 ve T6'da *Macroccoccus*; T2'de *Veilonella* tanımlanmıştır. *Brevibacterium* cinsi üyeleri daha önce de farklı çalışmalarla parşömen yazma eserlerden izole edilmiştir (Krakova v.d., 2012; Teasdale v.d., 2017). Bu cinsin üyeleri

de insan deri mikroflorasında sıklıkla bulunmuştur. *Cutibacterium* üyeleri (*Propionibacterium*) insan derisinde yerleşik olan bakterilerdir. Pinar v.d. (2020b) ve Pavlovic vd. (2023) tarafından kağıt yüzeyinde tanımlanmıştır. Salgıladıkları propiyonik ve asetik asitlerin kitap kokularına neden olabileceği belirtilmiştir (Pavlovic v.d., 2023). T2 örneğinde tanımlanan *Agathobacter* cinsi üyelerinin çoğunlukla insan oral mukozasında ve vücudunun farklı yerlerinde bulunduğu bildirilmiştir (Eribe ve Olsen, 2017). T3 ve T5 örneğinde tanımlanan *Fusobacterium* cinsi üyeleri insanda ve farelerde ağız ve gastrointestinal sisteminde bulunmaktadır (Brennan ve Garrett, 2019). Yazma eserler yüzyıllar boyunca insanlar tarafından ele alındığı için bu bakteri cinsleri insan mikrobiyal markerı olarak düşünülmüştür. Yüksek oranda tanımlanmasıyla bulaşma kaynağının belgelerde insan teması olduğu düşünülmüştür.

Standart kültürleme tekniğiyle kolaylıkla izole edilen *Bacillus* türleri metagenomik analizlerle düşük düzeyde tanımlanmıştır. Sadece T6'da *Bacillus* cinsi yüksek bollukta görüntülenmiştir. *Bacillus* cinsi kağıt arşiv ve kütüphane materyallerinin kontaminantı olarak sıklıkla tanımlanmış ve kağıt yüzeyinin kor mikrobiyomunun bir üyesi olarak kabul edilmiştir. Selülotik ve proteolitik aktiviteleri yüksektir. Pigment üretimi gerçekleştirmesinden dolayı kağıttaki leke ve foxing oluşumdan sorumlu olabileceği düşünülmüştür (Karakasidou v.d. 2018; Tarsitani v.d., 2014). *Bacillus* çok çeşitli çevrelerde bulunan, endospor oluşturan bakteri cinsidir. Ekstrem habitatlarda uzun süre canlılıklarını sürdürebilmelerinin olumsuz şartlarda spor oluşturabilme gücüne bağlı olduğu düşünülmüştür (Borrego v.d., 2012). *Bacillus* sporları uzun süre dormant halde kalabilmekte fakat seçici besiyerlerinde çok kısa bir süre içerisinde canlı/vejetatif forma dönüşebilmektedir (Setlow, 2014). T2 ve T3 örneğinde tanımlanan *Paenibacillus*, T6'da tanımlanan *Priestia* ve *Calidifontibacillus*, T4'te tanımlanan *Brevibacillus* cinsleri de *Bacillus* cinsi ile taksonomik olarak yakındır. *Brevibacillus* cinsi kağıtta meydana gelen foxing lekelerinde tanımlanmıştır (Szulc v.d., 2018; Tarsitani v.d., 2015). Bu cins üyeleri doğada geniş yayılım göstermektedir. Hayvanların sindirim sistemlerinde, deniz suyu ve toprak gibi birçok çevreden izole edilmektedir.

T6' da tanımlanan *Pseudomonas* cinsi kağıt ve parşömen yüzeylerde YND analizleriyle sıklıkla tanımlanmıştır (Migliore v.d., 2019; Pavlovic v.d., 2023; Pinar v.d.2020b; Raesnia v.d., 2022; Szulc v.d., 2018). Pangallo v.d. (2012) tarafından fresko yüzeylerinden ve çevresindeki havadan izole edilmiştir. Vaisenian v.d. (1998) *Pseudomonas* cinsine ait bakterileri kağıt basım makinelerinden izole etmiş ve bu cinsin üyelerini kağıdın bileşenleri arasında bulunan nişasta, kazein ve karboksimetülselülozu degrade edebilecek kapasitede olduğunu belirtmiştir.

T1 ve T2'de tanımlanan *Saccharopolyspora*, parşömen yazma eserlerdeki kolajenin bozunmasından ve parşömenin tahribatında etkili olduğu bildirilmiştir (Pinar v.d., 2020a; Teasdale v.d., 2017). Krakova v.d. (2017) tarafından kağıt yüzeylerde de tanımlanmıştır. *Saccharopolyspora* toprak, deniz sedimentleri, bitki ve klinik örnekler gibi geniş çeşitlilikte habitatlarda bulunduğu ve (Kim ve Goodfellow, 2015)

T3, T4, T5 ve T6 örneklerinde tanımlanan *Acinetobacter* yazma eser çalışmalarında sıklıkla tanımlanmıştır. (Migliore v.d., 2019; Pinar v.d., 2020b; Pavlovic v.d., 2023) Doğada yaygın olarak, çoğunlukla da toprak ve suda bulunmaktadır. Her türlü yüzeyde kolonileşme gücünün yüksek, antibiyotiklere ve desikasyona karşı direncinin olduğu bildirilmiştir (Doughari v.d., 2011). Bu özelliklerinden dolayı kitaplar üzerinden sıklıkla izole edilmiş olacağı düşünülmektedir. Bu cinsin üyeleri hastane ortamlarından da izole edilmiştir. (Wong v.d., 2017)

T2 örneğinde tanımlanan *Nocardiopsis* cinsi parşömen yazma eserlerde bozulma etkeni bakteri cinsi olarak tanımlanmıştır (Pinar v.d., 2020a; Pinar v.d., 2020b). *Nocardiopsis* cinsi türlerinin geniş habitattan izole edildiği fakat büyük çoğunlukta toprakta bulunduğu ve amilaz, kitinaz, selülaz, β -glukonaz gib ekstraselüler enzimleri salgıladığı belirtilmiştir (Bennur v.d., 2015). Çoğu türünün de tuz, alkali ve desikasyona direnç özelliklerinin olduğu bilinmektedir (Chun v.d., 2000; Li v.d., 2003).

T4'te diğer örneklerden farklı olarak *Caulobacter* cinsi *C. segnis* ve *C. Mirabilis* baskın türleriyle tanımlanmıştır. *Caulobacter* türlerinin selülozun ve ligninin degradasyonunda etkili olduğu ve selüloz üzerinde gelişim gösterebildiği belirtilmiştir

(Song v.d., 2013). Pinar v.d. (2020b) çalışmasında tanımladığı *Caulobacter* cinsinin kağıt materyaller üzerinde biyolojik bozulma riski oluşturduğunu düşünmüştür.

T6 örneğinde yüksek bollukta ve T3 örneğinde düşük bollukla tanımlanan *Stenotrophomonas* cinsi üyeleri daha önce de parşömen yazma eserlerde (Michaelsen v.d., 2010; Pinar v.d, 2015b; Pinar v.d., 2020a) ve tarihi kağıt esaslı kitaplarda (Krakova v.d., 2017) tanımlanmış ve kağıt materyallerin bozunması ile ilişkilendirilmiştir. Pinar v.d.'ne (2020b) göre bu materyallerdeki varlığının nedeni, proteinaz ve kitinaz gibi ekstrasellüler enzimler salgılaması ve ekstrasellüler polisakarit üretebilmelerinden dolayı farklı materyaller üzerine yapışarak biyofilm oluşturabilmeleridir. T6'da tür düzeyinde tanımlanan *Stenotrophomonas rhizophila*'nın endoglikonaz enzimatik aktivitesi belirlenmiş ve selülozu degradasyonunda etkili olduğu anlaşılmıştır (Singh v.d., 2015). Bu cinse ait dizilerin çoğunluğu T3'de *S. maltophilia* türü olarak tanımlanmıştır. *S. maltophilia*, doğada kaynak suları, musluk suları, toprak, bitkiler gibi pek çok ortamda bulunabilen insan patojeni bir türdür (Brooke, 2012).

T3'te düşük nispi bollukla *Pseudonocardia* cinsi tanımlanmıştır. Farklı kaynaklardan izole edilen cinsin üyeleri, sıklıkla topraktan ve bazı bitkilerin köklerinde ve yapraklarında tespit edilmiştir (Raihi v.d., 2022). Tür düzeyinde tanımlanan *Pseudonocardia broussonetia*, kağıt dutu olarak bilinen *Broussonetia papyrifera* bitkisinin köklerinden izole edilmiştir (Mo v.d., 2019). *P. Broussonetia*'ya ait temsili diziler EK C.'de verilmiştir. *P. Broussonetia* türünün tanımlanmasıyla, kağıdın üretiminde tamamiyle kullanılsa bile yazma eser T3'de kağıt hammaddesinde kağıt dutu olarak bilinen *Broussonetia papyrifera* bitkisinin kullanılmış olabileceği düşünülmektedir. Bu kağıdın yapımında kullanılan bitkilerin belirlenebilmesi için daha ileri analizler yaparak sonuç desteklenmelidir.

T4'te tanımlanan *Aquabacterium*, Pavlovic v.d. (2023) tarafından 19. yüzyıla ait kitaplarda tanımlanmıştır. Pavlovic v.d., bu cinsin kitaplar üzerindeki varlığını kitapların restorasyon esnasında buharlı süpürgeler ile temizlenmesi ile ilişkili olabileceğini düşünmüştür. Akutik çevrelerde bulunan *Aquabacterium* türlerinin çoğunun şekeri metabolize edemediği bildirilmiştir (Hirose v.d., 2020). Bu nedenle

kağıt üzerinde gelişiminin zor olduğu ve tahribata neden olan türler arasında olmayacağı ya da sekonder zararlı olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak YND Illumina analizleriyle elde edilen verilere bakıldığında; tanımlanan bakteri topluluklarının yazma eserlere bulaşma kaynaklarını gruplandırabiliriz. İlk grupta ekstraselüler enzim salgılama kabiliyetleri yüksek ve temel kağıt bozucuları olarak sık tanımlanan ve kitap/yazma eserlerin kor mikrobiyomunu oluşturan *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* cinsi üyeleri yer almaktadır. Bu cinsin üyeleri coğrafi farklılıklar göz önünde bulundurulmaksızın çevresel kontaminantlar olarak toprak, hava, su ve tozdan kağıdın yapım aşasından itibaren eserlerin bulunduğu ortamlardan bulaşmış olabileceği düşünülmektedir. İkinci olarak *Staphylococcus*, *Brevibacterium*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Streptococcus*, *Cutibacterium*, *Fusobacterium* gibi insan mikrobiyomuna ait türlerin yüksek bollukta tanımlanmasıyla literatürde de belirtildiği gibi yazma eserlerdeki profilinin insan teması ya etkisiyle oluştuğu düşünülmektedir. Bu veriler literatürle uyusmaktadır. Örneklerin alındığı eserlerin çok sık okunduğu tahmin edilen başvuru dini kitaplar arasında olması bu veriyi doğrulamaktadır.

Bu genellemenin dışında, yazma eserlerdeki biyolojik tahribatlarda etkili olan bakteriyal toplulukların bulaşma kaynaklarının tespit edilmesinde eserler kendi özelinde (bulunduğu ortam şartları, fiziko-kimyasal özellikleri) değerlendirilmelidir. Her eserde yüksek bollukta görülen bağırsak florası üyeleri *Prevotella*, *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Porphyromonas* ve daha düşük bollukta görülen *E.coli*, *Psuedoescherica*, *Blautia*, *Agathobacter* türlerinin ortam şartlarındaki özel koşullardan bulaştığı sonucuna varılmıştır. Bu bakteri grubu eserlerin fare ya da şebeke suyu kaynaklı bir fekal kontaminasyona maruz kalmış olabileceğini göstermektedir. T1, T2 ve T3 örneklerinde kültür temelli tekniklerle izole edilen *Niallia circulans*'ın (*Bacillus circulans*) kanalizasyondan izole edilen bir tür olması şebeke suyu kaynaklı kontaminasyon ihtimalini güçlendirmektedir. Eserlerin 1970'li yıllardan itibaren kütüphane depo alanlarında bulunmasından dolayı *N. Circulans*'ın yazma eserler üzerinde uzun süre spor halinde canlılığını koruduğunu düşündürmektedir.

Tahribatlı ve tahribatsız alanlardaki pH değerlerindeki değişimin örnekler arasında değişkenlik gösterdiği görülmüştür. Mikrobiyal tahribatlarda organik asitlerin ve metabolitlerin üretimine bağlı olarak pH'nın düşmesi beklenirken T2 ve T3 örneklerinde artmıştır. Kağıtların heterojen yapısı nedeniyle kağıt üzerinde pH değerinin değişkenlik gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle diğer örneklerde pH düşüşünde bakteriyal toplulukların net bir etkisinin görülmediği düşünülmektedir. Bakteriyal toplulukların kağıdın pH üzerine etkisinde anlamlı sonuçlar için analizler sonraki çalışmalarda genişletilmelidir.

Bu çalışmada tahribatlı alanlardaki bakteriyal topluluk profili tanımlanmış ve iki farklı yöntem kıyaslanmıştır. Taksonomik çeşitlilik incelendiğinde kültür temelli yöntemlere kıyasla metagenomik analizlerde çeşitlilik daha yüksek gözlenmiştir. Kültür temelli yöntemler ile sadece canlı ve standart yöntemlerle (sıcaklık-bağıl nem-besiyeri) gelişen bakteriler tanımlanmaktadır. Bu çalışmada kültürleme tekniğine dayanan analizlerde sadece canlı bakterilerin tanımlanmış olduğu ya da zor gelişen bakterilerin standart protokollerle ve seçili besiyerinde gelişim göstermediği de düşünülmektedir. Analizlerde örneklerin alındığı alan, örnekleme yöntemi, seçilen inkübasyon yöntemi (NB inkübasyonunda rekabetçi türlerin baskın gelmesi) ve besiyerler sonuçları etkilemektedir. Kültür temelli yöntemlerin yazma eserdeki tüm bakteriyal topluluğun tanımlanmasında yetersiz kaldığı düşünülmektedir. YND Illumina teknolojisinin kullanıldığı metagenomik analizlerde yüzyıllar boyunca bulunduğu ortam şartlarından etkilenmiş yazma eserlerin üzerindeki canlı ya da cansız tüm bakteriyal kontaminantların ve kültüre alınamayan bakterilerin tanımlanması mümkün olmaktadır. Metagenomik analizlerde tüm veri incelendiğinde sadece yüksek nispi bolluk gösteren cinsler ve türler üzerinde taksonomik çeşitlilik analizleri gerçekleştirilmektedir. YND'nin hassasiyetinin yüksek olması ve örneklerdeki toplulukları çok geniş tanımlamasına rağmen düşük nispi bolluk gösteren cinslerin/türlerin tespit edilememesi ya da eserlerdeki bozulmalarla ilişkilendirilmemesi dezavantaj olarak görülebilir. Bu çalışmada da kültür temelli analizlerde tanımlanan cinslere ait üyelerin metagenomik analizlerde tanımlanan baskın cinsler arasında görülmemesi bu bilgiyi desteklemektedir. Yazma eserlerdeki tahribatların mikrobiyal topluluk tanımlama çalışmalarında her iki yöntemin birlikte kullanılması ile tahribat mekanizmasına dair daha güvenilir sonuçların elde edileceği

düşünülmektedir.

Metagenomik analizlerin yazma eserlerdeki tüm mikrobiyal topluluğun tanımlanmasında kullanılması bir yöntem olarak değerlendirilmelidir. Analizler, tarihi değeri yüksek olan yazma eserlerin canlı yada cansız tüm mikrobiyal florasının tanımlanmasıyla geçmişteki kullanımına ve bulunduğu ortam şartları hakkında farklı bilgiler ortaya çıkarmaktadır. Yüzyıllar öncesinden kağıt ve deri materyalin üretim aşamasında gelişim göstermiş bakterilerin de tanımlanması mümkün olmuştur. Bu çalışmada tarihleri 13-18. yy arasında değişen yazma eserlerin bakteriyal arşivi çıkarılmıştır. Bu çalışma yazma eserlerdeki ortak bakteri gruplarına rağmen her yazma eserin kendi yaşına, materyal içeriğine ve çevresel şartlarına göre bakteriyal florasının oluştuğunu ve özgün olarak değerlendirilmesi gerektiğini göstermiştir. Zararlı mikroorganizmaların ekolojisini, gelişim için gerekli olan ihtiyaçlarını ve tüm biyolojik bozulma mekanizmalarını tanımlamamız ile uygulayacağımız konservasyon işlemleri de gelişecektir.

Analizler, yazma eserlerin unsurlarının tanımlanmasında ve korunmasında yardımcı bir alan olarak ortaya çıkacaktır. Bu tez kapsamında elde edilen veriler, seçili yazma eserlerdeki bozulma kaynaklarının aydınlatılmasında ve yazma eser mikroflorasının tanımlanmasında literatürü desteklemekte ve katkı sağlamaktadır. Bilindiği gibi yazma eserlerin çevresel kontaminantlardan korunması için toz, toprak ve su gibi bakteri kaynaklarından uzak tutulması, ve uygun konservasyon malzemeleri ile yapılmış kutular içinde saklanması önerilmektedir. Bu çalışmada tanımlanan kontaminasyon kaynaklarına bakıldığında bu koruma stratejilerinin eserler için önemi vurgulanmıştır. Bozulma etkenlerinin tespiti, yazma eserlerin korunma stratejilerinin geliştirilmesinde de büyük önem taşıması dolayısıyla yeni teknik ve donanımların geliştirilmesine de öncülük edecektir.

Eski İslami yazma eserlerde bakteri cins ve türlerinin metagenomik analizlerle tanımlanması, kağıt üretiminde kullanılan malzemeler ve teknikler hakkında veri oluşturabilir. Bu kapsamda ilk kez bu tez çalışmasında tarihi kağıtta tanımlanan *P. Broussonetia*'nın kağıt dutunun (*Broussonetia* sp.) köklerinden izole edilen endofitik bir bakteri olması, İslami kağıtların üretiminde kısmi olarak kağıt dutunun kullanılmış

olabileceğini düşündürmektedir. Çinlilerin bu bitkiyi kağıt yapımında kullandığı bilinirken, kağıt dutunun İslami kağıt üretiminde kullanıldığına dair kesin bir bilgi yoktur. Çin menşeli 10. yüzyıla ait paçavra kağıtlarda yapılan analizlerde kağıt dutunun lifleri tanımlanmıştır (Helman-Wazny, 2016). Çalışmada, kağıt dutunun kaynağının söz konusu kağıtların yapımında kullanılmış giysiler ya da tapa yöntemiyle elde edilmiş kağıt parçaları olduğu belirtilmiş ve geç dönemlerde Çinliler tarafından bu tip kağıt üretiminin gerçekleştirilmiş olduğu varsayılmıştır. İslami kağıtların yapımında da hammadde olarak çoğunlukla paçavra kullanıldığı bilinmektedir. 15. yüzyılda yazma eserlerde kullanılmak üzere kağıtların Çin'den getirilmiş olduğuna dair bilgi bulunmaktadır (Yu, 2021). İpek yolu üzerinden de Çin ve İslami coğrafya arasında ticari ilişkilerin güçlendiği bilinmektedir (Liu, 2010). Çin ve İslami coğrafya arasında kağıt yapım teknikleri ve materyalleri arasında etkileşimlerin olduğu muhtemeldir. Bu bilgiler ışığında Çinliler tarafından kağıdın yapımında kullanılan kağıt dutunun, İslami coğrafyaya farklı formlarda (paçavra, giysiler ya da ithal kağıt bünyesinde) taşınmış ve kağıt yapımında kullanılmış olabileceği düşünülmektedir. İslami kağıt üretimine dair önemli bir veri olarak görülen bu bulgunun ileri analizlerle ve ticaret kayıtları gibi arşiv belgeleriyle desteklenmesi gerekmektedir.

Metagenomik analizlerle tanımlanan yazma eser mikroflorası, yazma eserlerin üretiminde kullanılan materyallerin tanımlanmasında yazma eserler ile çalışan arkeoloji, restorasyon ve konservasyon biliminde çalışmalar yapan tüm bilim insanları için önemli veri kaynağı oluşturmaktadır.

Ayrıca bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre tanımlanan türlerin bir kısmının insan patojeni bakteriler olması nedeniyle bu eserlerin dikkatle ele alınması gerekmektedir.

KAYNAKÇA

- Alakomi, H. L., Paananen, A., Suihko, M. L., Helander, I. M., Saarela, M. (2006). Weakening effect of cell permeabilizers on gram-negative bacteria causing biodeterioration. *Applied and environmental microbiology*, 72(7), 4695–4703. <https://doi.org/10.1128/AEM.00142-06>
- Alavi, M., Rai, M. (2019). Recent progress in nanoformulations of silver nanoparticles with cellulose, chitosan, and alginic acid biopolymers for antibacterial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(21-22), 8669–8676. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10126-4>
- Alkhatib, N. J., Younis, M. H., Alobaidi, A. S., Shaath, N. M. (2017). An unusual osteomyelitis caused by *Moraxella osloensis*: A case report. *International journal of surgery case reports*, 41, 146–149. <https://doi.org/10.1016/j.ijscr.2017.10.022>
- Allen L. V., Jr (2018). Quality Control: Water Activity Considerations for Beyond-use Dates. *International journal of pharmaceutical compounding*, 22(4), 288–293.
- Ayoade, F., Amona, S. D. (2018). Deterioration and Microbiological Evaluation of Information Bearing Paper in a Nigerian University. *Annual Research & Review in Biology*, 26(2), 1–9. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2018/39280>
- Bennur, T., Kumar, A. R., Zinjarde, S., Javdekar, V. (2015). Nocardiosis species: Incidence, ecological roles and adaptations. *Microbiological research*, 174, 33–47. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.05.001>
- Blyskal B, Lenart-Borod A, Borod P. (2017) Approaches to Taxonomic Studies of Actinomycetes Isolated from Historic and Contemporary Materials. *J Pure Appl Microbiol.*;11(2):637-648. doi: 10.22207/JPAM.11.2.01
- Borrego, S., Lavin, P., Perdomo, I., Gómez de Saravia, S., Guiamet, P. (2012). Determination of indoor air quality in archives and biodeterioration of the documentary heritage. *ISRN microbiology*, 2012, 680598. <https://doi.org/10.5402/2012/680598>
- Branysova, T., Demnerova, K., Durovic, M., Stiborova, H. (2022) Microbial Biodeterioration of Cultural Heritage and Identification of the Active Agents over the Last Two Decades *Journal of Cultural Heritage* Volume 55, 245-260 <https://doi.org/10.1016/j.culher.2022.03.013>

- Branysova, T., Petru, N., Lopez Marin, M. A., Solcova, M., Demnerova, K., Stiborova, H. (2024). Uncovering the microbial diversity of Czech Republic archives: A study of metabolically active airborne microbes. *Heliyon*, 10(7), <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e27930>
- Brennan, C. A., Garrett, W. S. (2019). *Fusobacterium nucleatum* - symbiont, opportunist and oncobacterium. *Nature reviews. Microbiology*, 17(3), 156–166. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0129-6>
- Brooke J. S. (2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clinical microbiology reviews*, 25(1), 2–41. <https://doi.org/10.1128/CMR.00019-11>
- Carlo, E.D., Chisesi, R., Barresi, G., Barbaro, S., Lombardo, G., Rotolo, V., Sebastianelli, Travagliato, M.G., Palla, F. (2016). Fungi and Bacteria in Indoor Cultural Heritage Environments: Microbial-related Risks for Artworks and Human Health. *Environment and Ecology Research*, 4(5), 257 - 264. DOI: 10.13189/eer.2016.040504.
- Cappa, F., Piñar, G., Brenner, S., Frühmann, B., Wetter, W., Schreiner, M., Engel, P., Miklas, H., Sterflinger, K. (2022). The Kiev Folia: An interdisciplinary approach to unravelling the past of an ancient Slavonic manuscript. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 167, Article 105342. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2021.105342>
- Cappitelli, F., Pasquariello, G., Tarsitani, G., Sorlini, C. (2010) Scripta manent? Assessing microbial risk to paper heritage. *Trends in Microbiology* 18, 538-542 <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.09.004>
- Cappitelli, F., Sorlini, C. (2005). From papyrus to compact disc: the microbial deterioration of documentary heritage. *Critical reviews in microbiology*, 31(1), 1–10. <https://doi.org/10.1080/10408410490884766>
- Chu, H., Yeonhwa, J., Won K.C. (2014) Evolution of endogenous non-retroviral genes integrated into plant genomes. *Curr Plant Biol* 1: 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2014.07.002>
- Chun, J., Bae, K. S., Moon, E. Y., Jung, S. O., Lee, H. K., Kim, S. J. (2000). *Nocardiopsis kunsanensis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from a saltern. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50 Pt 5, 1909–1913. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-5-1909>

- Creydt, M., Fischer, M. (2023). Artefact Profiling: Panomics Approaches for Understanding the Materiality of Written Artefacts. *Molecules*, 28(12), 4872. <https://doi.org/10.3390/molecules28124872>
- Delbeke, H., Younas, S., Casteels, I., Joossens, M. (2021). Current knowledge on the human eye microbiome: a systematic review of available amplicon and metagenomic sequencing data. *Acta ophthalmologica*, 99(1), 16–25. <https://doi.org/10.1111/aos.14508>
- Doughari, H. J., Ndakidemi, P. A., Human, I. S., Benade, S. (2011). The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. *Microbes and environments*, 26(2), 101–112. <https://doi.org/10.1264/jsme2.me10179>
- Eribe, E. R. K., Olsen, I. (2017). *Leptotrichia* species in human infections II. *Journal of oral microbiology*, 9(1), 1368848. <https://doi.org/10.1080/20002297.2017.1368848>
- Ewing, B., & Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome research*, 8(3), 186–194.
- Fiddymment, S., Teasdale, M. D., Vnouček, J., Lévêque, É., Binois, A., Collins, M. J. (2019). So you want to do biocodicology? A field guide to the biological analysis of parchment. *Heritage Science*, 7, [35]. <https://doi.org/10.1186/s40494-019-0278-6>
- Florian, M.L. (2002) Fungal facts: solving fungal problems in heritage collections. *Archetype publications*. London
- Florian, M.L. (2008) Protein Facts: Fibrous Proteins in Cultural and Natural History Artifacts: Fibrous Proteins in Cultural Artifacts. *Archetype Publications Ltd*. London
- Fouda, A., Abdel-Nasser, M., Eid, A. M., Hassan, S. E., Abdel-Nasser, A., Alharbi, N. K., AlRokban, A. H., Abdel-Maksoud, G. (2023). An Eco-Friendly Approach Utilizing Green Synthesized Titanium Dioxide Nanoparticles for Leather Conservation against a Fungal Strain, *Penicillium expansum* AL1, Involved in the Biodeterioration of a Historical Manuscript. *Biology*, 12(7), 1025. <https://doi.org/10.3390/biology12071025>
- Fukuda, K., Ogawa, M., Taniguchi, H., Saito, M. (2016). Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene. *Journal of UOEH*, 38(3), 223–232. <https://doi.org/10.7888/juoeh.38.223>

- Gautam, S. P., Bundela, P. S., Pandey, A. K., Jamaluddin, Awasthi, M. K., Sarsaiya, S. (2012). Diversity of cellulolytic microbes and the biodegradation of municipal solid waste by a potential strain. *International journal of microbiology*, 325907. <https://doi.org/10.1155/2012/325907>
- Gutarowska, B. (2020). The use of -omics tools for assessing biodeterioration of cultural heritage: A review. *Journal of Cultural Heritage* 45: 351–361
- Gutarowska, B., (2016) A Modern Approach to Biodeterioration Assessment and the Disinfection of Historical Book Collections. Institute of Fermentation Technology and Microbiology. Lodz University of Technology
- Güngör, N., (2015) Some Molecular Techniques Applied in Determination of Environmental Microbial Diversity. *Journal of Engineering and Natural Sciences Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi* Sigma 33, 54-64,
- Green, P. W. C., Farman, D. I. (2015). Can Paper and Adhesive alone Sustain Damaging Populations of Booklice?. *Journal of Conservation and Museum Studies*, vol. 13(1), p. Art. 3, doi:10.5334/jcms.1021222.
- Helman-Ważny, A. (2016). More than meets the eye: Fibre and Paper Analysis of the Chinese Manuscripts from the Silk Roads. *STAR: Science & Technology of Archaeological Research*, 2(2), 127–140. <https://doi.org/10.1080/20548923.2016.1207971>
- Hirose, S., Tank, M., Hara, E., Tamaki, H., Mori, K., Takaichi, S., Haruta, S., Hanada, S. (2020). *Aquabacterium pictum* sp. nov., the first aerobic bacteriochlorophyll *a*-containing fresh water bacterium in the genus *Aquabacterium* of the class *Betaproteobacteria*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(1), 596–603. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003798>
- Hoppe, I. J., Brandstetter, H., Schöner, E. (2021). Biochemical characterisation of a collagenase from *Bacillus cereus* strain Q1. *Scientific reports*, 11(1), 4187. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83744-6>
- Hubbe, M.A., & Bowden, C.W. (2009). Handmade Paper: A Review of its History, Craft, and Science. *Bioresources*, 4, 1736-1792.
- Hueck, H.J. (1968) “The Biodeterioration of Materials—An Appraisal.” In: *Walters, A.H. ve Elphick, J.S., Eds., Biodeterioration of Materials*, Elsevier, London, 6-12.

- Jacob, Salgo Merin, Bhagwat, A.M., Kelkar-Mane, V. (2015) *Bacillus* species as an intrinsic controller of fungal deterioration of archival documents. *Int. Biodeter. Biodegr.* 104, 46–52.
- Jayasekara, S., Ratnayake, R. (2019). Microbial Cellulases: An Overview and Applications. In: Rodríguez Pascual A, Eugenio Martín ME (eds) *Cellulose*. IntechOpen, London. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84531>.
- Jurado, V., Porca, E., Pastrana, M. P., Cuezva, S., Fernandez-Cortes, A., Saiz-Jimenez, C. (2010). Microbiological study of bulls of indulgence of the 15th-16th centuries. *The Science of the total environment*, 408(17), 3711–3715. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.05.008>
- Karadayı, Ş., Karadayı, B. (2021). Tükürük Mikrobiyomunun Adli Amaçlı Kullanımı: Metagenomik Analiz Yöntemleri: Geleneksel Derleme. *Türkiye Klinikleri Adli Tıp ve Adli Bilimler Dergisi*, 18(3), 260 - 273. 10.5336/forensic.2021-84853
- Karakasidou, K., Nikolouli, K., Amoutzias, G. D., Pournou, A., Manassis, C., Tsiamis, G., Mossialos, D. (2018). Microbial diversity in biodeteriorated Greek historical documents dating back to the 19th and 20th century: A case study. *Microbiology Open*, 7(5), e00596. <https://doi.org/10.1002/mbo3.596>
- Kim, S. B., Goodfellow, M., (2015) *Saccharopolyspora*.” In W. B. Whitman *Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* pp. 1–30. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons, Inc.
- Kobayashi, D. Y., Reedy, R. M., Bick, J., Oudemans, P. V. (2002). Characterization of a chitinase gene from *Stenotrophomonas maltophilia* strain 34S1 and its involvement in biological control. *Applied and environmental microbiology*, 68(3), 1047–1054. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1047-1054.2002>
- Kraková, L., Chovanová, K., Selim, S.A., Šimonovičová, A., Puškarová, A., Maková, A., Pangall, D. (2012) A multiphasic approach for investigation of the microbial diversity and its biodegradative abilities in historical paper and parchment documents *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 70,117-125. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.01.011>

- Kraková, L., Šoltys, K., Otlewska, A., Pietrzak, K., Purkrťová, S., Savická, D., Puškárová, A., Bučková, M., Szemeš, T., Budiš, J., Demnerova, K., Gutarowska, B., Pangallo, D. (2017). Comparison of methods for identification of microbial communities in book collections: Culture-dependent (sequencing and MALDI-TOF MS) and culture-independent (Illumina MiSeq). *International Biodeterioration & Biodegradation*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.02.015>.
- Lech T. (2016). Evaluation of a Parchment Document, the 13th Century Incorporation Charter for the City of Krakow, Poland, for Microbial Hazards. *Applied and environmental microbiology*, 82(9), 2620–2631. <https://doi.org/10.1128/AEM.03851-15>
- Lee, H. V., Hamid, S. B., Zain, S. K. (2014). Conversion of lignocellulosic biomass to nanocellulose: structure and chemical process. *TheScientificWorldJournal*, 2014, 631013. <https://doi.org/10.1155/2014/631013>
- Li, M. G., Li, W. J., Xu, P., Cui, X. L., Xu, L. H., Jiang, C. L. (2003). *Nocardiosis xinjiangensis* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from a saline soil sample in China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(Pt 1), 317–321. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02055-0>
- Liu, Z., Zhang, Y., Zhang, F., Hu, C., Liu, G., Pan, J. (2018). Microbial Community Analyses of the Deteriorated Storeroom Objects in the Tianjin Museum Using Culture-Independent and Culture-Dependent Approaches. *Frontiers in microbiology*, 9, 802. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00802>
- Manente, S., Micheluz, A., Ganzerla, R., Ravagnan, G., Gambaro, A. (2012) Chemical and biological characterization of paper: a case study using a proposed methodological approach. *International Biodeterioration and Biodegradation* 74,99-108 <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.03.008>
- Mesquita, N., Portugal, A., Videira, S., Rodriguez-Echeverria, S., Bandeira, A.M.L, Santos, M.J.A., Freitas H. (2009) Fungal diversity in ancient documents. A case study on the Archive of the University of Coimbra. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 63,626-629. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.03.010>
- Michaelsen, A., Piñar, G., Pinzari, F. (2010) Molecular and microscopical investigation of the microflora inhabiting a deteriorated Italian manuscript dated from the thirteenth century. *Microbial ecology*, 60(1), 69–80. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9667-9>

- Michaelsen, A., Pinzari, F., Barbabietola, N., Piñar, G. (2013). Monitoring the effects of different conservation treatments on paper-infecting fungi. *International biodeterioration & biodegradation*, 84(100), 333–341. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.08.005>
- Migliore, L., Thaller, M.C., Vendittozzi, G., Mejia, A., Mercuri, F., Orlanducci, S., Rubechini, A. (2017) Purple Spot damage dynamics investigated by an integrated approach on a 1244 A. D. parchment roll from the Secret Vatican Archive. *Scientific Reports*, 7(9521) <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05398-7>
- Migliore, Luciana, v.d. “Three ancient documents solve the jigsaw of the parchment purple spot deterioration and validate the microbial succession model”. *Scientific Reports* 9(2019):1623 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37651>
- Mo, P., Zhao, Y., Liu, J., Xu, Z., & Gao, J. (2019). *Pseudonocardia broussonetiae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the roots of *Broussonetia papyrifera*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 71(3), 10.1099/ijsem.0.004680. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004680>
- Mohammadi, P., Shokrzadeh, L., Bahreini, M., & Behdani, S. (2023). Investigation on microbial deterioration of exquisite collection of old manuscripts in Iran. *Iranian journal of microbiology*, 15(4), 574–584. <https://doi.org/10.18502/ijm.v15i4.13512>
- National Research Council (US) Committee on Metagenomics: Challenges and Functional Applications. (2007). *The New Science of Metagenomics: Revealing the Secrets of Our Microbial Planet*. National Academies Press (US).
- Okpalanozie, O.E., Adebusoye, S.A., Troiano, F., Cattò, C., Ilori, M.O., Cappitelli, F. (2018). Assessment of indoor air environment of a Nigerian museum library and its biodeteriorated books using culture-dependent and –independent techniques. *International Biodeterioration & Biodegradation*.
- Pangallo, D., Kraková, L., Chovanová, K., Simonovičová, A., De Leo, F., Urzì, C. (2012). Analysis and comparison of the microflora isolated from fresco surface and from surrounding air environment through molecular and biodegradative assays. *World journal of microbiology & biotechnology*, 28(5), 2015–2027. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1004-7>

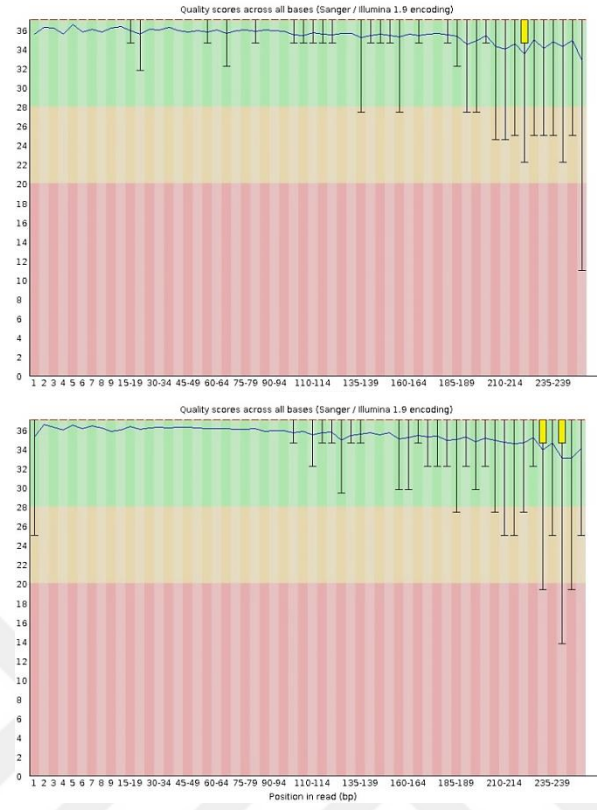
- Pavlović, J., Sclocchi, M.C., Planý, M., Ruggiero, D., Puškárová, A., Bučková, M., Šoltys, K., Colaizzi, P., Riccardi, M.L., Pangallo, D., Pinzari, F. (2022). The microbiome of candle beeswax drops on ancient manuscripts. *International Biodeterioration & Biodegradation*.
- Pavlović, J., Puškárová, A., Planý, M., Farkas, Z., Rusková, M., Kvalová, K., Kraková, L., Bučková, M., & Pangallo, D. (2023). Colored stains: Microbial survey of cellulose-based and lignin rich papers. *International journal of biological macromolecules*, 241, 124456. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124456>
- Perini, N., Mercuri, F., Thaller, M. C., Orlanducci, S., Castiello, D., Talarico, V., Migliore, L. (2019). The Stain of the Original Salt: *Red Heats* on Chrome Tanned Leathers and *Purple Spots* on Ancient Parchments Are Two Sides of the Same Ecological Coin. *Frontiers in microbiology*, 10, 2459. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02459>
- Perini, N., Mercuri, F., Orlanducci, S., Thaller, M. C., & Migliore, L. (2020). The Integration of Metagenomics and Chemical Physical Techniques Biodecoded the Buried Traces of the Biodeteriogens of Parchment Purple Spots. *Frontiers in microbiology*, 11, 598945. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.598945>
- Piñar, G., Tafer, H., Sterflinger, K., & Pinzari, F. (2015a). Amid the possible causes of a very famous foxing: molecular and microscopic insight into Leonardo da Vinci's self-portrait. *Environmental microbiology reports*, 7(6), 849–859. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12313>
- Piñar, G., Sterflinger, K., & Pinzari, F. (2015b). Unmasking the measles-like parchment discoloration: molecular and microanalytical approach. *Environmental microbiology*, 17(2), 427–443. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12471>
- Piñar, G., Tafer, H., Schreiner, M., Miklas, H., & Sterflinger, K. (2020a). Decoding the biological information contained in two ancient Slavonic parchment codices: an added historical value. *Environmental microbiology*, 22(8), 3218–3233. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15064>
- Piñar, G., Sclocchi, M. C., Pinzari, F., Colaizzi, P., Graf, A., Sebastiani, M. L., Sterflinger, K. (2020b). The Microbiome of Leonardo da Vinci's Drawings: A Bio-Archive of Their History. *Frontiers in microbiology*, 11, 593401. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.593401>

- Pinzari, F., Pasquariello, G. and De Mico, A. (2006). Biodeterioration of Paper: A SEM Study of Fungal Spoilage Reproduced Under Controlled Conditions. *Macromol. Symp.*, 238: 57-66. <https://doi.org/10.1002/masy.200650609>
- Pinzari, F., Gutarowska, B. (2021). Extreme Colonizers and Rapid Profiteers: The Challenging World of Microorganisms That Attack Paper and Parchment. In: Joseph, E. (eds) *Microorganisms in the Deterioration and Preservation of Cultural Heritage*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-69411-1_4
- Querner, Pas. (2015) Insect Pests and Integrated Pest Management in Museums, Libraries and Historic Buildings. *Insects* vol. 6,2 595-607. doi:10.3390/insects6020595
- Raeisnia, N., Arefian, E., Amoozegar, M. A. (2022). *Microbial Community of an 11th Century Manuscript by Both Culture-Dependent and -Independent Approaches* Microbiology, Vol. 91, No. 3:313–323.
- Riahi, H. S., Heidarieh, P., & Fatahi-Bafghi, M. (2022). Genus *Pseudonocardia*: What we know about its biological properties, abilities and current application in biotechnology. *Journal of applied microbiology*, 132(2), 890–906. <https://doi.org/10.1111/jam.15271>
- Rizzi, E., Lari, M., Gigli, E., De Bellis, G., & Caramelli, D. (2013). Correction: Ancient DNA studies: new perspectives on old samples. *Genetics, Selection, Evolution : GSE*, 45(1), 4. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-45-4>
- Russo, A., Tarantino, U., d'Ettorre, G., Della Rocca, C., Ceccarelli, G., Gasbarra, E., Venditti, M., & Iundusi, R. (2021). First report of spondylodiscitis caused by *Bacillus circulans* in an immunocompetent patient: Clinical case and review of the literature. *IDCases*, 23, e01058. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2021.e01058>
- Russell, D. A., Garlena, R. A., & Hatfull, G. F. (2019). Complete Genome Sequence of *Microbacterium foliorum* NRRL B-24224, a Host for Bacteriophage Discovery. *Microbiology resource announcements*, 8(5) <https://doi.org/10.1128/MRA.01467-18>
- Samson, R. A., & van der Lustgraaf, B. (1978). *Aspergillus penicilloides* and *Eurotium halophilicum* in association with house-dust mites. *Mycopathologia*, 64(1), 13–16. <https://doi.org/10.1007/BF00443082>

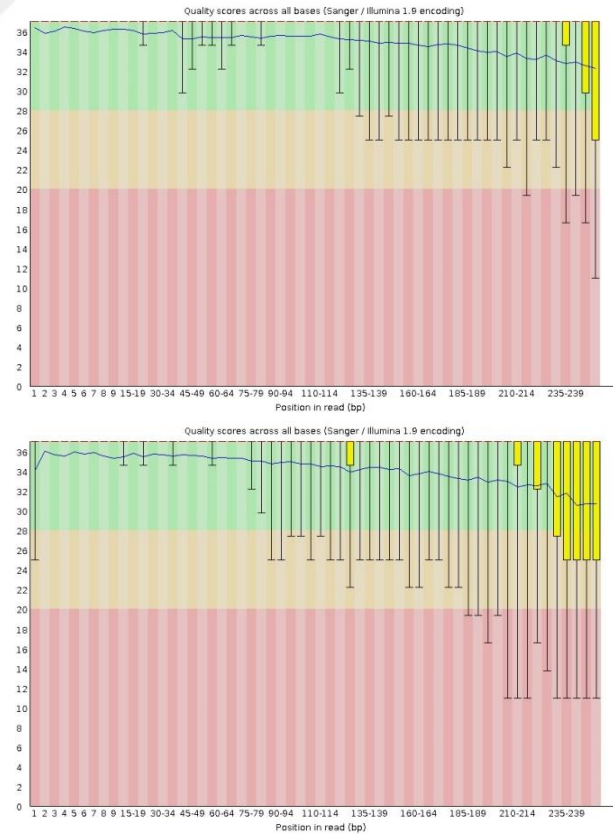
- Setlow P. (2014). Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know. *Journal of bacteriology*, 196(7), 1297–1305. <https://doi.org/10.1128/JB.01455-13>
- Sharpton TJ (2014) An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Front. Plant Sci.* 5:209. doi: [10.3389/fpls.2014.00209](https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00209)
- Singh, S., Thavamani, P., Megharaj, M., Naidu, R. (2015). Multifarious activities of cellulose degrading bacteria from Koala (*Phascolarctos cinereus*) faeces. *Journal of animal science and technology*, 57, 23. <https://doi.org/10.1186/s40781-015-0056-2>
- Song, N., Cai, H. Y., Yan, Z. S., Jiang, H. L. (2013). Cellulose degradation by one mesophilic strain *Caulobacter* sp. FMC1 under both aerobic and anaerobic conditions. *Bioresource technology*, 131, 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.003>
- Strlic, M., Kolar, J. (2004), Ageing and stabilisation of paper National and University Library, Ljubljana
- Szczepanowska, H. (2023). Biodeterioration of Cultural Heritage: Dynamic Interfaces between Fungi, Fungal Pigments and Paper; Basel: MDPI. <https://doi.org/10.3390/books978-3-0365-2093-3>
- Szulc, J. Otlewska, A., Ruman, T., Kubiak, K., Karbowska-Berent, J., Koziellec, T., Gutarowska, B. (2018) Analysis of paper foxing by newly available omics techniques. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Volume:132157-165, <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.03.005>
- Tarsitani, G., Moroni, C., Cappitelli, F., Pasquariello, G., Maggi, O. (2014). Microbiological Analysis of Surfaces of Leonardo Da Vinci's Atlantic Codex: Biodeterioration Risk. *International journal of microbiology*, 2014, 214364. <https://doi.org/10.1155/2014/214364>
- Teasdale, M. D., van Doorn, NL., Fiddymment, S., Webb, CC., O'Connor, T., Hofreiter, M., Collins, MJ., & Bradley, DG. (2015). Paging through history: parchment as a reservoir of ancient DNA for next generation sequencing. *Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London Series B - Biological Sciences*, 370(1660), Article 20130379. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0379>
- Teasdale M.D., Fiddymment S., Vnouček, J., Mattiangeli V., Speller C., Binois A., Carver M., Dand C., Newfield T.P., Webb C.C., Bradley D.G., Collins M. J. (2017)

- The York Gospels: A 1000-year Biological Palimpsest R. Soc. Open Sci.4170988
<http://doi.org/10.1098/rsos.170988>
- Väisänen, O. M., Weber, A., Bennasar, A., Rainey, F. A., Busse, H. J., Salkinoja-Salonen, M. S. (1998). Microbial communities of printing paper machines. *Journal of applied microbiology*, 84(6), 1069–1084. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00447.x>
- Wang, X. W., Houbraken, J., Groenewald, J. Z., Meijer, M., Andersen, B., Nielsen, K. F., Crous, P. W., Samson, R. A. (2016). Diversity and taxonomy of *Chaetomium* and chaetomium-like fungi from indoor environments. *Studies in mycology*, 84, 145–224. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2016.11.005>
- Wang, J., Lang, T., Shen, J., Dai, J., Tian, L., Wang, X. (2019). Core Gut Bacteria Analysis of Healthy Mice. *Frontiers in microbiology*, 10, 887. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00887>
- Wong, D., Nielsen, T. B., Bonomo, R. A., Pantapalangkoor, P., Luna, B., Spellberg, B. (2017). Clinical and Pathophysiological Overview of Acinetobacter Infections: a Century of Challenges. *Clinical microbiology reviews*, 30(1), 409–447. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-16>
- Yılmaz, K., Karlı, K. (2023). Bağırsak Mikrobiyotası ve Gastrointestinal Sistem Hastalıklarında Probiyotiklerin Mikrobiyotaya Etkisi. Kastamonu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi, 2(2), 29-41. <https://doi.org/10.59778/sbfdergisi.1314182>
- Yu, T., Li, W., (2023) Cutibacterium acnes in Atopic Dermatitis: Roles and Potential Therapeutic Applications *International Journal of Dermatology and Venereology* 7(1)
- Yu, Y. (2021). Gold-sprinkled: Chinese paper and Persian book arts during the fifteenth century. In O. Cacchione, & W.-C. Lin (Eds.), *The allure of matter: materiality across Chinese art* (pp. 92-113). University of Chicago Press.
- Zhou, Y., Shi, Y., Huang, Y., & Zhong, J. (2024). Microbes on the "peachy spots" of ancient Kaihua paper: microbial community and functional analysis. *Frontiers in microbiology*, 14, 1326835. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1326835>
- Zhang, X., Yan, Y., Yao, J., Jin, S., Tang, Y. (2023) Chemistry directs the conservation of paper cultural relics. *Polym Degrad Stab.*;207:110228. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2022.110228>

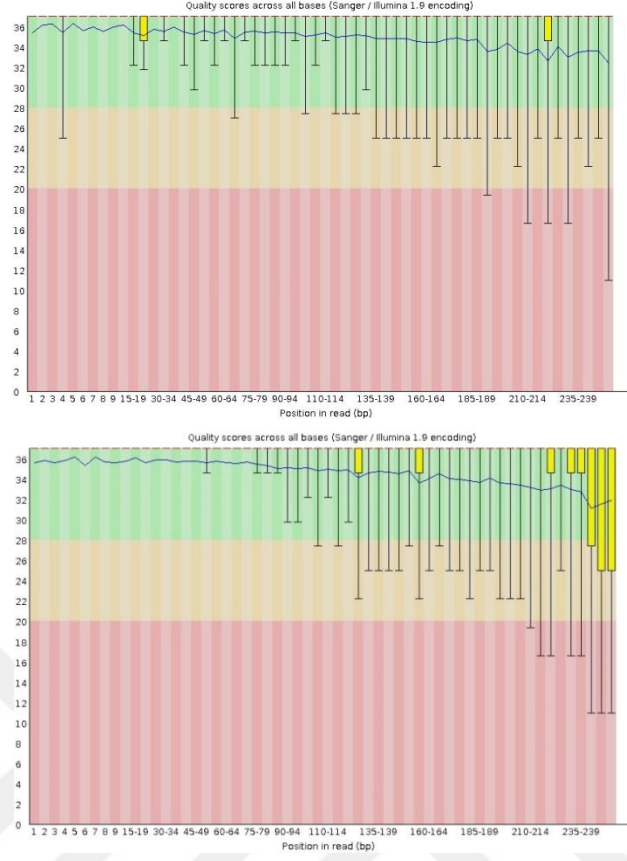
EK A: 6 Örneğe Ait Forward ve Reverse Ham Sekans Kalite Skorları



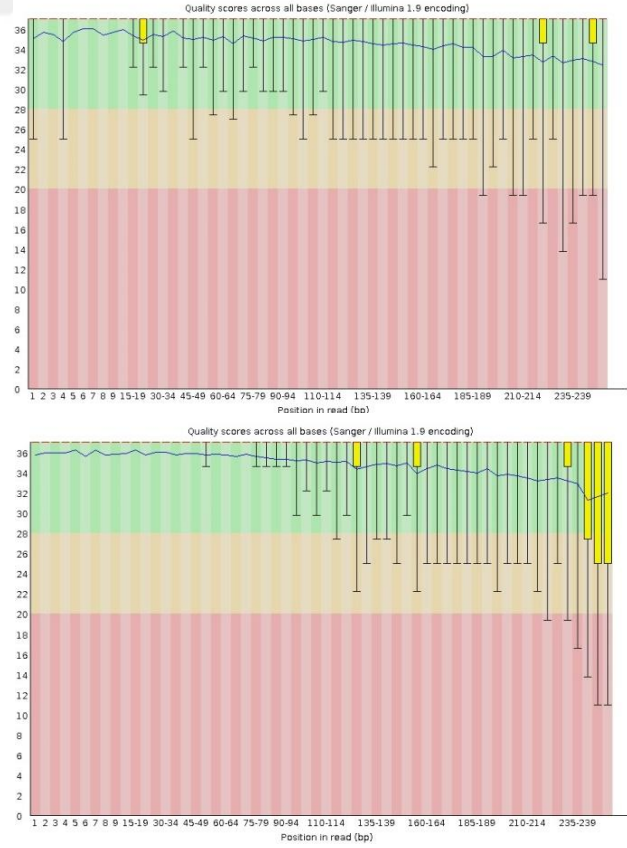
Şekil A.1. T1 örneğine ait forward ve reverse ham sekans kalite skorları



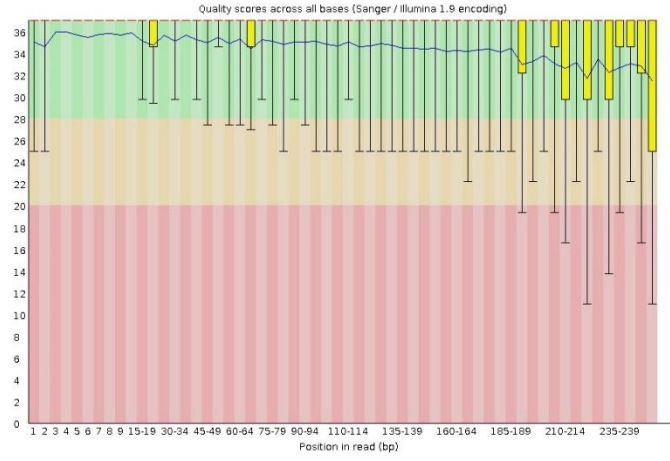
Şekil A.2. T2 örneğine ait forward ve reverse ham sekans kalite skorları



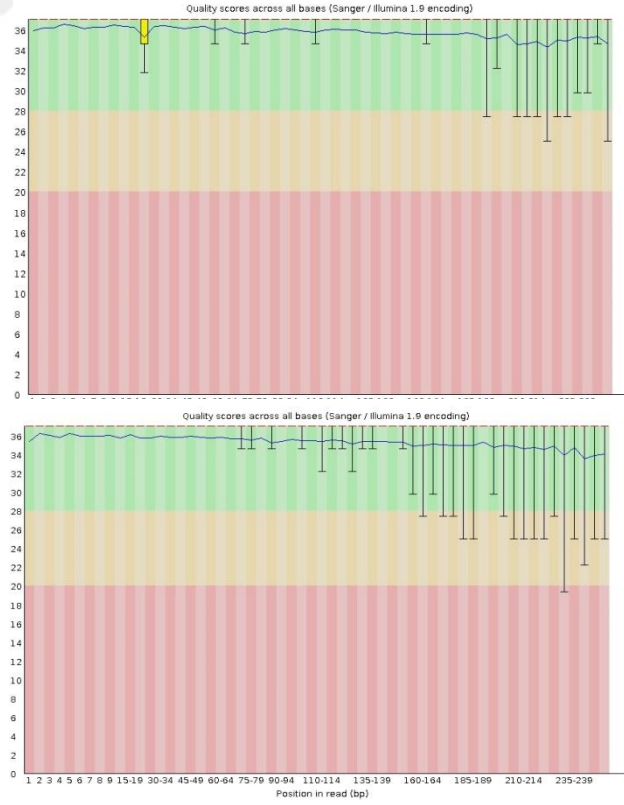
Şekil A.3. T3 örneğine ait forward ve reverse ham sekans kalite skorları



Şekil A.4. T4 örneğine ait forward ve reverse ham sekans kalite skorları

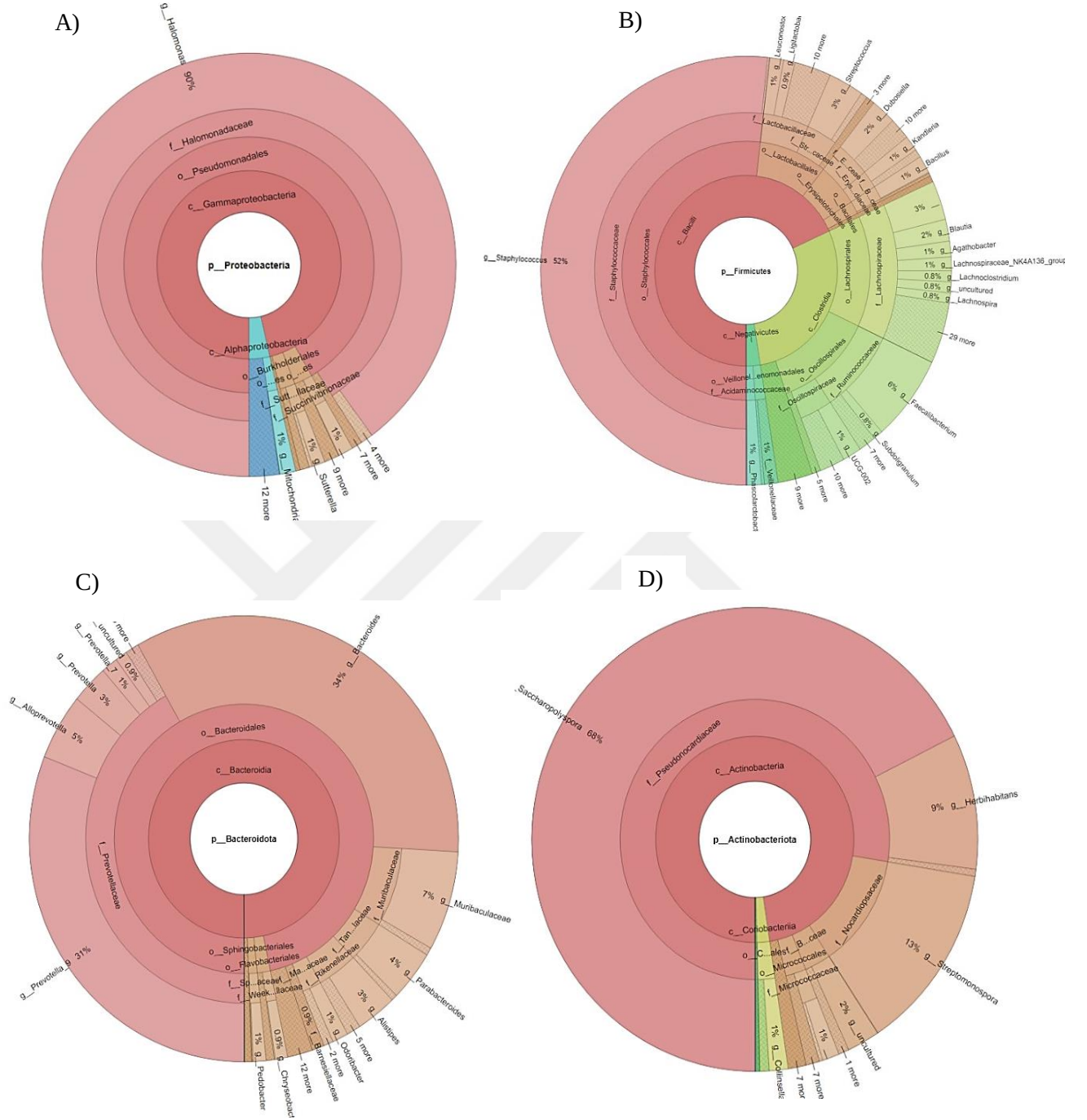


Şekil A.5. T5 örneğine ait forward ve reverse ham sekans kalite skorları



Şekil A.6. T6 örneğine ait forward ve reverse ham sekans kalite skorları

EK B: 6 Örnekteki En Yüksek Yoğunlukta Görülen Şubelerdeki Cins Oranlarını Gösteren Krona Grafikleri



Şekil B.1. T1 Örneğinde en yüksek yoğunlukta görülen Şubelerdeki sadece cins oranlarını gösteren Krona grafikleri A-B-C-D) sırasıyla Proteobacteria-Firmicutes- Bacteroidota- Actinobacteriota şubesinde en yüksek bollukta görülen bakteri cinsleri

EK C. P. Broussonetiae'ye ait temsili dizi

Pseudonocardia broussonetiae strain Gen 01 16S ribosomal RNA, partial sequence

Sequence ID: [NR_180780.1](#) Length: 1400 Number of Matches: 1

Range 1: 307 to 719 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
745 bits(403)	0.0	410/413(99%)	2/413(0%)	Plus/Plus
Query 1	GGGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCTGGGGGATGACGGC	60		
Sbjct 307	GGGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCTGGGGGATGACGGC	366		
Query 61	CTTCGGGTGTAAACCTCTTTCGACCTTGACGAAG-CCTTCGGG-TGACGGTAGGGGTAG	118		
Sbjct 367	CTTCGGGTGTAAACCTCTTTCGACCTTGACGAAGCCTTCGGGTGTACGGTAGGGGTAG	426		
Query 119	AAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGT	178		
Sbjct 427	AAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGT	486		
Query 179	CCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTGTGTACGTGCGTCGTGAAAACTTG	238		
Sbjct 487	CCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTGTGTACGTGCGTCGTGAAAACTTG	546		
Query 239	GGGCTTAACCTGAGCTTGCGGTCGATACGGGCATCACTTGAGTTCGGCAGGGGAGACTG	298		
Sbjct 547	GGGCTTAACCTGAGCTTGCGGTCGATACGGGCATCACTTGAGTTCGGCAGGGGAGACTG	606		
Query 299	GAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCG	358		
Sbjct 607	GAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCG	666		
Query 359	GGTCTCTGGGCGGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGG	411		
Sbjct 667	GGTCTCTGGGCGGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGG	719		

Şekil C.1. P. Broussonetiae'ye ait temsili dizi