2025

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Oktay KESKİN



T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SOSYAL BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

ARKEOLOJİK BULGULARDA BAKTERİYEL ANTİK DNA ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Oktay KESKİN

ARKEOLOJİ ANA BİLİM DALI

Ankara, 2025

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SOSYAL BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

ARKEOLOJİK BULGULARDA BAKTERİYEL ANTİK DNA ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Oktay KESKİN

ARKEOLOJİ ANA BİLİM DALI

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Yusuf ALBAYRAK

Ankara, 2025

ONAY SAYFASI

Oktay KESKİN tarafından hazırlanan "Arkeolojik Bulgularda Bakteriyel Antik DNA Araştırılması" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Arkeoloji Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesi	**Kabul / Red**	**Kurumu**	**İmza**
Doç. Dr. Yusuf ALBAYRAK	KABUL	Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi İnsan ve Toplum Bilimleri Fak.	
Prof. Dr. Bahattin ÇELİK	KABUL	Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi İnsan ve Toplum Bilimleri Fak.	
Prof. Dr. Emre KESKİN	KABUL	Ankara Üniversitesi Zirat Fak.	

Tez Savunma Tarihi: 12.06.2025

Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Arkeoloji Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olması için şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

Prof. Dr. Muhammet Enes KALA
Sosyal Bilimler Enstitüsü Müdürü V.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim. 10.06.2025

İmza

Oktay KESKİN

“Hayatta en hakiki mürşit ilimdir fendir, ilim ve fenden başka yol gösterici aramak gaflettir, dalalettir, cehalettir.” diyen yüce ATAM’a ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı'nda uzun yıllardır sürdürdüğüm akademik çalışmaların yanı sıra, ikinci bir bilim alanı olarak seçtiğim arkeoloji disiplininde yüksek lisans öğrenimimi sürdürürken bu sürecin her aşamasında bilgi, rehberlik ve desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Doç. Dr.Yusuf ALBAYRAK'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Farklı bir disiplinden bu çalışmayı yürütmemde destekleyici yaklaşımıyla katkı sağlayan Prof. Dr. Bahattin ÇELİK'e ayrıca müteşekkirim. Yüksek lisans süreci boyunca bilimsel paylaşımları ve manevi desteğiyle yanımda olan kıymetli arkadaşım Azize TURGUT'a da teşekkür ederim.

Çalışmanın laboratuvar aşamasında değerli katkılar sunan Evrimsel Genetik Laboratuvarı'na ve verilerin değerlendirilmesi aşamasında bilimsel desteğini esirgemeyen Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Ana Bilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Akın YİĞİN'e içten şükranlarımı sunarım.

Bu çalışmanın gerçekleşmesini mümkün kılan ve araştırmalarıma SYL-2024-2679 Nolu "Arkeolojik Bulgularda Bakteriyel Antik DNA Araştırılması" adlı proje ile maddi destek sağlayan Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi'ne, ayrıca akademik süreç boyunca desteklerini hissettiren Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Müdürlüğü ve Arkeoloji Ana Bilim Dalı'na da teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI i
BEYAN ii
TEŞEKKÜR iv
İÇİNDEKİLER v
ÖZET vii
ABSTRACT viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ ix
ŞEKİLLER DİZİNİ x
TABLOLAR DİZİNİ xi
1. GİRİŞ 1
1.1 Konu ve Amaç 1
1.2 Araştırmanın Özgünlüğü/Literatüre Katkısı 1
1.3. Yöntem 2
1.4. Araştırmanın Kapsam ve Sınırlılıkları 3
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Soğmatar Antik Kenti 4
2.2. Myrina Antik Kenti 9
2.3. Arkeoloji ve DNA 10
2.4. Antik DNA Çalışmalarının Bilimsel Ortaya Çıkışı ve Gelişimi 11
2.5. Arkeomikrobiyoloji ve Paleomikrobiyoloji 12
2.6. Antik DNA (aDNA) 14
2.7. Hayvanlardaki Antik Mikroorganizmalar 17
2.8. Arkeolojik ve Tarihi Yapı Malzemelerinin Mikrobiyomları 18
2.9. Bakteriyel aDNA Kaynakları 18
3. MATERYAL VE YÖNTEM 22

3.1. aDNA Eldesi için Kullanılan Arkeolojik Bulgular 22
3.1.1. Kemik Örnekleri 22
3.1.2. Diş Örnekleri 22
3.2. DNA İzolasyonu 24
3.3. DNA'nın Ölçülmesi 26
3.4. PCR Amplifikasyonu 26
3.5. DNA Kütüphanesinin Hazırlanması 27
3.6. İndeks 27
3.7. Kütüphane Basamağı 28
3.8. Biyoinformatik Analizler 28
4. BULGULAR 30
5. TARTIŞMA 53
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 56
7. KAYNAKÇA 58

ÖZET

Bu tezde, Şanlıurfa Soğmatar ve İzmir Myrina antik kentlerinden temin edilen kemik ve diş örneklerinde antik bakteriyel DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş, metagenomik analizler ile antik mikrobiyal topluluk yapıları değerlendirilmiştir. Elde edilen kemik ve diş materyalleri her biri 10'ar örnekten oluşan ikisi kemik, ikisi diş olmak üzere toplam dört örnek havuzu oluşturuldu ve 1. Havuz Kemik - Myrina - 4504, 2. Havuz Kemik – Soğmatar 4505, 3. Havuz Diş -Soğmatar -4506, 4. Havuz Diş - Soğmatar -4507 olarak isimlerndirildi. Bu havuzlardan her birinden ikişer numune olacak şekilde toplam 8 farklı çalışma numunesi oluşturularak analizler için antik DNA izolasyonları yapıldı. Daha sonra yüksek verimli dizileme tabanlı metagenomik analiz uygulandı. Veriler, OTU düzeyinde sınıflandırıldı. 1. Havuz örneklerinden özellikle Actinomycetota, Pseudomonadota, Acidobacteriota, Chloroflexota,Methylomirabilota. 2. Havuz örneklerinden, Actinomycetota, Pseudomonadota, Acidobacteriota, Methylomirabilota, Patescibacteria, GAL15, Chloroflexota 3. Havuz örneklerinden Actinomycetota, Pseudomonadota, Acidobacteriota, Chloroflexota, Methylomirabilota, Patescibacteria, Planctomycetota, Gemmatimonadota. 4. Havuz örneklerinden Actinomycetota, Pseudomonadota, Acidobacteriota, Gemmatimonadota, Nitrospirota, Chloroflexota, Methylomirabilota olarak tanımlanan OTU'lar tespit edildi. Elde edilen bulgular, diş örneklerinde kemiklere kıyasla DNA korunumunun ve mikrobiyal çeşitliliğin daha iyi olduğunu, tespit edilen mikrobiyal profillerin ise hem antik ağız florasını hem de gömüldükleri çevrenin etkilerini yansıtabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Antik DNA, Bakteri, Soğmatar, Myrina, Paleomikrobiyoloji, Tek Sağlık.

ABSTRACT

INVESTIGATING ANCIENT BACTERIAL DNA IN ARCHAEOLOGICAL FINDINGS

In this thesis, it was aimed to obtain ancient bacterial DNA from bone and tooth samples recovered from the excavations of the Şanlıurfa Soğmatar Ancient City and the İzmir Myrina Ancient City and to evaluate the results. The collected bone and tooth materials were grouped into four separate sample pools, each consisting of 10 samples: Pool 1 Bone - Myrina - 4504, Pool 2 Bone - Soğmatar - 4505, Pool 3 Tooth - Soğmatar - 4506, and Pool 4 Tooth - Soğmatar - 4507. From each pool, two samples were selected to form a total of eight working samples, and ancient DNA isolations were performed for analysis. Subsequently, high-throughput sequencing-based metagenomic analysis was applied, and the data were classified at the OTU level. In Pool 1 samples, OTUs identified included Actinomycetota, Pseudomonadota, Acidobacteriota, Chloroflexota, and Methylomirabilota. Pool 2 samples revealed the presence of Actinomycetota, Pseudomonadota, Acidobacteriota, Methylomirabilota, Patescibacteria, GAL15, and Chloroflexota. Pool 3 samples included Actinomycetota, Pseudomonadota, Acidobacteriota, Chloroflexota, Methylomirabilota, Patescibacteria, Planctomycetota, and Gemmatimonadota. Finally, Pool 4 samples were found to contain Actinomycetota, Pseudomonadota, Acidobacteriota, Gemmatimonadota, Nitrospirota, Chloroflexota, and Methylomirabilota. As a result, the presence of richer and more diverse microbial communities in the tooth samples suggested that teeth are more suitable than bones in terms of DNA preservation, and the observed microbial profiles may carry traces of both the ancient oral microbiota and the environment in which the individuals were buried.

Keywords: Ancient DNA, Bacteria, Soğmatar, Myrina, Paleomicrobiology, One Health.

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

aDNA : antik DNA

OTU : Operational Taxonomic Unit

NGS : Next-Generation Sequencing

ETÇ : Erken Tunç Çağı

PCR : Polymerase Chain Reaction

HTS : High Throughput Sequencing

TB : Tüberküloz

µl : Mikrolitre

ng : Nanogram

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Soğmatar, uydudan görünüm……. 4
Şekil 2. Myrina uydudan görünüm……. 10
Şekil 3. Soğmatar kazılarında örnek alınma işlemi ve sonrasında elde edilen kemikler... 23
Şekil 4. Myrina kazılarında örnek alınan mezarlar ve sonrasında elde edilen kemikler.. 23
Şekil 5. 16SV3F ve 16SV3R ile amplifiye edilen PCR'ın PCR ürünleri…….. 30
Şekil 6. 16SV3F ve 16SV3R ile amplifiye edilen 1:10 PCR'ın PCR ürünleri…….. 30
Şekil 7. Örneklerin Phylum düzeyinde taksonomik parmak izi……... 32
Şekil 8. Tüm OTU değerlerinin örnekler bazında gösterilmesi…… 33
Şekil 9. Her bir örnek için hizalama kalitesi……. 33
Şekil 10. Her bir örnek için sınıflandırma benzerliği…… 34
Şekil 11. Bioanalyzer Sonuçları……... 36
Şekil 12. 4504-1 örneğine ait bağıl OTU sonuçları…… 37
Şekil 13. 4504-1 örneğine ait Krona Pasta grafiği…… 37
Şekil 14. 4504-1 örneğine ait belirlenen bakterileri gösteren Krona Pasta grafiği……... 38
Şekil 15. 4504-2 örneğine ait örneğine ait bağıl OTU sonuçları……... 39
Şekil 16. 4504-2 örneğine ait örneğine örneğine ait Krona Pasta grafiği…….. 39
Şekil 17. 4504-2 örneğine ait belirlenen bakterileri gösteren Krona Pasta grafiği…… 40
Şekil 18. 4505-1 örneğine ait örneğine ait bağıl OTU sonuçları……... 41
Şekil 19. 4505-1 örneğine ait örneğine örneğine ait Krona Pasta grafiği…… 41
Şekil 20. 4505-1 örneğine ait belirlenen bakterileri gösteren Krona Pasta grafiği…… 42
Şekil 21. 4505-02 örneğine ait örneğine ait bağıl OTU sonuçları……. 43
Şekil 22. 4505-02 örneğine ait örneğine örneğine ait Krona Pasta grafiği…… 43
Şekil 23. 4505-02 örneğine ait belirlenen bakterileri gösteren Krona Pasta grafiği…… 44
Şekil 24. 4506-1 örneğine ait örneğine ait bağıl OTU sonuçları…….. 45
Şekil 25. 4506-1 örneğine ait örneğine örneğine ait Krona Pasta grafiği…….. 45
Şekil 26. 4506-1 örneğine ait belirlenen bakterileri gösteren Krona Pasta grafiği…… 46
Şekil 27. 4506-2 örneğine ait örneğine ait bağıl OTU sonuçları…….. 47
Şekil 28. 4506-2 örneğine ait örneğine örneğine ait Krona Pasta grafiği…….. 47
Şekil 29. 4506-2 örneğine ait belirlenen bakterileri gösteren Krona Pasta grafiği…… 48
Şekil 30. 4507-1 örneğine ait örneğine ait bağıl OTU sonuçları…… 49
Şekil 31. 4507-1 örneğine ait örneğine örneğine ait Krona Pasta grafiği…….. 49
Şekil 32. 4507-1 örneğine ait belirlenen bakterileri gösteren Krona Pasta grafiği…… 50
Şekil 33. 4507-2 örneğine ait örneğine ait bağıl OTU sonuçları……... 51
Şekil 34. 4507-2 örneğine ait örneğine örneğine ait Krona Pasta grafiği…….. 51
Şekil 35. 4507-2 örneğine ait belirlenen bakterileri gösteren Krona Pasta grafiği…… 52

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1: Arkeomikrobiyoloji ve Paleomikrobiyoloji alanlarının farklılıkları…… 14
Tablo 2. Çalışmada kullanılan örnek havuzları…… 22
Tablo 3. İzole edilen Antik sürüntü örneklerin DNA konsantrasyonları……... 26
Tablo 4. PCR için kullanılarn primerlerin nükleik asid dizileri…… 27
Tablo 5. 16SV3F ile çalışılan 4 örneğin analiz özeti……. 35
Tablo 6. Örneklerin relative OTU sayısı dağılımları…… 35

1. GİRİŞ

Arkeogenetiğin bir alt disiplini olan antik bakteriyel DNA (aDNA) araştırmaları, geçmişteki mikroorganizmaların genetik izlerini koruyarak tarih öncesi toplumların sağlık, hastalık ve çevresel koşullarını aydınlatmaktadır. 1980'li yıllarda antik kalıntılardan DNA elde edilmesiyle başlayan bu araştırmalar, başlangıçta ciddi teknik zorluklarla karşılaşsa da moleküler biyoloji teknolojilerindeki hızlı gelişmeler sayesinde giderek daha güvenilir ve kapsamlı hâle gelmiştir. Özellikle diş pulpası, kemik iliği ve mumyalanmış dokular gibi iyi korunmuş biyolojik örneklerde yapılan bakteriyel DNA analizleri, geçmişteki bulaşıcı hastalıkların tanımlanması, evrimsel süreçlerin izlenmesi ve antik toplumların sağlık durumlarının anlaşılmasında çığır açıcı sonuçlar doğurmuştur. *Yersinia pestis, Mycobacterium tuberculosis* ve *Treponema pallidum* gibi patojenlerin aDNA analizleri, yalnızca mikrobiyolojik evrimlerine ışık tutmakla kalmamış, aynı zamanda bu hastalıkların toplumlar üzerindeki sosyal, kültürel ve demografik etkilerini anlamada kritik bir rol oynamıştır. Antik bakteriyel DNA verileri, arkeolojik bağlamda yorumlandığında, salgın hastalıkların göç, savaş ve toplumsal çöküş gibi büyük tarihsel olaylarla nasıl ilişkilendirilebileceğine dair yeni bakış açıları sunmaktadır.

1.1 Konu ve Amaç

Bu tez çalışmasında Doç. Dr. Yusuf Albayrak tarafından yapılan ve 2020 yılında sonlandırılan Şanlıurfa Soğmatar Antik Kenti kazıları ve halen devam İzmir Myrina Antik kenti kazılarında elde edilen kemik ve diş örneklerinde analizler yapılmıştır. Analizlerde, insan kökenli kemik ve diş örneklerinden antik bakteriyel DNA izole edilmesi, metagenomik yaklaşımlarla tanımlanması ve bulguların paleomikrobiyolojik açıdan değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

1.2 Araştırmanın Özgünlüğü/Literatüre Katkısı

Bu çalışma, Türkiye'nin farklı arkeolojik alanlarından elde edilen insan kökenli kemik ve diş örneklerinden antik bakteri DNA'sının elde edilmesi ve metagenomik düzeyde analiz edilmesi açısından alanında öncülük eden bir araştırmadır. Özellikle diş pulpası ve

kemik matriksinden izole edilen antik mikrobiyal DNA profillerinin metagenomik yaklaşımlarla karşılaştırılması, antik mikrobiyom araştırmalarında örnek materyali tercihinin genetik korunum ve takson çeşitliliği açısından önemini vurgulayan bir metodolojik referans sunmaktadır.

Çalışma kapsamında tanımlanan bakteriyel OTU düzeyindeki bulgular, Anadolu'nun antik mikrobiyal ekosistemine dair ilk sistematik verilerden biri olarak değerlendirilmekte olup, hem paleomikrobiyoloji hem de arkeogenetik disiplinlerine yeni bir bakış açısı kazandırmaktadır. Mevcut literatürde sınırlı sayıda bulunan antik kemik ve diş kaynaklı bakteri DNA analizlerinin Türkiye örneklemiyle desteklenmesi, bölgesel antik sağlık, yaşam koşulları ve çevresel mikrobiyal geçmişe yönelik yorumlara da bilimsel zemin sağlamaktadır.

Ayrıca bu tez çalışmasında kullanılan metodoloji, evrimsel genetik laboratuvar uygulamaları ile sahadan gelen arkeolojik verilerin bütüncül bir şekilde değerlendirilmesini sağlamış; farklı disiplinden gelen bir araştırmacının mikrobiyolojik uzmanlığını arkeolojik örneklerin çözümlemesine entegre etmesi açısından da disiplinlerarası yaklaşımın başarılı bir örneğini ortaya koymuştur.

1.3. Yöntem

Bu çalışmada, arkeolojik kazılardan elde edilen insan kökenli kemik ve diş örneklerinden antik mikrobiyal DNA izole edilmiş, kontaminasyonu önlemek amacıyla antik DNA'ya özgü ön işlem ve ekstraksiyon protokolleri uygulanmış, ardından yüksek verimli yeni nesil dizileme (Next Generation Sequencing, NGS) tabanlı metagenomik analizler gerçekleştirilmiştir.

Örnek hazırlığı aşamasında her biri 10'ar materyalden (kemik veya diş) oluşan toplam dört örnek havuzu oluşturulmuş, bu havuzlardan her birinden ikişer numune oluşturularak analizler yapılmıştır. DNA izolasyon protokolü, antik DNA'ya özgü kontaminasyon önleyici yaklaşımlar dikkate alınarak yürütülmüş; fiziksel temizlik, yüzey dekalsifikasyonu ve kontrollü ortamda ekstraksiyon gibi ön işlemlerle modern DNA bulaşı riski minimize edilmiştir.

İzole edilen DNA'lar, kütüphane hazırlama süreçlerinin ardından, kısa dizi okuma kapasiteli bir NGS platformu kullanılarak dizilenmiştir. Elde edilen diziler kalite kontrol (QC) işlemlerinden geçirilmiş ve biyoinformatik analiz için uygun formata getirilmiştir.

Veriler, OTU (Operational Taxonomic Unit) düzeyinde sınıflandırılmış; antik DNA'ya özgü bozulma paternleri ve düşük bolluk düzeyleri göz önünde bulundurularak analizler yapılmıştır. Taksonomik tanımlamalar, SILVA ve Greengenes gibi referans veritabanları ile karşılaştırmalı olarak yürütülmüş ve örnekler arası mikrobiyal çeşitlilik karşılaştırmaları yapılmıştır.

Bu yöntemsel yaklaşım sayesinde, arkeolojik insan kalıntılarında mikrobiyal topluluk yapıları filogenetik düzeyde belirlenmiş; özellikle diş ve kemik örneklerinden elde edilen verilerin karşılaştırmalı değerlendirmesi sağlanmıştır.

1.4. Araştırmanın Kapsam ve Sınırlılıkları

Bu araştırma, Türkiye'deki iki farklı arkeolojik alandan elde edilen insan kökenli kemik ve diş örnekleri kullanılarak, antik bakteriyel DNA'nın metagenomik düzeyde analiz edilmesini kapsamaktadır. Çalışma kapsamında, her biri 10'ar örnekten oluşan dört havuz örneği hazırlanmış; bu havuzlardan temsilen alınan numunelerden izole edilen DNA'lar, yüksek verimli dizileme (NGS) teknolojisi ile analiz edilmiştir. Araştırmanın temel amacı, diş ve kemik örneklerinden izole edilen antik mikrobiyal DNA profillerinin metagenomik yaklaşımlarla karşılaştırmalı analiziyle, antik mikrobiyal çeşitliliği ve taksonomik yapıyı ortaya koymaktır.

Araştırmanın kapsamı, yalnızca OTU düzeyinde filogenetik analizlerle sınırlı olup, tür düzeyinde tam tanımlamalara ulaşılamamıştır. Bu durum, antik DNA'nın doğası gereği düşük miktarda, parçalanmış ve bozulmuş olmasıyla ilişkili olabilir. Bu nedenle tür düzeyinde tanımlamalar için çalışmalara devam etmek gerekir. Ayrıca analiz edilen örnek sayısının sınırlı olması ve yalnızca iki anatomik materyal (kemik ve diş) üzerinden çalışılmış olması da genellenebilir sonuçlar elde etmeyi kısıtlamaktadır.

Çalışmada kullanılan veritabanlarının sınıflandırma gücü, özellikle antik mikrobiyal türlerin tanımlanmasında bazı sınırlılıklar yaratmış olabilir. Bunun yanı sıra, çevresel kontaminasyon ihtimali her ne kadar laboratuvar uygulamalarıyla minimize edilmeye çalışılsa da, antik DNA çalışmalarının yapısal zorlukları arasında yer almaktadır.

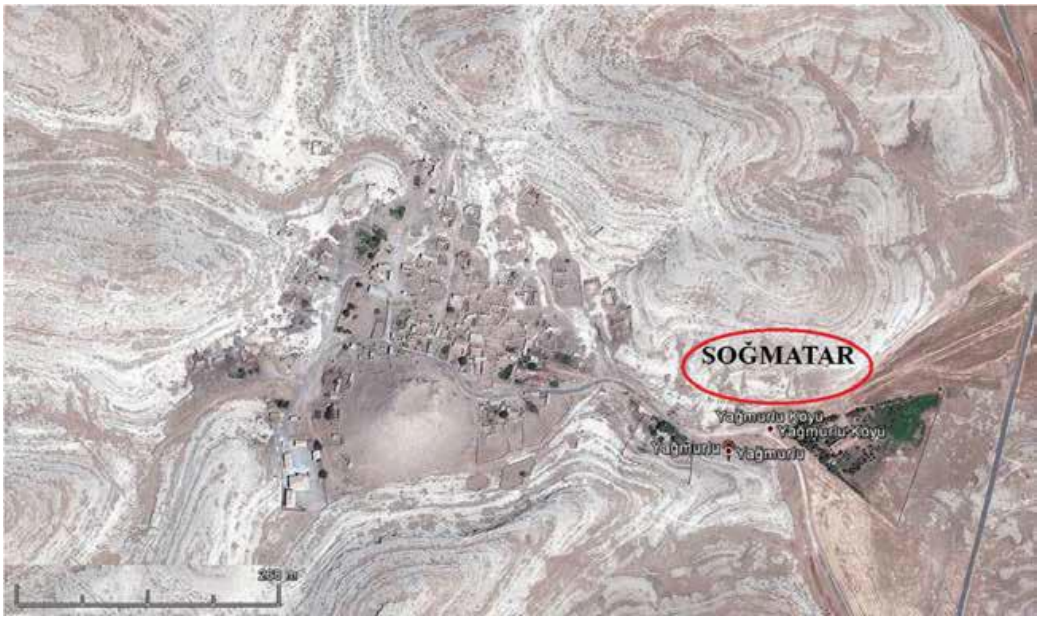
Tüm bu sınırlamalara rağmen çalışma, Türkiye'de antik mikrobiyom araştırmaları açısından önemli bir başlangıç noktası teşkil etmekte ve gelecekte yapılacak daha geniş ölçekli çalışmalar için metodolojik bir temel sunmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Soğmatar Antik Kenti

Antik çağda Edessa Krallığı'nın sınırları içinde yer alan Soğmatar, günümüzde Şanlıurfa il merkezinin yaklaşık 60 km güneydoğusunda, Harran ilçesinin ise 40 km kuzeydoğusunda, Tektek Dağları'nın önemli su kaynaklarının bulunduğu bir bölgede konumlanmaktadır [Duval, 1975, s. 36; Albayrak, 2015, s. 271].

1901 ve 1905 yıllarında bölgeyi ziyaret eden Fransız Konsolosu H. Pognon, Soğmatar'da sürekli bir yerleşimin bulunmadığını, ancak bedevilerin hayvanlarını sulamak amacıyla burada bir araya geldiklerini ifade etmiştir [Pognon, 1907, s. 23]. 1952'de bölgeye gelen Segal ise birkaç gün süren gözlemleri sırasında, az sayıda yerleşik nüfusun bulunduğunu ve bir jandarma karakolunun varlığını tespit etmiştir [Segal, 1953, s. 97].
1950'li yıllardan itibaren yerleşimin yoğunlaştığı Soğmatar'da hane sayısı zamanla iki yüz civarına ulaşmıştır. Bu süreçte, antik dönem yapılarının önemli bir kısmı tahribata uğramış; bu yapılardan sökülen taş bloklar, yeni inşa edilen evlerde ve bahçe duvarlarında devşirme malzeme olarak kullanılmıştır. Günümüzde "Yağmurlu Köyü" olarak adlandırılan bu yerleşimden, çeşitli nedenlerle gerçekleşen göçler sonucunda hane sayısı 20'ye kadar düşmüştür.



Şekil 1. Soğmatar, Uydudan Görünüm. (Albayrak 2020a, s. 26)

Soğmatar'ın yer aldığı arazi, çoğunlukla alçak tepelerden oluşan kayalık bir yapıya sahiptir. Alanın giriş kısmında bir höyük yer almakta olup (Şekil 1), bu höyüğün kuzey ve güney sırtları ile batısındaki tepelerde toplamda 108 adet kaya mezarı tespit edilmiştir. Mezarlar, höyüğü çevreleyen bir çember oluşturacak biçimde yoğunlaşmış durumdadır.

Höyükten uzaklaştıkça mezarların yoğunluğunun azaldığı gözlemlenmektedir. Tüm mezarların girişlerinin höyüğe yönelmiş olması, dikkat çeken bir özelliktir. İlginç b ir başka husus ise, höyüğü görmeyen tepelerde hiç kaya mezarına rastlanmamasıdır. Günümüzde bu mezarların büyük ölçüde tahrip olduğu, bazılarının ahır veya depo gibi işlevlerle kullanıldığı hem iç bölümlerinde hem de girişlerinde ciddi zararlar oluştuğu görülmektedir (Albayrak, 2019a, s. 185).

Soğmatar'ın batı bölümünde yer alan bir tepenin doğuya bakan yamacındaki taş ocağında, ölçüleri 3.35 m uzunluk, 3.60 m genişlik ve 80 cm kalınlık şeklinde olan bir blok üzerinde taslak hâlinde bir aslan figürü yer almaktadır. Bu heykelin bulunduğu kaya kütlesinden ayrıldığı, ancak tamamlanmadan bırakıldığı ve sadece dış hatlarının (konturlarının) belirginleştirildiği görülmektedir. Albayrak ve Mutlu (2014) tarafından höyükte gerçekleştirilen yüzey araştırması sonucunda, seramikler temel alınarak Kalkolitik Dönem'e ait yoğun taşçık katkılı, kaba yapım seramik parçalarının az da olsa bulunduğu görülmüştür.

Albayrak (2019; 2020) tarafından Soğmatar'ın Erken Tunç Çağı ve Roma Dönemi'nde bir nekropol alanı olarak kullanıldığını kanıtlar nitelikte kazı ve araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda, 77'si nekropol alanında, 17'si ise bu alanın dışında olmak üzere toplam 94 kaya mezarı tespit edilmiştir. Ayrıca, iki tepe üzerinde ana kayaya oyulmuş beş adet tekne tipi mezar da yer almaktadır. Mezarların büyük çoğunluğu Erken Tunç Çağı'na, diğerleri ise Roma Dönemi'ne tarihlendirilmektedir.

Kaya mezarları mimari açıdan birbirinden farklılık göstermektedir. Bu mezarları; basit girişli tek odalı mezarlar, dikdörtgen planlı tek odalı dromoslu mezarlar, geçişli iki odalı mezarlar, dromoslu çok odalı mezarlar, arcosolium'lu tek odalı mezarlar, arcosolium'lu çok odalı mezarlar ve tek odalı sekili mezarlar şeklinde sınıflandırmak mümkündür. Ayrıca, Dokuz Tepe olarak adlandırılan alanda, üzerinde anıtsal yapılar bulunan ve "tonozlu mezar" olarak tanımlanan mezar türleri de yer almaktadır. Günümüzde bu mezarların üzerindeki anıtsal yapılar yıkıntı hâlinde olup, mezar girişleri tamamen kapanmış durumdadır. Araştırıcılar tarafından Soğmatar'da 20 adet taş ocağı tespit

edilmiştir. Bu taş ocaklarının 9 tanesi, Dokuz Tepe'de yer alan tonozlu mezarların hemen yanında bulunmaktadır. Bu durum, mezarlardaki tonozların inşasında kullanılan taşların doğrudan bu ocaklardan sağlandığını göstermektedir. Geriye kalan taş ocaklarının 3'ü kaya mezarlarının hemen yanında, 8'i ise kaya mezarlarına yakın konumdaki tepelerde yer almaktadır (Albayrak ve Çelik, 2022, s. 48).

Soğmatar Kaya Mezarları

Soğmatar'da kaya mezarları hem nekropol alanında hem de bu alanın dışında kalan bölgelerde yer almaktadır. Girişte, sağ taraftaki alçak bir tepenin eteğinde 80'in üzerinde kaya mezarı birbirine oldukça yakın konumda yer almakta olup bu alan, yoğun mezar yoğunluğu nedeniyle nekropol olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte, Soğmatar'ın çeşitli noktalarına dağılmış başka kaya mezarlarının varlığı, tüm yerleşim alanının bir nekropol alanı olarak değerlendirilmesini mümkün kılmaktadır. Soğmatar'daki kaya mezarları mimari özelliklerine göre Erken Tunç Çağı ve Roma Dönemi kaya mezarları olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır (Albayrak ve Çelik, 2022, s. 48).

Erken Tunç Çağı Kaya Mezarları

Sayıca en fazla kaya mezarı nekropol alanında yer almaktadır. Bu alan, şehre girişte solda kalan kayalık alçak tepenin güneye bakan eteklerinde bulunmaktadır. Bu bölgedeki 77 kaya mezarı, düzensiz bir şekilde, birbirine olabildiğince yakın yerleştirilmiştir. Mezarların ilk olarak Erken Tunç Çağı'nda inşa edildiği, bazı örneklerin ise Roma Dönemi'nde değiştirilerek yeniden kullanıldığı anlaşılmaktadır. Bunların 53'ü özgün Erken Tunç Çağı özelliklerini korumaktadır. Bu 53 mezar, mezar girişine ulaşmak için ana kayaya dikine açılmış bir kuyu, kuyunun kuzey duvarında yer alan giriş açıklığı ve bir mezar odasından oluşmaktadır. Kuyu planları kare, dikdörtgen ya da ovaldir. Giriş genişlikleri 100–250 cm, yükseklikleri ise 150–250 cm arasında değişmektedir. Kuyu bölümünden mezar odasına geçişi kolaylaştırmak amacıyla, sayıları bir ila üç arasında değişen basamaklar ile doğu ve batı duvarlarına oyulmuş ayak dayama çıkıntıları ve nişler yapılmıştır. Bazı mezarlarda bu tür bir basamak sistemi bulunmamakta, dolayısıyla mezar odasına ulaşmak oldukça zorlaşmaktadır. Giriş açıklıkları, bir insanın ancak eğilerek geçebileceği boyutlardadır (Albayrak ve Çelik, 2022, s. 48).

Mezarların tamamı tek odalıdır. Oda yükseklikleri genellikle bir insanın eğilerek hareket edebileceği ölçüdedir. Oda genişlikleri 150–400 cm, uzunlukları ise 150–450 cm arasında değişmektedir. Mezar odalarının büyük çoğunluğu sade bir şekilde oyulmuştur. Ancak beş mezar mimari açıdan dikkat çekicidir (Albayrak vd, 2019, s. 267). Bu mezarlarda, girişin sağ ve solunda oda ortasına kadar uzanan sekiler, duvarlarda nişler ve karşı duvarda sunak yer almaktadır. Söz konusu sunaklar, girişin karşısındaki duvarın tam ortasında, ana kayaya bağlı biçimde oyularak yapılmıştır. Bazı mezar odalarının tam ortasında tekne tipi, oval planlı yükseltiler; bazılarında ise kare planlı yükseltiler görülmektedir (Albayrak ve Çelik, 2022, s. 49).

Roma Dönemi Kaya Mezarları

Nekropol alanında yer alan 12 mezar, Roma dönemi kaya mezar mimarisi özelliklerini yansıtmaktadır. Bu mezarlar ilk olarak Erken Tunç Çağı'nda yapılmış; kuyu şeklindeki giriş kısmı üzeri açık, merdivenli dromos (koridor) haline dönüştürülmüş, mezar odası girişi genişletilmiş ve mezar odasının giriş karşısı ile yan duvarlarına ölülerin konulduğu arcosoliumlar açılmıştır. Tek odalı mezar geleneği ise değiştirilmemiştir.

Nekropol alanı dışında, alçak tepeler üzerinde 17 kaya mezarı yer almaktadır. Bu mezarların tamamı Roma Dönemi'nde yapılmış olup, her yönüyle Roma dönemi kaya mezar mimarisini yansıtmaktadır. Bu mezarları plan açısından; merdivenli dromoslu tek odalı, üç arcosoliumlu mezarlar; merdivenli dromoslu geçişli iki odalı, beş arcosoliumlu mezarlar; merdivenli dromoslu üç odalı, dokuz arcosoliumlu mezarlar ve merdivenli dromoslu tek odalı klineli mezarlar şeklinde sınıflandırmak mümkündür (Albayrak, 2019a, s. 197)

Mezar Hediyeleri ve Buluntular

Soğmatar'da kaya mezarlarından sadece Erken Tunç Çağına ait olanlarda mezar hediyeleri ele geçmiştir. Bu hediyeler arasında en önemlileri, çocuk mezarlarında bulunan oyuncaklardır. Bu oyuncaklar, pişmiş topraktan yapılmış minyatür arabalar, at (eşek/onager) figürinleri ve kuş biçiminde çıngıraklardan oluşmaktadır. Ayrıca, pişmiş topraktan yapılmış çok sayıda sunu kabı da buluntular arasında yer almaktadır. Mezar içlerinde yoğun miktarda insan ve hayvan kemikleri de bulunmuştur (Albayrak ve Çelik, 2022, s. 54). Mezar hediyelerinin bulunmuş olması bu mezarların daha önceden açılmadığını düşündürmektedir.

Plan açısından, Soğmatar'da görüldüğü gibi oda mezarlarında mezar odası girişleri düz, kuyu biçimli, rampalı ve merdivenli girişler gibi farklılıklar; tek, ikili ya da çok odalı

plan tipleri görülse de, genel yapı ve kullanım amacı açısından bütünlük sergilemektedir. Tunç Çağı'nın yaygın mezar türlerinden olan oda mezarlar, bölge ve kültürlere göre farklı karakterler göstermektedir. Tunç Çağı'nın erken evrelerinden başlayarak, Alaca Höyük prens mezarları ve tüm çağ boyunca özellikle Kuzey Suriye'de yaygın olan, yeraltına ya da yer üstüne taş duvarlarla yapılanların yanı sıra kayalara oyularak oluşturulan oda mezarlar, Anadolu'nun Güneydoğu kesimini etkilemiştir (Orthmann ve Rova 1991, Lev. 33-42).

Albayrak ve Çelik (2022) Erken Tunç Çağı'na tarihlendirilen Soğmatar nekropol alanındaki oda kaya mezarları ile Roma dönemi oda mezarlarına yönelik yaptıkları sınıflamada dört ana mezar grubu ön plana çıkmaktadır:

Tek Odalı Mezarlar

Geçişli İki Odalı Mezarlar

Çoklu Oda Mezarlar

Arcasoliumlu Oda Mezarlar

Nekropol alanında bulunan Erken Tunç Çağına ait mezar odalarının tavan ve duvarlarının kireç ile sıvandığı tespit edilmiştir. Soğmatar'da Erken Tunç Çağı mezarlarında tümünde ceset gömme (inhumasyon) uygulanmıştır. Mezarlarda bulunan kemikler bazen tek bir bireye aitken, bazı mezarlarda ise çok sayıda kemik bulunmuştur. Farklı yaş gruplarına ait kemiklerin bir arada bulunması, bu mezarların aile mezarı olarak kullanıldığını göstermektedir. Özellikle çocuk kemiklerinin ve çocuk oyuncaklarının bulunduğu mezarlar ise çocuk mezarlarına işaret etmektedir. Mezar girişlerinin, aynı anda birkaç kişi tarafından kaldırılabilen ağırlıkta taş bloklarla kapatılması ve mezarlarda yoğun kemik bulunması, ikincil gömü uygulamalarının varlığına işaret etmektedir.

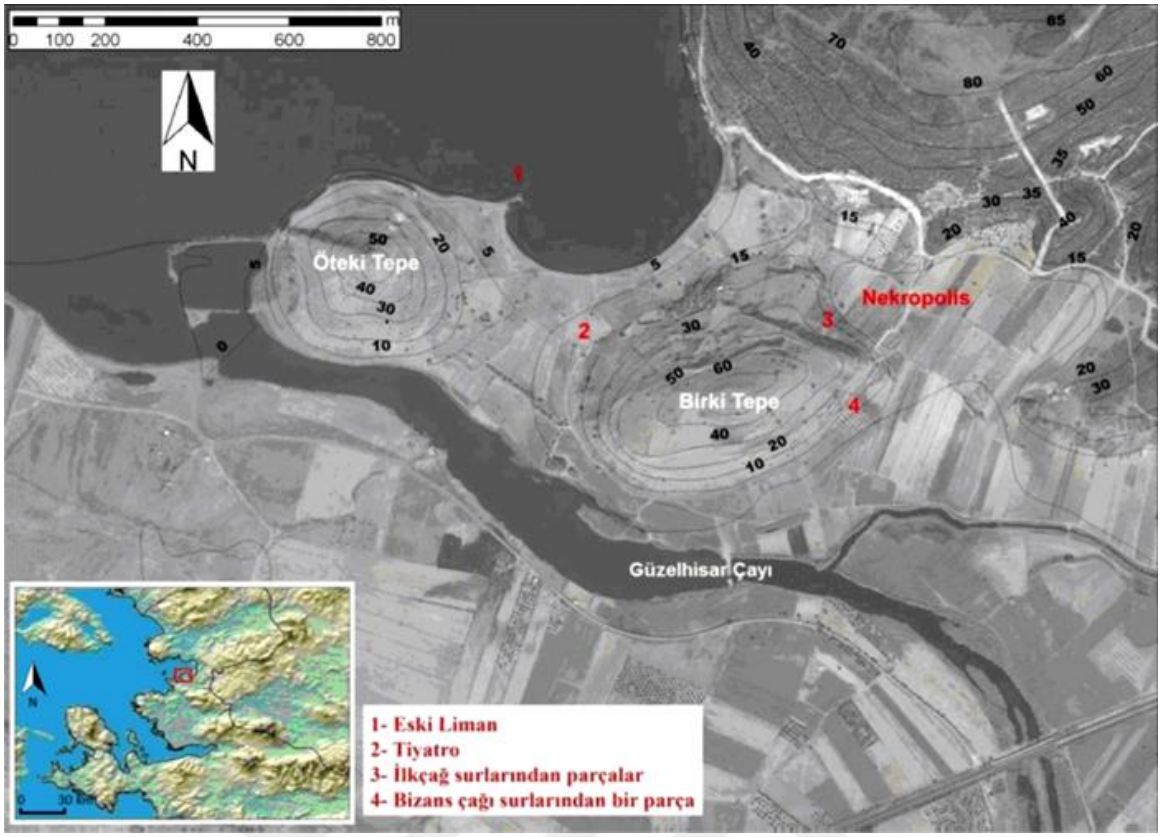
Soğmatar Roma dönemi mezarlarında en az üç arcasolium bulunmaktadır. Arcasoliumlar kaya mezarından anıt mezara kadar birçok mezar tipinde yaygın bir uygulamadır. Tek odalı mezarlarda üç arcasolium bulunması, en az üç kişinin bu mezarlara defnedildiğini göstermektedir. Tek odalı bazı mezarların zemininde açılan kemik çukurları (botroslar), bu mezarlarda çoklu gömülerin yapıldığını göstermektedir. Çok odalı kaya mezarlarında ise arcasolium sayısı oda sayısına göre değişmekte olup, bu da çok odalı mezarların aile mezarları olduğunu kanıtlamaktadır Albayrak ve Çelik, 2022, s. 57).

2.2. Myrina Antik Kenti

Myrina, İzmir ili, Aliağa ilçesinin kuzeyinde, Çandarlı Körfezi (Elaitikos) kıyısında bulunmaktadır ve Güzelhisar Çayı'nın (Titnaios ya da Pythikos) ağız kısmında yer alır (Bean, 1997, s. 87). Myrina antik kenti, Kyme, Larissa, Neonteikhos, Temnos, Killa, Notion, Aigiroessa, Pitane, Aigai, Smyrna ve Gryneion ile beraber kent birliği oluşturmuş 12 Aiol kentinden birisidir (Herodotos, 1.149). Myrina, Beriki Tepe ve Öteki Tepe adlı iki tepe üzerine kurulmuş bir liman kentidir (Umar, 1993, s. 598).

Myrina'da ilk kazılar 1880-1882 yılları arasında Atina Fransız Okulu üyeleri E. Pottier ve S. Reinach tarafından nekropol alanında yapılmıştır. Kentin kuzeydoğusunda düzlük ve eğimli alanlar üzerinde yer alır nekropol alanında 5000 civarında mezarda kazı çalışması yapılmıştır (Pottier vd, 1887, s. 58). Mezarlar içerdikleri eşyaların zenginliği bakımından büyük çeşitlilik gösterirler. Sikkeler, yemek ve içki ile ilgili kaplar, gündelik yaşamda kullanılan eşyalar, kandiller, aynalar, iğneler, koku kapları ve kentin ünlü pişmiş toprak figürinleri mezar hediyeleri arasındadır. Kıymetli takılara ise daha az rastlanmıştır. Sikkelerin neredeyse hepsi Myrina sikkesidir ve Büyük İskender'den (III. Aleksandros) İmparator Tiberius'a kadar süreklilik gösterir. Myrina'da ilk kez yapılan bu kazılarda çok sayıda Hellenistik ve Roma İmparatorluk Dönemi'ne tarih lenen figürin bulunmuştur. Kazılar sırasında ele geçen 1000 civarında pişmiş toprak figürin arasında erkeklere, kadınlara, çocuklara, tanrılara ve hayvanlara rastlanır. Ayrıca grotesk ve komedi tarzındaki figürinler ile birlikte masklar da bulunmaktadır (Bean, 1997, s. 89). Myrina antik kenti hakkında bilgi veren antik yazarlardan Strabon Anadolu'daki bazı kentler gibi Myrina'nın da Amazonlar tarafından kurulduğunu söyler (Strabon, 13. 3. 5). . Myrina'nın Roma İmparatorluğu'nda Sebastopolis olarak anıldığını ve civitas libera, yani "özgür kent" olduğunu belirtilir (Smith, 1860, s. 533).

İki tepe üzerine kurulmuş olan bu kentin akropolünü oluşturan Beriki Tepe'de araştırmalar yapmış olan Sayce, buluntulara göre bu tepedeki yerleşimi Prehistorik döneme tarihlemiştir. Daha sonraki yıllarda ise özellikle Myrina kentinde yaşamış zengin ailelerin, bu alanı mezarlık olarak kullandığını belirt miştir (Sayce, 1882, s. 222). 1970'li yıllarda Bergama Müzesi tarafından, yine kentin nekropol alanında başka çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaların sonucunda da yine pişmiş toprak figürinlerin devamı ele geçmiştir. Antik kentte son yıllarda Doç. Dr. Yusuf Albayrak bilimsel danışmanlığında kazılar yürütülmektedir (Kaya ve Albayrak, 2024, s. 96).



Şekil 2. Myrina Uydudan Görünüm. (Vardar ve Yavaşlı, 2016, s. 166)

2.3. Arkeoloji ve DNA

Arkeoloji, Antik Yunanca kökenli bir terim olup, "arkhaios" (eski) ve "logos" (bilim) kelimelerinin birleşiminden oluşur. İnsanlığın geçmişe dair duyduğu merakın, titizlik ve saygı gerektiren sistematik bir bilim dalına dönüşmüş halidir. Bir başka tanıma göre arkeoloji; asla doğrudan gidemeyeceğimiz zamanlara yolculuk yapmamızı, nereden geldiğimizi keşfetmemizi ve "Biz kimiz?" gibi temel sorulara yanıt bulmamızı sağlayan bir disiplindir (Gamble, 2014, s. 1). Temelde arkeoloji, insanlık tarihini anlamaya yönelik bir bilim dalıdır. Eski çağlarda yaşamış toplumların günümüze ulaşan maddi kalıntılarını inceleyerek bunları belgelemek ve yorumlamakla görevli bir alandır. Türkçeye "kazıbilim" olarak geçmiş olsa da, kazı sadece arkeolojide kullanılan bir yöntemdir; arkeoloji çok daha geniş bir faaliyet alanını kapsar. Bu alan, sıcak çöllerde yapılan kazılar, laboratuvarlarda gerçekleştirilen detaylı analizler, çizimler ve bunların anlamları üzerinde düşünmeyi içerir (Renfrew ve Bahn, 2017, s. 19).

Arkeoloji bilimi, yazılı kaynakların yetersiz olduğu ya da hiç bulunmadığı dönemlerde tarihsel boşlukları doldurmak ve insanlık geçmişini sağlam temeller üzerine

oturtmak amacıyla ortaya çıkmıştır. İnsan elinden çıkmış maddesel kültür kalıntılarını inceleyerek geçmişimizi aydınlatmayı hedefler (Özbilen, 2020, s. 41). Örneğin, insanlık tarihinin milyonlarca yıl süren yazısız dönemleri ancak arkeoloji sayesinde öğrenilebilir. Ayrıca, Protohistorik ve Historik çağların henüz aydınlanmamış yönleri de bu bilim aracılığıyla açıklığa kavuşur. Bu nedenle arkeoloji, tarih bilimiyle kopmaz bir bağ içerisinde olmalı ve ancak tarihsel çerçeve içinde ele alındığında gerçek değerini kazanır. Aksi takdirde, amaçsız bir uğraş haline dönüşebilir (Sevin, 1999, s. 15). Bilim ve teknolojide gerçekleşen hızlı ilerleme, arkeolojik buluntulardan mikrobiyolojik yöntemlerle geçmişe ait veriler elde edilmesine kapı açmıştır.

2.4. Antik DNA Çalışmalarının Bilimsel Ortaya Çıkışı ve Gelişimi

Antik DNA (aDNA) çalışmaları, modern moleküler biyolojinin arkeoloji ile kesişim noktasında yer alan, disiplinler arası bir araştırma alanı olarak 1980'li yılların ortalarında bilimsel bir nitelik kazanmaya başlamıştır. İlk başarılı antik DNA izolasyonu 1984 yılında Higuchi ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiş; bu çalışmada 140 yıllık bir *Equus quagga* (soyu tükenmiş zebra türü) örneğinden mitokondriyal DNA elde edilmiştir (Higuchi et al., 1984). Bu dönüm noktası, genetik materyalin yalnızca modern bireylerden değil, arkeolojik ve paleontolojik örneklerden de elde edilebileceğini kanıtlamıştır.

DNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmasının 1985 yılında keşfi (Mullis ve Faloona, 1987, s. 336), antik DNA çalışmalarında bir devrim yaratmıştır. PCR teknolojisinin sağladığı yüksek duyarlılık, antik kalıntılardaki düşük miktardaki DNA'nın analiz edilebilmesini mümkün kılmış ve bu sayede eski insan popülasyonları, hayvan türleri ve bitkilerin genetik yapılarının incelenmesi önündeki teknik engeller büyük ölçüde ortadan kalkmıştır (Pääbo, 1989, s. 645). Ancak erken dönem antik DNA araştırmaları, kontaminasyon riski, DNA'nın bozulma hızı ve sonuçların tekrarlanabilirliği gibi sorunlarla gölgelenmiştir. Bu problemler, özellikle DNA'nın çevresel koşullara bağlı olarak hızlıca parçalanabildiği düşünülerek bilim camiasında şüpheyle karşılanmasına neden olmuştur. 1990'lı yıllarda geliştirilen protokoller ve temiz oda standartları, aDNA araştırmalarında güvenilirliği artırmış; izole edilen DNA'nın modern kaynaklı olmadığını gösteren yöntemlerin geliştirilmesi ile disiplin daha sağlam temellere oturmuştur (Cooper ve Poinar, 2000, s. 1139).

2000'li yıllarla birlikte yüksek verimli dizileme teknolojilerinin (next-generation sequencing, NGS) uygulanmaya başlanması, antik genom çalışmalarında çığır açmıştır. Özellikle 2010 yılında yayınlanan ve Neandertal insanının genomunun büyük oranda dizilendiği çalışma (Green vd, 2010, s. 711), bu teknolojilerin potansiyelini net bir şekilde ortaya koymuştur. Günümüzde antik DNA araştırmaları, yalnızca bireysel dizilimlerle sınırlı kalmayıp, paleogenomik, paleomikrobiyoloji ve evrimsel biyoinformatik gibi alt disiplinlerle zenginleşmiştir. Bu sayede antik toplulukların göç yolları, demografik yapıları, sağlık profilleri ve çevresel adaptasyon süreçleri hakkında daha bütüncül ve nesnel bilgiler elde edilebilmektedir (Slatkin ve Racimo, 2016, s. 6380).

Antik DNA çalışmaları, arkeolojik verilerin yorumlanmasına güçlü bir moleküler boyut ekleyerek, geçmişe dair bilgilerimizi genetik veriler aracılığıyla derinleştirmektedir. Bu alanın gelişimi, teknolojik ilerlemeler ve metodolojik disiplinle birlikte hız kazanmış ve arkeogenetik, günümüzde geçmişin biyolojik izlerini çözümleyen en önemli araçlardan biri hâline gelmiştir.

2.5. Arkeomikrobiyoloji ve Paleomikrobiyoloji

Arkeoloji ve mikrobiyoloji arasındaki kesişim noktası, son yıllarda bilim dünyasında büyük ilgi görmektedir. Bu bağlamda "arkeomikrobiyoloji" ve "paleomikrobiyoloji" gibi iki yakın terim ortaya çıkmıştır. Her ikisi de geçmişe ait mikrobiyal yaşamın incelenmesini hedeflese de, amaçları, kapsamları ve metodolojileri bakımından belirgin ayrımlar taşımaktadır.

Arkeomikrobiyoloji, arkeolojik materyaller üzerinde yaşayan veya yaşamış mikroorganizmaların incelenmesini konu alan bir disiplindir. Bu alan, özellikle yapı malzemeleri (örneğin, tarihi tuğlalar, taşlar, boyalar) ve arkeolojik kalıntılar üzerindeki mikrobiyal toplulukları analiz ederek, bu yapıların bozulma süreçlerini anlamayı ve koruma stratejileri geliştirmeyi amaçlar (Saiz-Jimenez, 1999, s. 206; Piñar vd, 2015, s. 150). Örneğin, Adamiak vd. (2018), tarihi tuğlalar ve boyalar üzerinde halotolerant (tuza toleranslı) türleri tespit ederek, yapıların bozulmasıyla ilişkili mikroorganizmaları ortaya koymuşlardır. Arkeomikrobiyoloji, mikrobiyal biyo-bozulma süreçlerini anlamak ve kültürel mirasın korunmasına katkı sağlamak için önemlidir. Bu disiplin, yapıların mikrobiyal bozulma mekanizmalarını çözümleyerek, restorasyon ve koruma çalışmalarına bilimsel bir temel sunar. Arkeomikrobiyoloji esasen kültürel mirasın korunması ile doğrudan

ilişkilidir. Örneğin, tarihi yapılarda biyolojik bozulmaya neden olan mikroorganizmaların belirlenmesi ya da mumyaların mikrobiyal degradasyon süreçlerinin analiz edilmesi bu disiplinin ilgi alanına girer (González ve Saiz-Jimenez, 2005, s. 190). Arkeomikrobiyoloji terimi, özellikle 1990'lardan sonra kültürel miras yönetimi ve biyolojik bozulma süreçlerine dair çalışmaların yoğunlaşmasıyla literatürde daha sık yer almaya başlamıştır.

Paleomikrobiyoloji, antik kalıntılardan elde edilen mikroorganizma kalıntıları üzerinde yapılan mikrobiyolojik çalışmaları içeren bir disiplindir. Bu alan, antik DNA (aDNA) analizleri yoluyla, geçmişteki enfeksiyon hastalıklarını, mikrobiyal evrimi ve antik toplumların sağlık durumlarını araştırır. Örneğin, Ötzi'nin (5300 yıllık bir buz adamı) bağırsaklarında *Helicobacter pylori* DNA'sının tespiti, bu alandaki önemli çalışmalardandır**.** Paleomikrobiyoloji, antik toplulukların yaşam koşulları, beslenme alışkanlıkları ve hastalıkları hakkında bilgi sağlar. Bu disiplin, arkeoloji, antropoloji ve genetik gibi alanlarla iş birliği içinde çalışarak, insanlık tarihine dair yeni bakış açıları sunar (Keskin ve Albayrak, 2023, 112-114). Paleomikrobiyoloji, antik mikroorganizmaların DNA, protein veya hücre kalıntılarının analizi ile eski patojenlerin tanımlanması, evrimsel geçmişlerinin anlaşılması ve insan–mikroorganizma etkileşimlerinin tarih boyunca nasıl geliştiğine dair bilgiler üretmeyi amaçlar (Drancourt ve Raoult, 2005, s. 24; Devault vd, 2014, s. 2522).

Paleomikrobiyoloji'nin bilimsel temelleri, aDNA çalışmalarının 1980'lerde başlamasıyla atılmıştır (Pääbo, 1985, 646). İlk başarılar arasında antik insan kalıntılarında *Mycobacterium tuberculosis* DNA'sının tanımlanması (Spigelman ve Lemma, 1993, s. 138-141) ve *Yersinia pestis* gibi salgın hastalık etkenlerinin kalıntılarda saptanması yer almaktadır (Bos vd, 2011, 506-510).

Bu alan, epidemiyoloji, moleküler antropoloji ve evrimsel mikrobiyoloji ile yakın ilişkilidir. Ayrıca zoonotik hastalıkların tarihsel izlerinin takibi açısından da önemlidir.

Arkeomikrobiyoloji ve paleomikrobiyoloji, geçmişteki mikroorganizmaları inceleyen, birbiriyle ilişkili ancak farklı hedeflere sahip iki ayrı bilim dalıdır. Arkeomikrobiyoloji, kültürel mirasın mikrobiyal etkileşimler çerçevesinde korunmasına ve anlaşılmasına katkı sağlarken; paleomikrobiyoloji, insanlık tarihindeki hastalık yükünü ve mikrobiyal evrimi çözümlemeyi amaçlar. Her iki alan da çok disiplinli iş birliğini gerektirir ve bilimsel gelişmeler doğrultusunda daha da derinleşecektir. Bu iki disiplinin temel farklılıkları Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1: Arkeomikrobiyoloji ve Paleomikrobiyoloji Alanlarının Farklılıkları

Özellik	Arkeomikrobiyoloji	Paleomikrobiyoloji
Tanım	Arkeolojik materyallerde canlı ya da cansız mikroorganizmaların tanımlanması ve atkilerinin araştırlmasıu	Antik kalıntılardan elde edilen patojen ya da diğer mikroorganizmaların moleküler analizi
Amaç	Kültürel miraasın korunması, biyolojik mirasın araştırılması	Hastalık etkenlerinin tarihi, mikrobiyal evrim ve eski salgınların ortaya çıkarılması
Materyal türü	Yapı taşları, mezar taşları, tarihi nesneler, toprak	İskeletler, diş pulpası, mumyalar, dışkı kalıntıları, çevresel tortular
Mikroorganizma durumu	Genellikle halen aktif ya da sonradan bulaşan mikroorganizmalar	Genetik materyali korunmuş ölü antik mikroorganizmalar
Yöntemler	Kültür teknikleri, mikroskopi, SEM/TEM, biyofilm analizleri, moleküler biyoloji teknikleri	PCR, qPCR, metagenomik dizileme, antik DNA analizleri,
İlişkili Disiplinler	Biyolojik restorasyon, malzeme bilimi, konservasyon bilimi.	Moleküler biyoloji, paleopatoloji, evrimsel genetik.
Uygulama alanları	Kültürel mirasın korunması, yapı restorasyonu	Antik hastalıkların teşhisi, mikrobiyal evrim çalışmaları
Örnek çalışmalar	Tarihi yapıların mikrobiyal bozulma analizleri	Antik iskeletlerden patojen DNA'larının tespiti

2.6. Antik DNA (aDNA)

Antik DNA (aDNA), tarihi ve arkeolojik örneklerde bulunan; deri, diş, toprak, müze örnekleri, koprolitler, kalsifiye diş plağı ve kemikler gibi arkeolojik kaynaklardan başarıyla elde edilen kalıntı genetik materyaldir (Burrell vd, 2015, s. 35-44). Antik DNA, modern DNA veya paleontolojik çalışmaların tek başına sağlayamayacağı geçmişe dair doğrudan bilgiler sunar. Bu alandaki ilk atılım, Higuchi vd. (1984) tarafından gerçekleşmiş; zebranın akrabası olan ve soyu tükenmiş quagga (Equus quagga)'nın 150 yıllık bir müze örneğinden, bakteriyel klonlama yoluyla zor bir şekilde küçük bir antik DNA (aDNA) parçası elde edilmiştir. Daha sonra Mullis ve Faloona (1987) belirli DNA bölümlerinin laboratuvarda çoğaltılmasını sağlayan Polymerase Chain Reaction (PCR) tekniğini geliştirmiştir. Bu

tekniğin keşfinden sonra ilk bakteriyel aDNA çalışması Spigelman ve Lemma (1993) tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar, on farklı bölgeden elde edilmiş, yaklaşık 1350 yıllarına kadar uzanan farklı dönemlere ait kemik örneklerinden aDNA elde ederek tüberküloz hastalığının etkeni olan *Mycobacterium tuberculosis* bakterisinin varlığını araştırmışlardır. Çalışmada biri Türkiye'den ve Bizans dönemine ait, diğeri 17-18. yüzyıl İskoçya kaynaklı olmak üzere iki bel omurunda, ayrıca Borneo ve İngiltere kökenli talus ve ulna kemiklerinde toplam dört kemikte *M. tuberculosis* pozitifliği bulunmuştur. Daha sonraki çalışmalarda Salo vd. (1994) MS. 100-1300 yıllarına tarihlenen Güney Avrupa'daki bir mezarlıktan elde edilen, 40-45 yaşlarında bir kadına ait mumyanın lezyon bulunan akciğer ve lenf yumrusunu inceleyerek, Donoghue vd. (1998) ise İsrail'de Negev Çölü'nde bulunan bir Bizans bazilikası kazısı sırasında, 35-45 yaşlarında bir erkeğe ait cesedin göğüs boşluğunda bulunan kalsifiye akciğer plevrasında *M. tuberculosis* tespit etmiştir. Drancourt vd. (1998) ilk kez diş taşlarından aDNA elde etmeyi başarmış ve 400 yıllık bir iskeletin diş taşında veba etkeni olan *Yersinia pestis* bakterisinin varlığını göstermiştir. Bundan sonraki çalışmalarda çevresel örneklerden aDNA çalışmaları yapılmış ve Priscu vd. (1999) buz örneklerinden çevresel metagenomu (bir numunede olan farklı canlılara ait genetik materyalin tamamı) saptamıştır.

Ancak PCR tekniğinin uygulamada karşılaşılan bazı dezavantajlarını gidermek için geliştirilen Yüksek Verimli Dizileme (High Throughput Sequencing - HTS) tekniği de aDNA çalışmalarında kullanılmış ve çalışmaların büyük ölçüde güvenilirlik kazanmasını sağlamıştır. Tito vd. (2008) HTS tekniğini kullanarak ilk kez koprolitten aDNA izole etmiş ve barsak mikrobiomunu (belirli bir yerde veya nişte birlikte yaşayan bir mikroorganizma topluluğu ve onun çevresel ve genomik bağlamı) belirlemiştir. Yine aynı teknikle Bos vd. (2011) diş pulpasından veba etkeni olan *Y. pestis* bakterisini saptamıştır.

Mikrobiyal arkeolojik araştırmaların çoğu paleopatolojik bağlamlarda başlamış olsa da, günümüzde mikrobiyolojik uygulamalar insanlara dair bulaşıcı hastalıklardan çok daha fazla bilgi sağlamaya başlamıştır. Çok sayıda çalışmada mikroskopi, immünohistokimya, PCR ve metagenomik yaklaşımlar kullanılarak, birçok bakteriyel, viral ve parazitik enfeksiyonun antik çağlardaki varlığı doğrulanmıştır. Bu çalışmaların büyük bölümü, geçmişteki insan hastalıklarını tanımlamayı ve incelemeyi amaçlamış; hastalığın kökenine, bir salgının etkeninin belirlenmesine ve hastalığın bir coğrafya ya da farklı insan gruplarına yayılmasına odaklanmıştır. Patojenin yanı sıra, aynı patojenin çeşitli suşları arasındaki küçük varyasyonların ve farklılıkların tanımlanması, araştırmacıların belirli suşların nasıl ve neden yayıldığını anlamasına; genetik bilgileri hastalığın yaygınlığının uzun vadeli ve geniş

etkileriyle ilgili arkeolojik bağlam ve insan göçü, kaynak paylaşımı veya ticaret gibi hastalığın ortaya çıkışını destekleyen antropolojik ya da ekonomik faktörlerle eşleştirmesine olanak tanımaktadır.

Paleomikrobiyolojik tekniklerle incelenen ilk mikroorganizma, insanlardaki tüberkülozun etkeni olan *M. tuberculosis*'tir. Erken modern genomik çalışmalar, insanlardaki tüberkülozun sığırlarda benzer bir solunum yolu hastalığına neden olan akraba tür *Mycobacterium bovis*'ten kaynaklandığını düşündürmüştür. Sığırların insanlar tarafından evcilleştirilmesinin insanlarda tüberkülozun yayılmasına ve ortaya çıkmasına yol açtığına dair hipotezler ortaya atılmıştır. Ancak eski *M. tuberculosis* genomları üzerine yapılan çalışmalar, eski insanları enfekte eden suşların sığırlardan kaynaklanmadığını, aksine sığır suşlarının insanlardan kaynaklandığını göstermiştir (Brosch vd, 2002, s. 3684-3689).

İleri araştırmalar, tüberkülozun milyonlarca yıldır insanlarla birlikte olduğunu ve muhtemelen Afrika'yı terk ederken anatomik olarak modern insanlarla yayıldığını ortaya koymaktadır (Comas vd, 2013, s. 1176-1182). Bu örnek, eski zamanlarda dolaşımda olan suş türleriyle ilgili zamansal bilginin, insanlardaki patojenlerin kökenlerini ve ortaya çıkışını tanımlamak için büyük önem taşıdığını göstermektedir. Bu gözlem, hayvanlardan insanlara geçen zoonotik hastalıkların kökenine dair anlayışımızı derinleştirmekte ve geçmişteki insan göçlerinin, hareketlerinin ve ticaretinin insan sağlığı üzerindeki etkilerini aydınlatmaktadır. Aynı zamanda, hastalık kökeni ile ilgili birçok teori ve hipotezin paleomikrobiyolojik incelemelerle desteklenmesi gerekliliğini vurgulamaktadır. Paleomikrobiyolojik çalışmalar, yeni hipotezlerin oluşturulmasını da sağlayarak, hastalığın eski örneklerdeki genetik çeşitliliğini ortaya koymaktadır.

Öte yandan, tarihte bilinen üç büyük veba pandemisinin etkeni olan *Yersinia pestis* bakterisi de antik DNA çalışmalarında incelenmiştir. İlk pandemi olan Justinianus vebası (MS. 541-750), ikinci pandemi Kara Ölüm (1347-1353) ve üçüncü pandemi (1855'ten 20. yüzyıla) dönemlerine ait mezarlıklardan elde edilen DNA analizleriyle bu patojen saptanmış ve genetik evrimi üzerine bilgiler edinilmiştir (Bos vd, 2011, s. 506-510; Wagner vd, 2014, s. 541-543; Spyrou vd, 2019, s. 1-13).

2.7. Hayvanlardaki Antik Mikroorganizmalar

İnsan mikrobiyotası ile karşılaştırıldığında, hayvanlarla ilişkili mikrobiyota araştırmaları nispeten yenidir ve hem koprolit hem de kalkülüs benzeri materyal kullanan sadece bir avuç çalışma içermektedir.

Hayvanlarla ilişkili mikrobiyota araştırmaları yalnızca geçmişteki hayvanların biyolojilerini, diyetlerini ve menzillerini daha iyi anlamak için yararlı olmakla kalmaz, aynı zamanda insan ve hayvan etkileşimleri ile diğer ekolojik çıkarımlar hakkında da bilgi sağlayabilir. Örneğin, insanlar ve hayvanlar arasında paylaşılan mikroplar, insan-hayvan temasının türleri ve doğası hakkında bilgi sağlayabilir (örneğin bulaşıcı hastalık yayılımı için). Hayvan mikrobiyotasındaki değişiklikler, evcilleştirmenin ve insanların hayvanların yaşam tarzlarına müdahalesinin bir işareti olabilir (Metcalf vd, 2017, s. 1-9).

Hayvanlardaki mikrobiyota da muhtemelen çevresel ve iklim değişikliğinin getirdiği beslenme düzenindeki değişikliklere yanıt vermektedir; bu değişiklikler aynı zamanda coğrafi çeşitliliği veya insanlar tarafından uzun süreli maruz kalma ya da yetiştirmeye geçişi de yansıtıyor olabilir (Liu vd, 2020, s. 307-319).

Günümüzde, primat olmayan eski hayvanlardaki mikropları inceleyen çalışmalar, soyu tükenmiş, uçamayan kuşların çeşitliliğini ve etkileşimlerini ortaya çıkarmış (Boast vd, 2018, s. 1546-1551); ayrıca, eski, adaya izole şekilde yaşayan keçilerde bulunan bağırsak mikroorganizmalarının günümüz modern keçilerine kadar devamlılığını ortaya koymuştur (Welker vd, 2014, s. 106-116). Öte yandan, eski primatlar üzerine yapılan çalışmalar, Mısır babunları ve Tanzanya şempanzelerinde hem esaretin hem de yakın zamandaki yaşam tarzı değişikliklerinin ağız mikrobiyotasını, insan ağız mikrobiyotasındaki endüstriyel değişikliklere benzer şekillerde değiştirdiğini göstermiştir (Ottoni vd, 2019, s. 1-10; Ozga vd, 2019, s. 1-15).

Mikrobiyal arkeolojiyi zooarkeolojik çalışmalara uygulayan daha ileri çalışmalar, hayvanların bu gezegenin farklı yerlerinde nasıl yaşadıklarına ve ayrıca insanların geçmişte hayvanlarla nasıl etkileşime girdiklerine dair anlayışımızı genişletecektir.

2.8. Arkeolojik ve Tarihi Yapı Malzemelerinin Mikrobiyomları

Şu anda en yaygın olarak çalışılan mikrobiyomlar insanlarda olmasına rağmen, çevresel mikrobiyota artık arkeolojik bağlamlar da dahil olmak üzere geçmiş hakkında bilgi sağlamak için giderek daha fazla incelenmektedir. Örneğin, araştırmacılar antik yapı malzemeleri ve yapı kalıntılarıyla ilişkili antik mikrobiyotayı incelemişlerdir. Bir grup araştırıcı, tarihi tuğlalar ve boyalar üzerinde halotolerant (tuza toleranslı) türleri tespit ederek, alanın bozulmasıyla potansiyel olarak ilişkili mikroorganizmaları ortaya çıkarmış; ancak kullandıkları tekniklerden daha güvenilir tekniklerle çalışılması gerektiğini vurgulamışlardır (Adamiak vd, 2018, s. 11-18). Ayrıca, başka bir grup, İkinci Dünya Savaşı toplama kamplarındaki tarihi bina kalıntılarıyla ilişkili mikrobiyal toplulukları, geçmişi anlamak için değil; tarihi malzemelerin mikrobiyal ilişkili bozulmasını sınırlama ve malzemeleri gelecek için daha iyi koruma umuduyla, tarihi malzemelerin nasıl bozulduğunu daha iyi anlamak için incelemiştir (Gutarowska vd, 2015, s. 1-13).

Biyolojik ve biyolojik olmayan arkeolojik malzemelerin, özellikle de farklı toprak türlerinde veya diğer çevresel bağlamlarda bozulma süreçlerini daha iyi anlamak için benzer uygulamalar yapılmalıdır. Bu tür çalışmalar, müzelerin ve küratörlerin muhafaza ettikleri malzemeleri nasıl daha iyi koruyabilecekleri konusunda bilgilendirilmelerinde de kilit rol oynayabilir.

2.9. Bakteriyel aDNA Kaynakları

Paleogenetiğin başlangıcı, hedefli PCR amplifikasyonunun kullanılmasıyla mümkün olmuş; bu da eski örneklerden belirli aday patojenlerin tespitini, bakteriyel aDNA elde etme çabalarının ilk başarılarında kilit hâle getirmiştir. Ancak, aDNA ekstraksiyonu genellikle yıkıcı ve başarısız olduğundan, kemiklerden genetik materyal elde etmeye yönelik öncü çalışmalar büyük önem taşımıştır. Kemikler, sınırlı ve paha biçilmez arkeolojik materyaller arasında en yaygın kullanılan aDNA kaynakları olmuştur.

Örnek organizmaların seçiminde zaman zaman iskelet lezyonları gibi morfolojik göstergelerden hareketle tüberküloz (TB) ve cüzzam gibi spesifik patojenler tercih edilmiştir. Bu yaklaşımlar sayesinde *M. tuberculosis*'in ilk kez Spigelman vd. (1993), *M. leprae*'nin ise Rafi vd. (1994) tarafından başarıyla amplifiye edilmesi mümkün olmuştur. Görünür patoloji olmaksızın da kemiklerden aDNA elde edilebileceğinin fark edilmesi, hem

popülasyonlara (Zink vd. 2007) hem de karışık enfeksiyonlara (Donoghue vd., 2005) yönelik epidemiyolojik çalışmaları mümkün kılmıştır.

M. tuberculosis'e ait aDNA'nın kemiklerden elde edilmesi süreci, kısa sürede mumyalara da taşınmış ve doğal mumyalanmanın bakteriyel DNA'nın korunmasına imkân sağladığı anlaşılmıştır (Ubaldi vd, 1998, s. 286-288). Salo vd. (1994), 1000–2000 yıllık Peru mumyasında TB varlığına işaret eden bakteriyel aDNA elde etmiş ve bu bulgular, TB'nin Amerika kıtasındaki Kolomb öncesi varlığına dair önemli kanıtlar sunmuştur (Bos vd, 2014, s. 494–497).

Bakteriyel mikrobiyotaya dair antik izlerin ortaya konduğu bir başka çarpıcı örnek, Cano vd. (2000) tarafından Tirol buzadamı üzerinde yapılan çalışmadır. 16S ribozomal DNA genlerinin amplifikasyonuna dayalı bu çalışma, *Clostridium* türlerinin mevcudiyetini ortaya koymuş ve modern insan bağırsak florasıyla benzerlikler göstermiştir. Ancak, aynı Clostridia türlerinin çevresel örneklerde de bulunması, bu sonuçların geçerliliği hakkında tartışmalara neden olmuştur. Donoghue vd. (1998) ise kalsifiye plevra dokusundan *M. tuberculosis* DNA'sı elde ederek paleomikrobiyolojik araştırmaların potansiyelini genişletmiştir.

Ardından, parafine gömülmüş organlar gibi tıbbi örneklerin de değerli aDNA kaynakları olduğu ortaya konmuştur. Örneğin Jackson vd. (1998), 1979 yılında şarbon kurbanlarından *B. anthracis* DNA'sı izole ederken, Devault vd. (2014) 1849 yılına ait bir kolera kurbanının korunmuş kolonundan *Vibrio cholerae* genomunu dizileyerek bu patojene ait ilk paleogenomu elde etmişlerdir.

Dişler hem görece sağlam yapıları hem de vaskülarizasyonları nedeniyle kan yoluyla bulaşan patojenlerin tespiti için önemli bir kaynak olarak tanımlanmıştır. Drancourt vd. (1998) bu doğrultuda diş pulpasından *Y. pestis* DNA'sı izole etmiş ve böylece Kara Ölüm'ün etkenini net olarak göstermiştir. Diş pulpası, kontaminasyona kemiklere göre daha az maruz kalması, koprolitlere göre daha kolay erişilebilir olması ve diş taşına kıyasla daha homojen içerik sunması nedeniyle özel bir niş olarak değerlendirilmektedir (Gorgé vd, 2016, s. 289-315).

Çevresel bakteriyel aDNA izolasyonuna yönelik ilk girişimler ise Priscu vd. (1999) ve Christner vd. (2001) tarafından Antarktika'daki Vostok Gölü'nden eriyen buz ve sudan 16S rDNA amplifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir.

Mumyalara ek olarak, antik insan mikrobiyotası genellikle iki temel substratta korunmaktadır: koprolitler ve diş taşları (Warinner vd, 2015, s. 1660). Koprolitler, bireyin ölüm anındaki bağırsak mikrobiyotasını yansıtabilen mumyalanmış veya fosilleşmiş dışkılardır (Cano vd, 2014, s. 14). Tito vd. (2008) Meksika'daki bir mağaradan alınan 1300 yıllık koprolitlerde HTS kullanarak bağırsak mikrobiyomunu başarıyla analiz etmiş ve eski insan mikrobiyotasının coğrafi olarak daha yapılandırılmış olduğunu ortaya koymuştur. Koprolitler, aynı zamanda parazit yumurtaları, larva proteinleri ve parazit DNA'sı gibi verilerle parazitolojik incelemelere; bitki, mantar ve faunal kalıntılarla da diyet analizine olanak tanır (Warinner vd, 2015, s. 1660). Bu veriler, antik dönemlerdeki yaşam tarzı ve kültürlerin yeniden inşasında önemli rol oynamaktadır.

İnsan mikrobiyomu için üçüncü önemli kaynak diş taşıdır. Diş taşı, diş plağı ve salya gibi oral komponentlerin kalsifikasyonu sonucu oluşur ve bireyin oral mikrobiyomu ile ilgili katmanlı bir arşiv sunar (Warinner vd, 2014, s. 336–344; Warinner vd., 2015, s. 1660). Diş taşındaki DNA, diğer kaynaklara göre çok daha iyi korunur. Preus vd. (2011)] tarafından elektron mikroskobu ile DNA varlığı ortaya konmuş, Fuente vd. (2013) ise türe özgü PCR primerleriyle beş farklı bakteriyi tanımlamıştır.

Drancourt vd. (1998) tarafından vurgulanan diş pulpası, insan kanı yoluyla bulaşan patojenlerin tespiti için eşsiz bir kaynaktır. Koprolitlerden daha kolay erişilebilir olması ve kontaminasyona karşı dirençli yapısıyla ön plana çıkarken; buz çekirdeklerinden elde edilen aDNA ise diğer kaynaklara kıyasla benzersiz bir zamansal derinlik sunar. Bu tür örnekler, evrimsel süreçlerin ve bakteri popülasyonlarındaki uzun vadeli değişimlerin anlaşılması için kritik önem taşımaktadır.

Ancak, bakteriyel aDNA çalışmalarında sadece kaynak materyal değil, aynı zamanda arkeogenetik içinde mikrobiyal araştırmalara özgü metodolojik zorluklar da dikkate alınmalıdır. Paleomikrobiyoloji, arkeolojik çalışmaların en yeni ve hızla gelişen alanlarından biridir. Mevcut yöntemlerin klasik arkeolojik araştırmalara uyarlanmasıyla, bu alanda geniş uygulama olanakları ortaya çıkmaktadır. Antik kalıntılardan elde edilen mikroorganizma kalıntıları sayesinde, geçmiş toplulukların maruz kaldığı bakteriyel hastalıklar belirlenebilmekte ve bu hastalıkların tarihsel evrimi izlenebilmektedir. Bu çalışmalar, yalnızca antik toplumların sağlık geçmişine ışık tutmakla kalmayıp, aynı zamanda günümüzdeki sağlık sorunlarına dair değerli içgörüler de sunmaktadır.

Paleomikrobiyoloji; beslenme biçimleri, bakteriyel evrim, antik dönemlerde antibiyotik direnci gibi konularla ilgilenerek arkeoloji ve mikrobiyoloji disiplinlerini bir araya getirmektedir. Geçmişin bakteriyel dünyasını gözler önüne sererken, bilim dünyasına da yeni bir perspektif kazandırmaktadır. Alandaki uygulamaların geliştirilmesi ve yeni tekniklerin entegrasyonu, bu disiplinin ilerleyişini hızlandıracaktır. Mikroorganizmaların zaman içindeki değişimleri izlenerek, insan ile mikroplar arasındaki görünmez ama derin tarihsel ilişkiler daha iyi anlaşılabilecektir.

Paleomikrobiyoloji araştırmalarının arkeolojiye daha fazla anlam ve derinlik katması beklenmektedir. Bu disiplinin sunduğu veriler sayesinde, antik toplumların sağlık durumları, yaşam koşulları ve mikrobiyal çevreleri daha iyi anlaşılabilecektir. Gelecekte, paleomikrobiyoloji ile arkeolojinin kesişiminde yürütülecek çok disiplinli araştırmaların insanlık tarihine daha kapsamlı bir ışık tutması umut edilmektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. aDNA Eldesi için Kullanılan Arkeolojik Bulgular

Soğmatar kazılarında Erken Tunç Çağı olarak (MÖ. 3200-2220) belirlenen mezarlardan elde edilen kemiklerden ve dişlerden örnekler kullanıldı. Bu amaçla güncel DNA kirliliğini mümkün olduğu kadar önlemek için steril araçlarla mezar içeriği bizzat tarafımdan çıkarılarak (Şekil 3) gerekli tez çalışmasında kullanılacak örnekler steril poşetlere alındı ve test edilene kadar +4°C'de saklandı.

3.1.1. Kemik Örnekleri

Bu amaçla Soğmatar kazılarında femur (uyluk) veya humerus (pazu) kemiği olabilecekleri değerlendirilen uzun kemik örneklerinden her bir mezardan 2 kemik örneği olacak şekilde toplam 20 adet örnek steril poşetlere alındı. Myrina antik kenti kazılarında elde edilen kemik örnekleri de kazılan 2 mezardan aynı kriterlere göre steril poşetlere alındı.

3.1.2. Diş Örnekleri

Bu amaçla özellikle maksilla (üst çene kemiği) ya da mandibula (alt çene kemiği) üzerinde bulunan dişlerden her mezardan 4 adet diş örneği olmak üzere toplam 40 adet diş örneği steril poşetlere alındı.

Tez çalışması için steril olarak örnekler alındıktan sonra diğer kemik ve dişler de toplanarak belgelendi (Şekil 3 ve Şekil 4)

Kemik ve diş örnekleri 10'arlı gruplar halinde ayrılarak 2 adet kemik ve 2 adet diş örneği grubu oluşturuldu ve her gruptan 2 numune çalışılmak üzere toplam 8 adet numune ile çalışıldı.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan örnek havuzları.

Kodu	Türü	Alındıkları mezarlar
4504-01	Kemik	Myrina – Birer adet Hellenistik ve Bizans dönemi sanduka tipi mezar
4504-02	Kemik	Myrina – Birer adet Hellenistik ve Bizans dönemi sanduka tipi mezar
4505-01	Kemik	Soğmatar – ETÇ kuyu girişli, tek odalı mezar (51, 52, 53, 54, 55, 71, 72, 73, 75, 76 Nolu)
4505-02	Kemik	Soğmatar – ETÇ kuyu girişli, tek odalı mezar (51, 52, 53, 54, 55, 71, 72, 73, 75, 76 Nolu)
4506-01	Diş	Soğmatar – ETÇ kuyu girişli, tek odalı mezar

		(51, 52, 53, 54, 55 Nolu)
4506-02	Diş	Soğmatar – ETÇ kuyu girişli, tek odalı mezar (51, 52, 53, 54, 55 Nolu)
4507-01	Diş	Soğmatar – ETÇ kuyu girişli, tek odalı mezar (71, 72, 73, 75, 76 Nolu)
4507-02	Diş	Soğmatar – ETÇ kuyu girişli, tek odalı mezar (71, 72, 73, 75, 76 Nolu)



Şekil 3. Soğmatar kazılarında örnek alınma işlemi ve sonrasında elde edilen kemikler.



Şekil 4. Myrina kazılarında örnek alınan mezarlar ve sonrasında elde edilen kemikler

3.2. DNA İzolasyonu

Mikrobiyota için alınan örneklerden DNA örnekleri QIAamp DNA Investigator Kit (Cat no. / ID. 56504 / USA) ile izole edilmiştir.

1. Eküvyon sürüntü örnekleri 2 ml'lik bir mikro santrifüj tüpüne yerleştirildi. Eküvyon çubuk üzerinden şaftından ayırıdı.
2. 20 µl proteinase K ve 600 µl Tampon ATL eklendi, kapağı kapatılarak 10 saniye boyunca darbeli vorteksleme ile karıştırıldı.
3. 2 ml'lik tüpü bir ısıtılmış orbital inkübatöre yerleştirildi ve en az 1 saat boyunca 900 rpm'de çalkalayarak 56°C'de inkübe edidi.

Kuru ısı bloğu, lizi iyileştirmek için tüpü her 10 dakikada bir 10 saniye vortekslendi.

4. Kapağın içinden damlaları çıkarmak için 2 ml'lik tüpü kısa bir süre santrifüjlendi.
5. 600 µl Tampon AL (Omni Swab kullanılıyorsa) verimli lizis sağlamak için, numunenin ve Tampon AL'nin homojen bir çözelti elde etmek için iyice karıştırılması sağlandı.
6. 2 ml'lik tüpü bir termomikser veya ısıtılmış orbital inkübatöre yerleştirildi ve 10 dakika boyunca 900 rpm'de çalkalayarak 70°C'de inkübe edildi.

Termoblok, lizisi iyileştirmek için tüpü her 3 dakikada bir 10 saniye vortekslendi.

7. Kapağın içinden damlaları çıkarmak için 2 ml'lik tüp kısaca santrifüjlendi.
8. 300 µl etanol (96–100%) eklenerek, kapağı kapatıldı ve 15 saniye boyunca darbeli vorteksleme ile karıştırıdı.
10. Etkili bir bağlanma sağlamak için, numunenin ve etanolün homojen bir çözelti elde etmek için iyice karıştırılması sağlandı.
9. Kapağın içinden damlaları çıkarmak için 2 ml'lik tüpü kısaca santrifüjlendi.
10. 700 µl lizatı dikkatlice QIAamp MinElute kolonuna (2 ml'lik bir toplama tüpünde) jantı ıslatmadan aktarıldı, kapak kapatıldı ve 1 dakika boyunca 6000 x g'de (8000 rpm) santrifüj edildi. Toplama tüpündeki akışı dikkatlice atın ve ardından QIAamp MinElute kolonunu toplama tüpüne geri yerleştirildi. Sonrasında QIAamp MinElute kolonuna jantı ıslatmadan tekrar uygulandı. 1 dakika boyunca 6000 x g'de (8000 rpm) santrifüj edidi. QIAamp MinElute kolonunu temiz bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi ve akışı içeren toplama tüpünü atıldı. Lizat santrifüjlemeden sonra membrandan tamamen geçmemişse, QIAamp MinElute kolonu boşalana kadar daha yüksek bir hızda tekrar santrifüj edildi. Not: Swabda 250 µl'ye kadar lizat kalır. Bu kalan lizatı toplamak için, swab'ı bir QIAshredder spin kolonuna yerleştirildi ve 2 dakika boyunca tam hızda (20.000 x g; 14.000 rpm) santrifüj edildi. Akışı, jantı ıslatmadan QIAamp MinElute kolonuna

aktarıldı, kapağı kapatılarak ve 1 dakika boyunca boyunca 6000 x g'de (8000 rpm) santrifüj edildi.

Adım 9'daki tüm lizatı dikkatlice QIAamp MinElute kolonuna (2 ml'lik bir toplama tüpünde) ağzını ıslatmadan aktarıldı, kapağı kapatılarak 6000 x g'de (8000 rpm) 1 dakika santrifüj edidi. QIAamp MinElute kolonunu temiz bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi ve akışlı kısmı içeren toplama tüpü atıldı.

Eğer lizat santrifüjlemeden sonra membrandan tamamen geçmemişse, QIAamp MinElute kolonu boşalana kadar daha yüksek bir hızda tekrar santrifüj edidi.

11. QIAamp MinElute kolonunu dikkatlice açıldı ve jantı ıslatmadan 500 µl Tampon AW1 eklendi. Kapağı kapatılarak 6000 x g'de (8000 rpm) 1 dakika santrifüj edidi. QIAamp MinElute kolonunu temiz bir 2 ml toplama tüpüne yerleştirildi ve akış içeren toplama tüpünü atıldı.
12. QIAamp MinElute kolonunu dikkatlice açıldı ve jantı ıslatmadan 700 µl Tampon AW2 eklendi. Kapağı kapatılarak 6000 x g'de (8000 rpm) 1 dakika santrifüj edildi. QIAamp MinElute kolonunu temiz bir 2 ml toplama tüpüne yerleştirildi ve akış içeren toplama tüpünü atıldı.

QIAamp MinElute kolonu ile akış geçişi arasındaki temas etmemsi sağlandı.

13. QIAamp MinElute kolonunu dikkatlice açıldı ve jantı ıslatmadan 700 µl etanol (%96–100) eklendi. Kapağı kapatılarak 1 dakika boyunca 6000 x g'de (8000 rpm) santrifüjlendi.

QIAamp MinElute kolonunu temiz bir 2 ml toplama tüpüne yerleştirildi ve akış geçişini içeren toplama tüpünü atıldı.

14. Membranı tamamen kurutmak için tam hızda (20.000 x g; 14.000 rpm) 3 dakika santrifüj edildi.
15. QIAamp MinElute kolonunu temiz bir 1,5 ml mikro santrifüj tüpüne yerleştirildi ve akış içeren toplama tüpünü atıldı. QIAamp MinElute kolonunun kapağını dikkatlice açıldı ve oda sıcaklığında (15–25°C) 10 dakika veya 56°C'de 3 dakika inkübe edildi.
16. Membranın ortasına 20–100 µl Tampon ATE uygulandı.

Bağlı DNA'nın tamamen elüsyonunu sağlamak için Tampon ATE membranın ortasına dağıtıldı. Aşağı akış uygulamasının gereksinimlerine göre bir hacim olan 100ul seçildi.

17. Kapağı kapatıldı ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. Tam hızda (20.000 x g; 14.000 rpm) 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüjlemeden önce QIAamp MinElute kolonunun ATE Tamponu ile yüklenerek oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilerek DNA verimini artırılması sağlandı.

3.3. DNA'nın Ölçülmesi

Elde edilen DNA izolasyonları Nanodrop (DeNoVix DS11/ China) cihazı ölçümleri ile 1,8-2,0 (260/230 nm) aralığında olup olmadığı kontrol edildi. Sırası ile örneklerin konsantrasyon değerleri aşşağıda ki gibidir (Tablo 3).

Tablo 3. İzole edilen Antik sürüntü örneklerin DNA konsantrasyonları.

Örnek Numarası	A260/A280 Konsantrasyon (ng/uL)
4504-1	4,97
4504-2	2,58
4505-1	3,52
4505-2	2,38
4506-1	7,94
4506-2	4,54
4507-1	7,26
4507-2	4,63

3.4. PCR Amplifikasyonu

Antik örneklerden elde edilen DNA izolatları bakteri ve arkeler için evrensel metabarkodlama primerleri olan 16SV3F ve 16SV3R kullanılarak PCR ile çoğaltıldı (Tablo 4).

Hiperdeğişken bölgeler 16S V3 rDNA genleri, aşağıdaki spesifik primerler kullanılarak çoğaltıldı. PCR, 94 ◦C'de 2 dakikalık birincil ısıtma adımı, ardından 94 ◦C'de 1 dakikalık 30 denatürasyon döngüsü, 53 ◦C'de 45 saniye tavlama ve 72 ◦C'de 1 dakikalık uzatma adımı ve ardından 72 ◦C'de 5 dakikalık son bir uzatma adımı ile gerçekleştirildi. Her 10 µL reaksiyon karışımı, 2 µL 5× Promega Renksiz GoTaq Flexi tamponu, 1:10 ve 1:100 oranında seyreltilmiş 0,5 µL DNA, 1 µL 25 mM MgCl2, 0,8 µL 3,2 µM dNTP, her primerden 0,5 µL (5 pmol/mL), 0,1 µL Taq DNA polimeraz ve steril su içeriyordu ve son hacim 10 µL'ye çıkarıldı.

Tablo 4. PCR için kullanılarn primerlerin nükleik asid dizileri.

Adı	Primer Nükleik Asid Dizisi	Bağlanma Sıcaklığı	Ürün Boyu	Kaynak
16SV3F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	53^0C	200 bp	Çelik ve Keskin (2022).
16SV3R	ACCGCGGCTGCTGGCAC	53^0C	200 bp	

Belirtilen şartlarda ve pozitif ve negatif kontrol kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyonlar sonrasında çoğaltılan pzr ürünleri %2'lik agaroz jele yüklenerek 140 voltta 60 dakika yürütüldü. Ardından UV görüntüleme sisteminde uygun bant boyu ve negatif kontrol bakımından değerlendirilerek kütüphane işlemi öncesinde pozitif kontrol sağlandı. (Şekil 5-6)

3.5. DNA Kütüphanesinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak DNA kütüphanesinin oluşturulması amacıyla, örnekler indeksli primerler aracılığıyla polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) yapılmıştır. PCR sonrasında, üretici firmanın sağladığı protokole uyarak kütüphane hazırlanmıştır. Elde edilen DNA kütüphanesi, örnek başına yaklaşık 100.000 okuma (read) hedef ile Illumina NextSeq 550 cihazı kullanılarak dizilenmiştir.

3.6. İndeks

PCR tabanlı DNA kütüphanesiyle elde edilen en uygun enzim, ısı koşulları ve örnek seyreltme oranları dikkate alınarak, bu aşamada seçilen primerlere Illumina NextSeq 550 sekanslama sistemine uygun adaptör dizileri eklenmiş ve indeksli polimeraz zincir reaksiyonu hazırlanmıştır. Elde edilen PCR ürünleri, %2 yoğunluğunda agaroz jelde 120 volt elektrik uygulanarak 45 dakika boyunca elektroforez işlemine tabi tutulmuş; ardından UV görüntüleme cihazı ile bant uzunlukları ve negatif kontrol durumu değerlendirilmiştir. Aynı saha çalışmasına ait PCR ürünleri birleştirilmiş ve Qubit™ 3.0 Florometre kullanılarak DNA'nın kalitesi ve miktarı ölçülmüştür.

3.7. Kütüphane Basamağı

Illumina NextSeq 550 yeni nesil dizileme platformuna uygun adaptör dizileri primerlere (indeks primerleri) eklendi ve indeksli bir polimeraz zincir reaksiyonu oluşturuldu. Kütüphane oluşturma basamağında Illumina Nextera DNA Prep Library Prep Kit kullanıldı. Amplifikasyonlu PCR ürünleri %2 agar jel üzerine yüklendi ve uygun bant boyutu ve UV görüntüleme sistemiyle negatif kontrol açısından kontrol edildi. Öncelikle indekli pzr sonrasında elde edilen ürünlerin temizliği 'AMPure XP Beads' ile üretici firma protokolüne uygun bir şekilde tamamlandı. Aynı saha çalışmasına ait PCR ürünleri (üçlüler) bir araya getirildikten sonra, kaliteleri ve miktarları Qubit 3.0 Florometre (Invitrogen™; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) ile ölçüldü. Dizileme kütüphaneleri, üreticinin önerileri doğrultusunda Nextera DNA Prep Kütüphane Hazırlık Kiti (Illumina, San Diego, CA, ABD) kullanılarak oluşturuldu ve indeks kodları eklendi. Daha sonra örnekler 2 × 50 bp PE kimyası kullanılarak bir Illumina NextSeq 550 platformunda dizilendi.

3.8. Biyoinformatik Analizler

Biyoinformatik analizler Linux/Unix tabanlı işletim sisteminin terminali aracılığıyla tamamlanmıştır. Illumina NextSeq 550 cihazından çıkan ve ".fastq" formatıyla elde edilen ileri ve geri okumalı dizilerin kalite kontrolleri FASTQC programıyla kontrol edilmiştir. 16sV3F-R primerleri ile çoğaltılan dizilerin analizi iki ayrı koldan yürütülmüştür. 16sV3F-R primerleri ile çoğaltılan ileri ve geri dizilerin analizi için oluşturulan iş akışı;

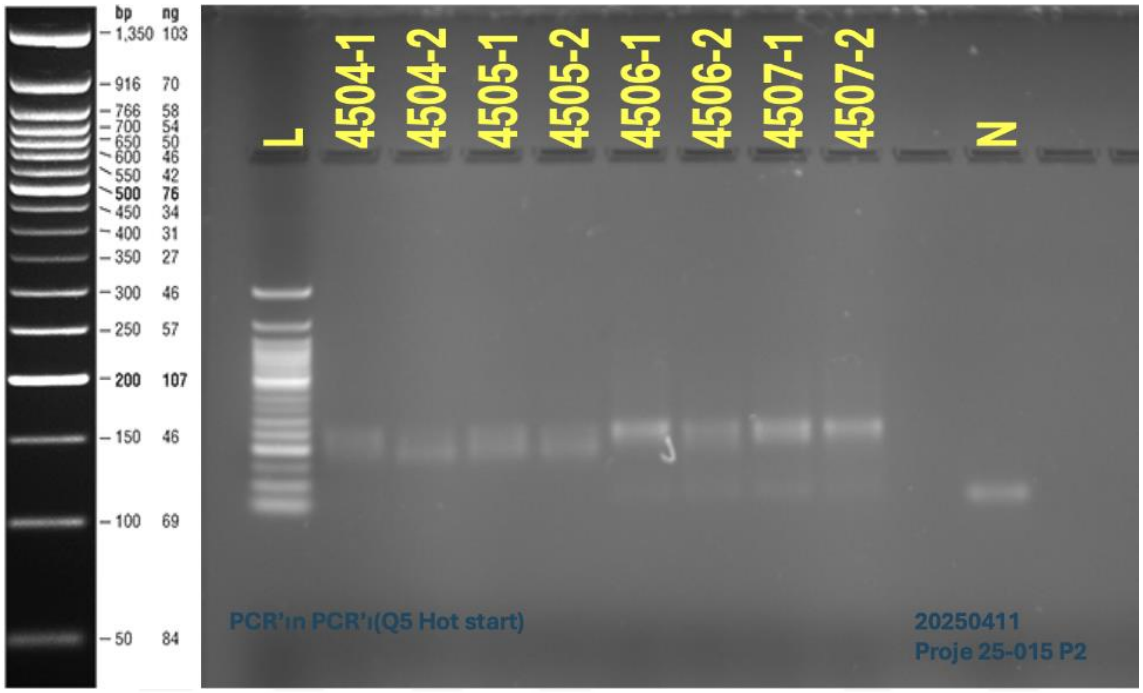
1. "illuminapairedend" kodu ile kalitesi 30'dan büyük olacak şekilde hizalanıp ve birleştirilmiştir.
2. Obigrep komutu ile 1. aşamada birleştirilemeyen okumalar filtrelenmiştir.
3. Tagcleaner programı ile her iki uçtaki ileri ve geri yönlü primerler maksimum 3 yanlış eşleşmeye izin verilerek çıkarılmıştır.
4. Obiuniq komutu ile tekrar eden veriler temizlenmiştir.
5. Obiannotate komutu ile her örnek başlığından bulunan gereksiz veriler temizlenmiştir.

Bu iş akışı sonucu elde edilen tüm dizi verilerinde 'uniq' ifadesi kullanılmıştır. Bu basamaktan sonra 3 farklı filtre uygulanmıştır. İlk filtrelemede uniq dizilerin okunma tekrarı 10'dan fazla olanları kaydedilmiş ve bunlar için 'c10' kısaltması kullanılmıştır. İkinci filtrelemede ilk filtreleme sonrası elde edilen uniq diziler, pzr ve dizileme hatalarından

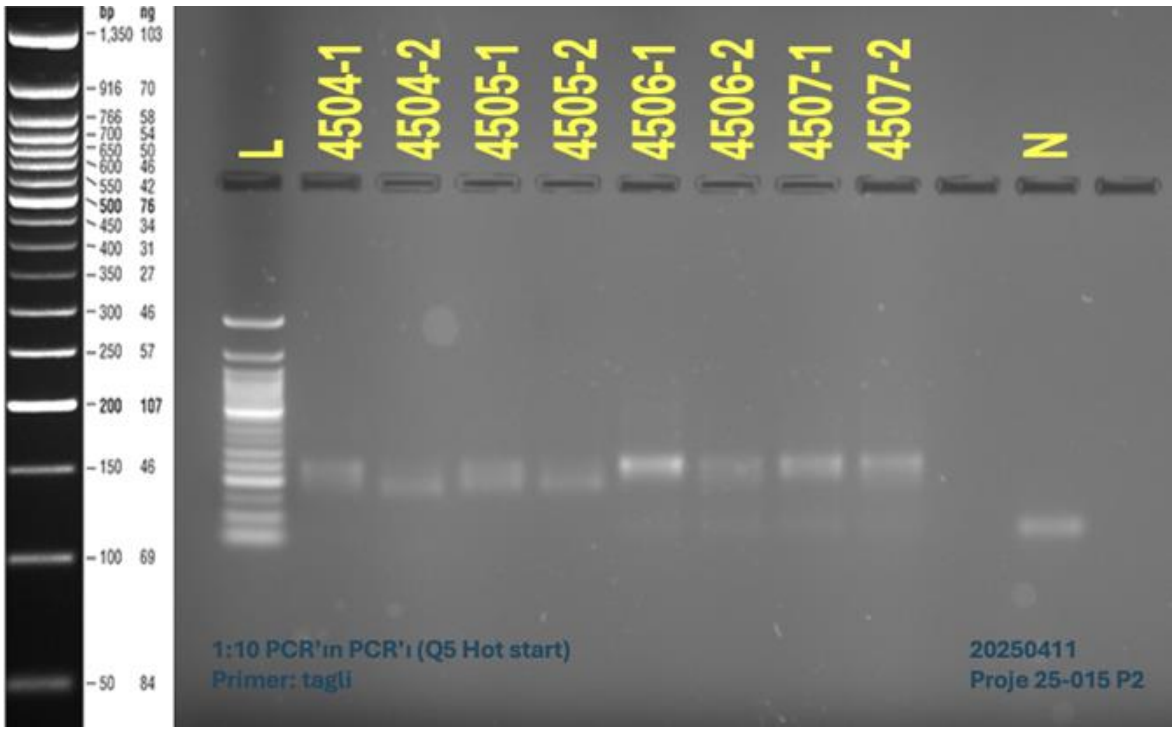
temizlenmiş ve ‘uniq.clean’ olarak kaydedilmiştir. Son filtrelemede ise ilk filtreleme sonucu elde edilen ‘c10’ dizilerinden pzr ve dizileme hatalarından temizlenerek ‘c10.clean’ dizileri elde edilmiştir. Her bir primer ve arazi örneği için uniq, c10, uniq.clean ve c10.clean olmak üzere 4 farklı veri elde edilmiş olup aynı primer ve aynı filtreleme basamaklarından geçen veriler çevrimiçi analiz sistemi olan ‘SILVAngs’e yüklenmiştir. 16sV3F-R primerleri ile çoğaltılıp analizi tamamlanan örneklerin ismi ‘16sV3-adı’ şeklinde ifade edildi. SILVAngs sistemine yüklenen dizileme dosyaları sırasıyla hizalama, kalite kontrolü, tekrarlı dizilerin temizlenmesi, Daha ileri analiz için, %98'den fazla eşleştirilmiş sahip veriler tutuldu. Bu benzerlik oranını gösteren dizilerin gruplandırıldı ve BLASTN veri tabanıyla eşleştirilmesi basamaklarından geçerek dizileme verilerine ait özet sonuç dosyaları oluşturuldu. Negatif kontrol okumalarında bulunan diziler verilerden çıkarıldı ve Krona pasta grafikleri oluşturulmuştur.

4. BULGULAR

Bu tezin dizileme aşamasında, Illumina NextSeq 550 ve 2 × 150 bp okuma boyutunun kullanılması nedeniyle, 16SV3F-R primerleri (200 bp) ile çoğaltılan dizilerin ileri ve geri okumaları birleştirildi.

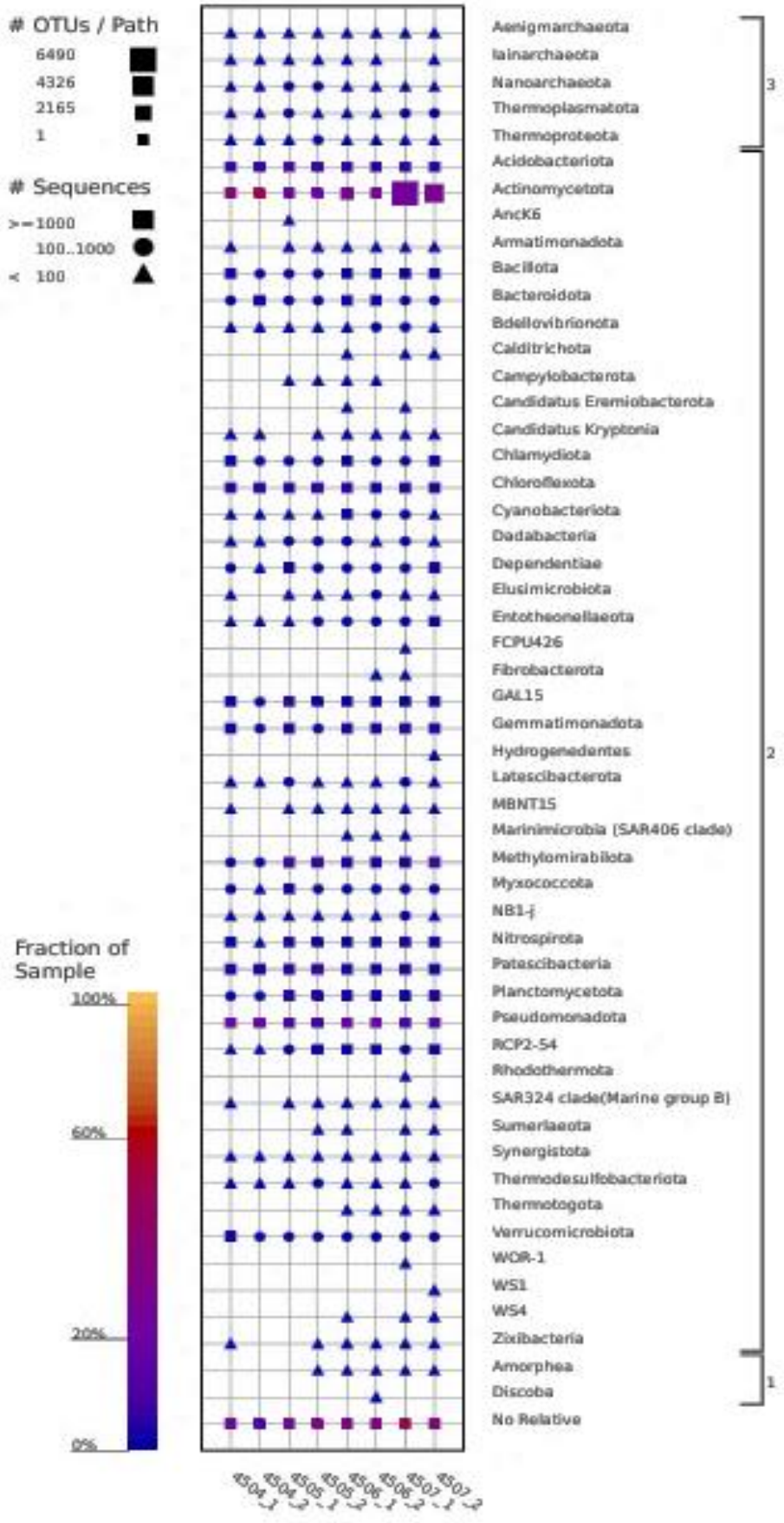


Şekil 5. 16SV3F ve 16SV3R ile amplifiye edilen PCR'ın PCR ürünleri.

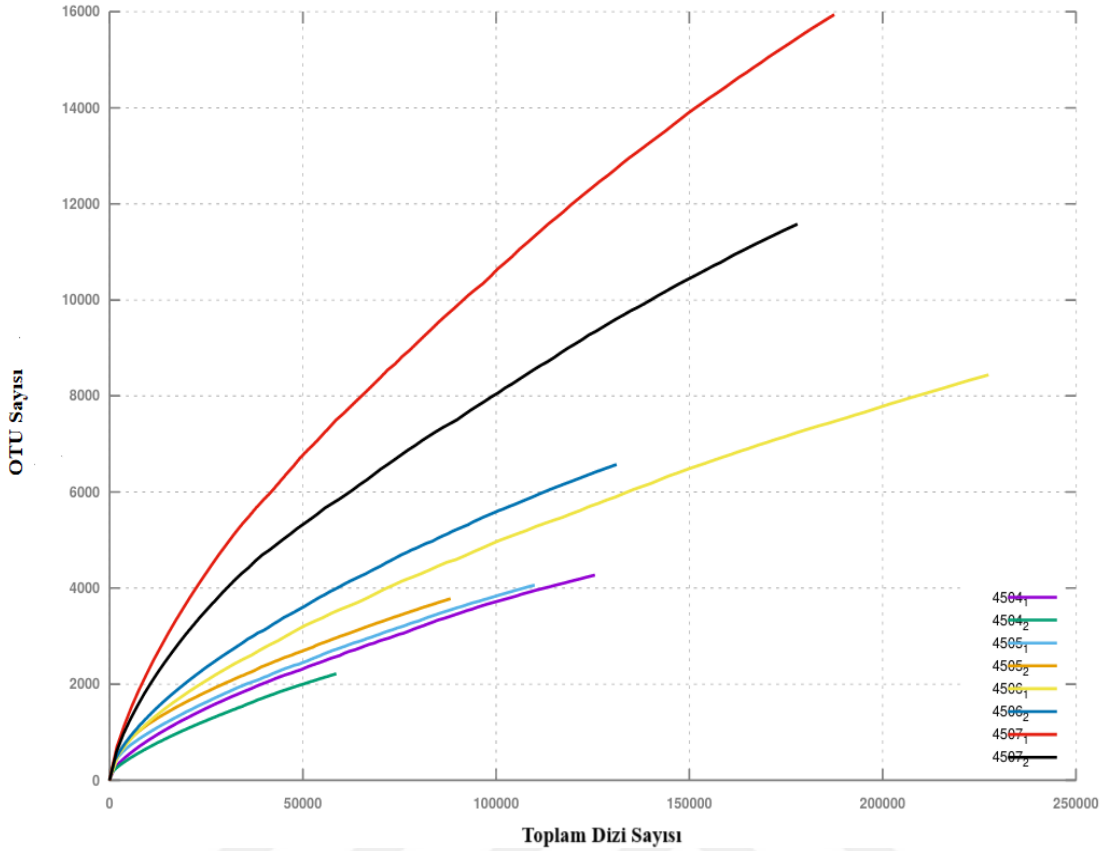


Şekil 6. 16SV3F ve 16SV3R ile amplifiye edilen 1:10 PCR'ın PCR ürünleri.

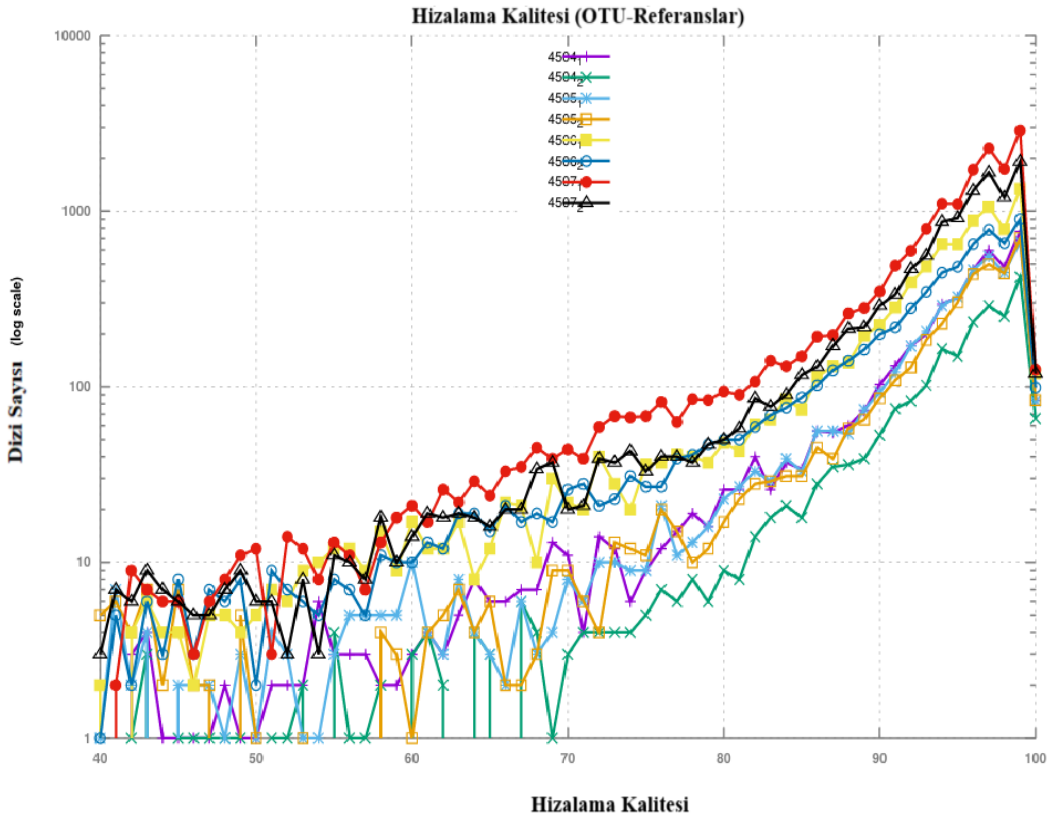
Yeni nesil DNA dizileme sistemlerinde (NGS – *Next Generation Sequencing*) kullanılan **OTU** terimi, **"Operational Taxonomic Unit"** yani **"Operasyonel Taksonomik Birim"** anlamına gelir. OTU'lar özellikle mikrobiyal toplulukların çeşitliliğini ve kompozisyonunu analiz etmekte kullanılır. OTU, bir dizi benzer DNA dizisini (genellikle 16S rRNA gen bölgesi gibi) **belirli bir benzerlik eşiğine göre gruplandırmak** için kullanılan bir kavramdır. Genellikle **%98 benzerlik eşiği**, aynı türde oldukları varsayılan dizileri aynı OTU'ya yerleştirmek için kullanıldı. **Mikrobiyom analizleri** kemik ve diş pulpasından elde edilen antik DNA (aDNA) örneklerinden yapıldı (Şekil 5, 6).



Şekil 7. Örneklerin Phylum düzeyinde taksonomik parmak izi.



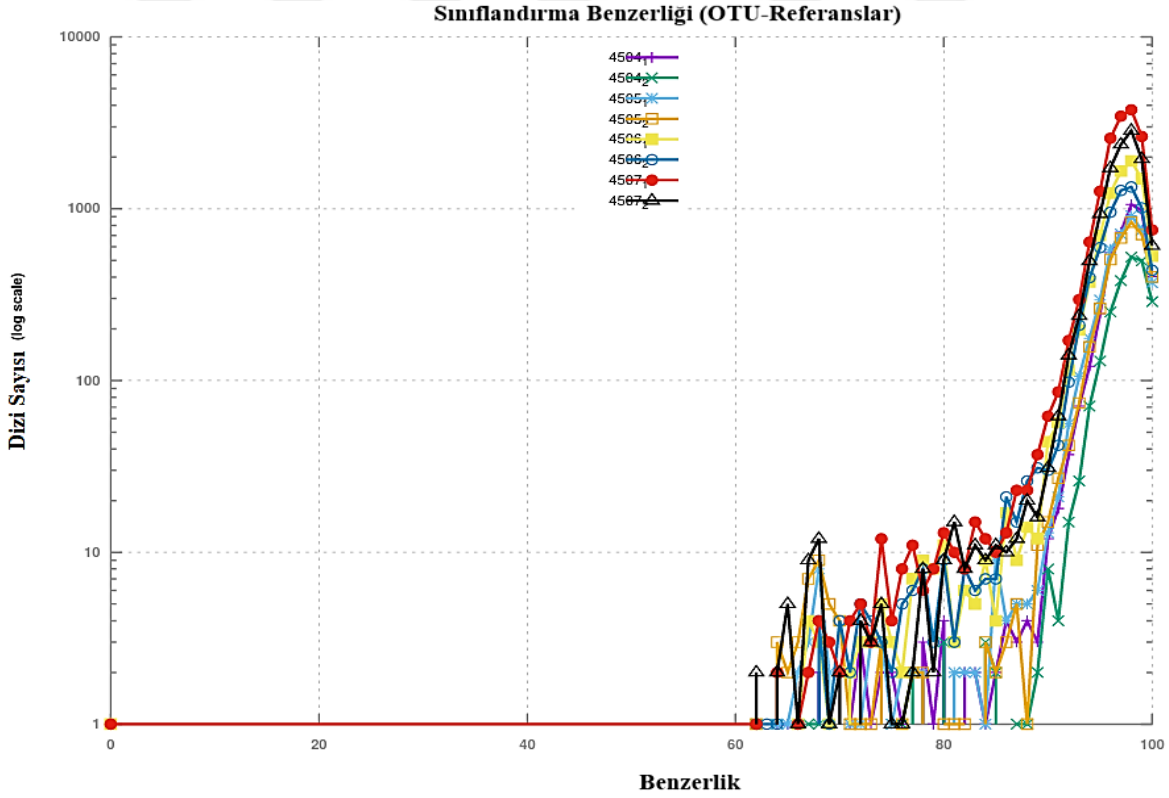
Şekil 8. Tüm OTU değerlerinin örnekler bazında gösterilmesi.



Şekil 9. Her bir örnek için hizalama kalitesi

"OBITools ve çevrimiçi BLAST'tan oluşan analiz hattının uygulanmasının ardından, eşleşmeler arasından %98'in üzerinde benzerliğe (pairwise identity) sahip olanlar değerlendirmeye alındı. 1. Havuz Kemik - Myrina (2)- 4504, 2. Havuz Kemik - Soğmatar (2)- 4505, 3. Havuz Diş -Soğmatar (2)-4506, 4. Havuz Diş - Soğmatar (2)-4507 örnekler sırası ile şekilde isimlendirildi. 1. Havuz örneklerinden özellikle Actinomycetota, Pseudomonadota, Acidobacteriota, Chloroflexota, Methylomirabilota. 2. Havuz örneklerinden, Actinomycetota, Pseudomonadota, Acidobacteriota, Methylomirabilota, Patescibacteria, GAL15, Chloroflexota 3. Havuz örneklerinden Actinomycetota, Pseudomonadota, Acidobacteriota, Chloroflexota, Methylomirabilota, Patescibacteria, Planctomycetota, Gemmatimonadota. 4. Havuz örneklerinden Actinomycetota, Pseudomonadota, Acidobacteriota, Gemmatimonadota, Nitrospirota, Chloroflexota, Methylomirabilota olarak tanımlanan OTU'lar tespit edildi. Tespit edilen tüm OTU'lar grafik ve Korana tablolarında verilmiştir.

Yapılan NGS analizleri sonunda elde edilerek SILVAngs sistemine yüklenen dizilerin sayısı Tablo 5'te gösterilmiştir. 16SV3F primerleri ile elde edilen dizilerin 'uniq.clean' aşamasının analizleri ileri ve geri okumalar tek dosyada birleştirildikten sonra yapılmıştır. Diğer aşamalarda ileri ve geri okumalar ayrı ayrı değerlendirilmiştir.



Şekil 10. Her bir örnek için sınıflandırma benzerliği

Tablo 5. 16SV3F ile çalışılan 4 örneğin analiz özeti.

	Sayısı	Yüzdesi
Dizi Sayısı	1.157.991	95,52%
Toplam OTU sayısı	56859	4,91%
Kümelenmiş Dizi Sayısı	89.627	7,74%
Tekrar Sayısı	959.684	82,87%
Eşleşmeyen Dizi Sayısı	51.821	4,48%
Sınıflandırılmış Dizi Sayısı:	762.301	65,83%
Akraba Olmayanların Sayısı:	343.869	29,70%

Tablo 6. Örneklerin relative OTU sayısı dağılımları.

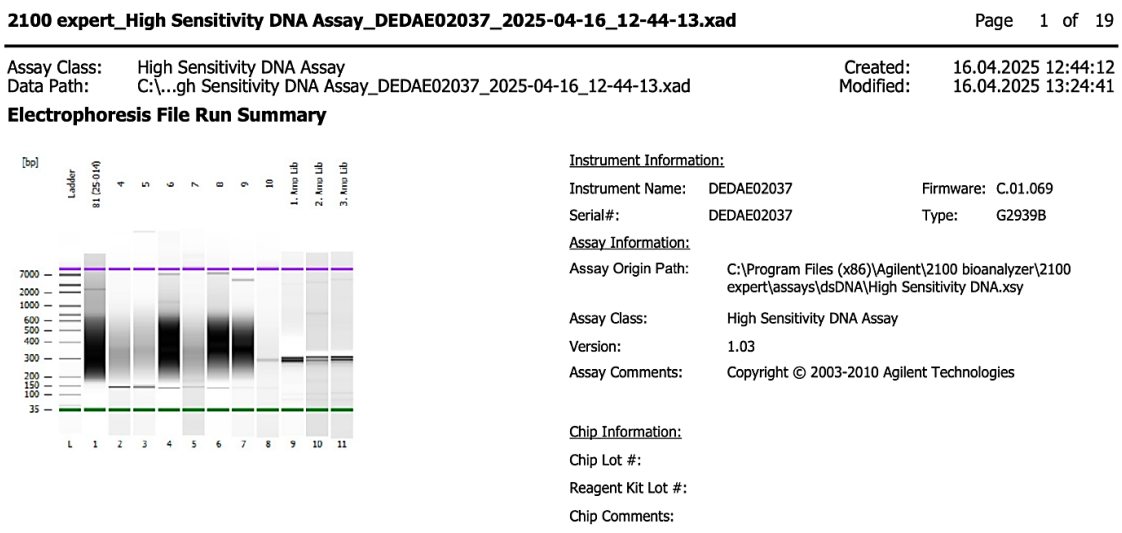
Örnek No	OTU Sayısı
4504-1 Kemik	4273
4504-2 Kemik	2215
4505-1 Kemik	4061
4505-2 Kemik	3778
4506-1 Diş	8440
4506-2 Diş	6575
4507-1 Diş	15942
4507-2 Diş	11576

Qubit Sonuçları

Hazırlanın kütüphanenin Equalbit 1 × dsDNA HS Assay Kit kullanılarak Qubit ölçümleri yapıldı. Konsantrasyon(ng/µL) 19,9µl olarak saptandı.

Bioanalyzer Sonuçları

Hazırlanan kütüphaneler Agilent High Sensitivity DNA Kit kullanılarak bioanalyzer görüntülemeleri yapıldı (Şekil 8).



2100 expert_High Sensitivity DNA Assay_DEDAE02037_2025-04-16_12-44-13.xad Page 1 of 19

Assay Class: High Sensitivity DNA Assay
Data Path: C:\...gh Sensitivity DNA Assay_DEDAE02037_2025-04-16_12-44-13.xad

Created: 16.04.2025 12:44:12
Modified: 16.04.2025 13:24:41

Electrophoresis File Run Summary

Instrument Information:

Instrument Name: DEDAE02037 Firmware: C.01.069
Serial#: DEDAE02037 Type: G2939B

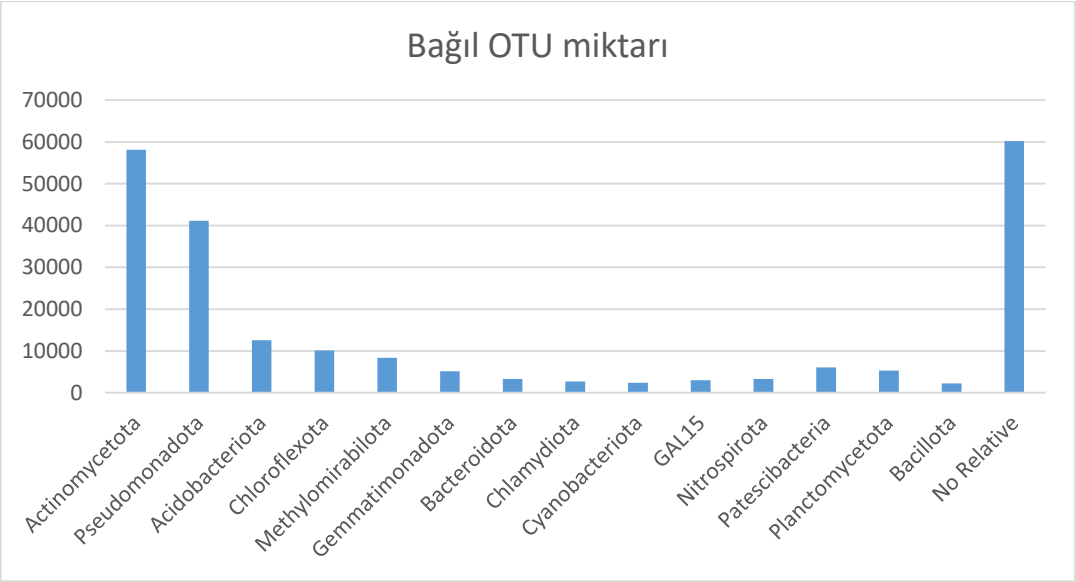
Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files (x86)\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\dsDNA\High Sensitivity DNA.xsy
Assay Class: High Sensitivity DNA Assay
Version: 1.03
Assay Comments: Copyright © 2003-2010 Agilent Technologies

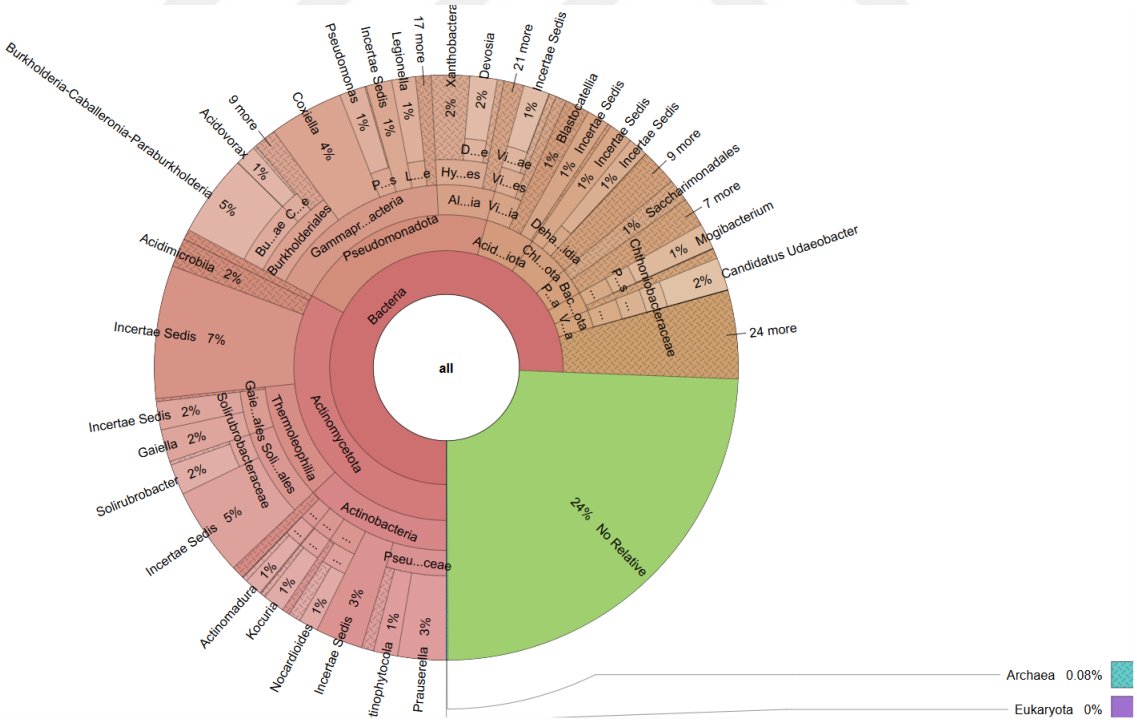
Chip Information:

Chip Lot #:
Reagent Kit Lot #:
Chip Comments:

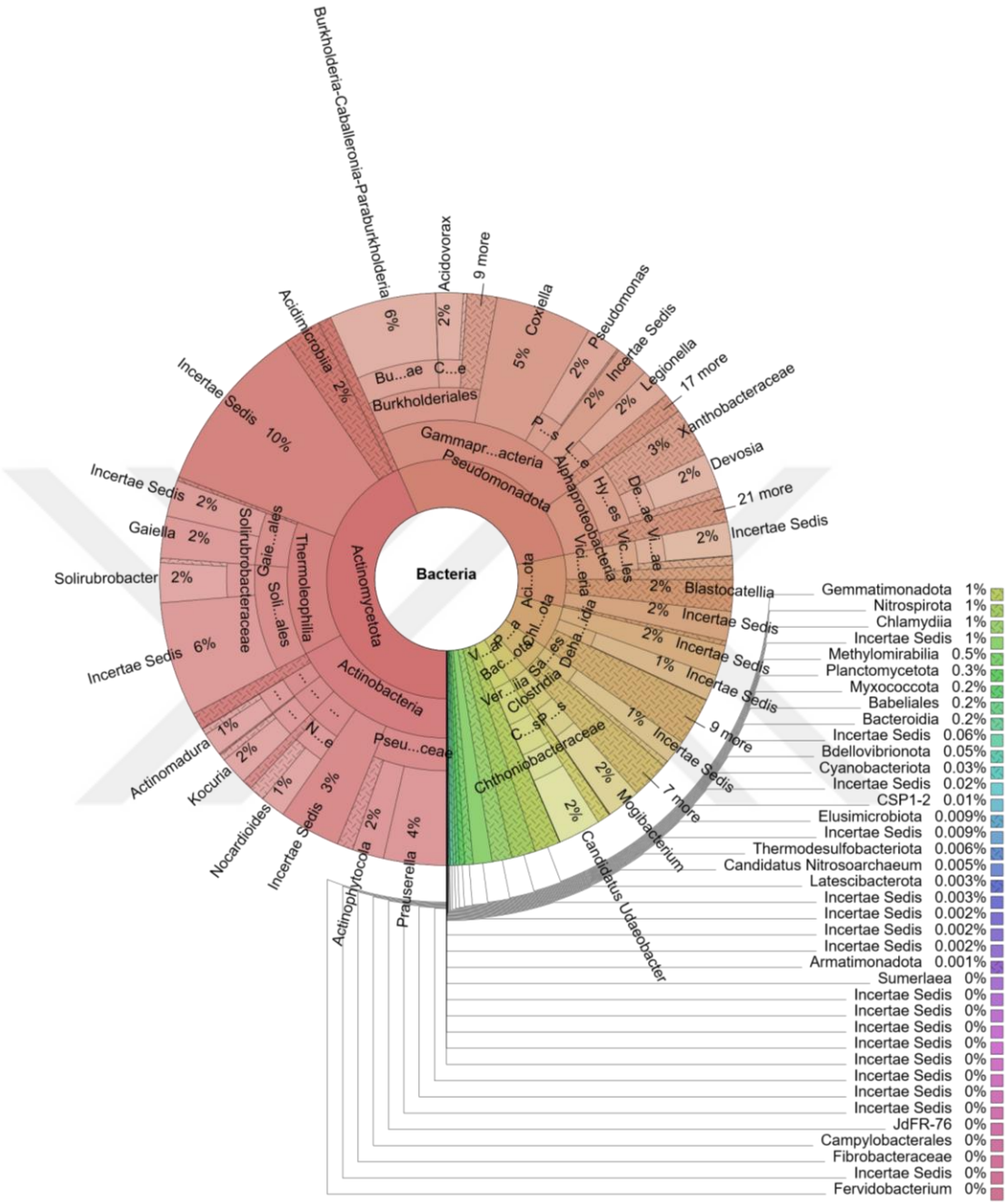
Şekil 11. Bioanalyzer Sonuçları



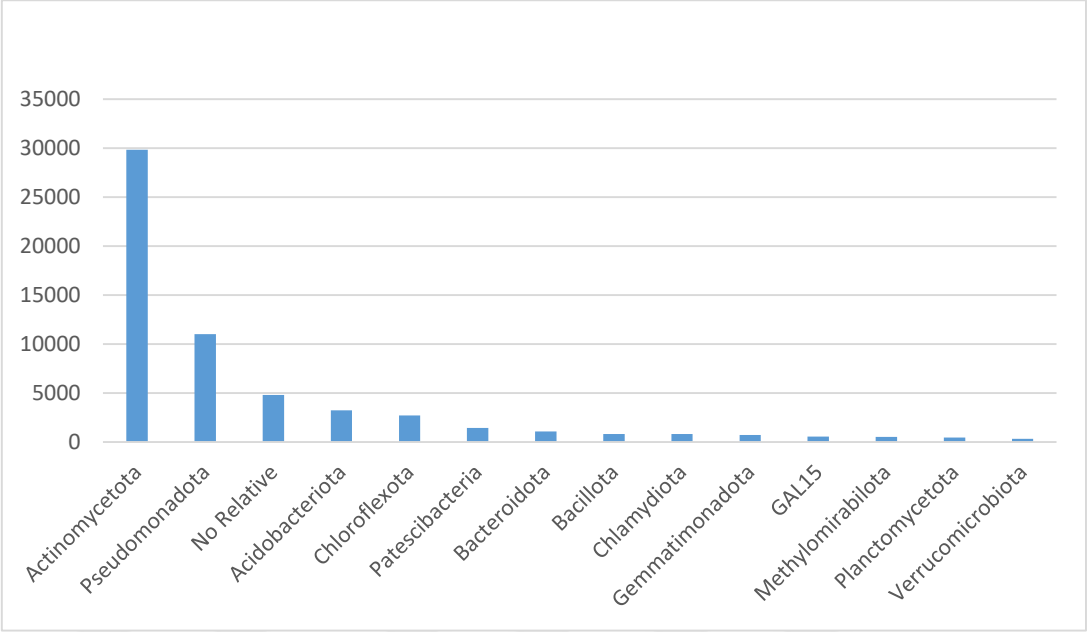
Şekil 12. 4504-1 örneğine ait bağıl OTU sonuçları



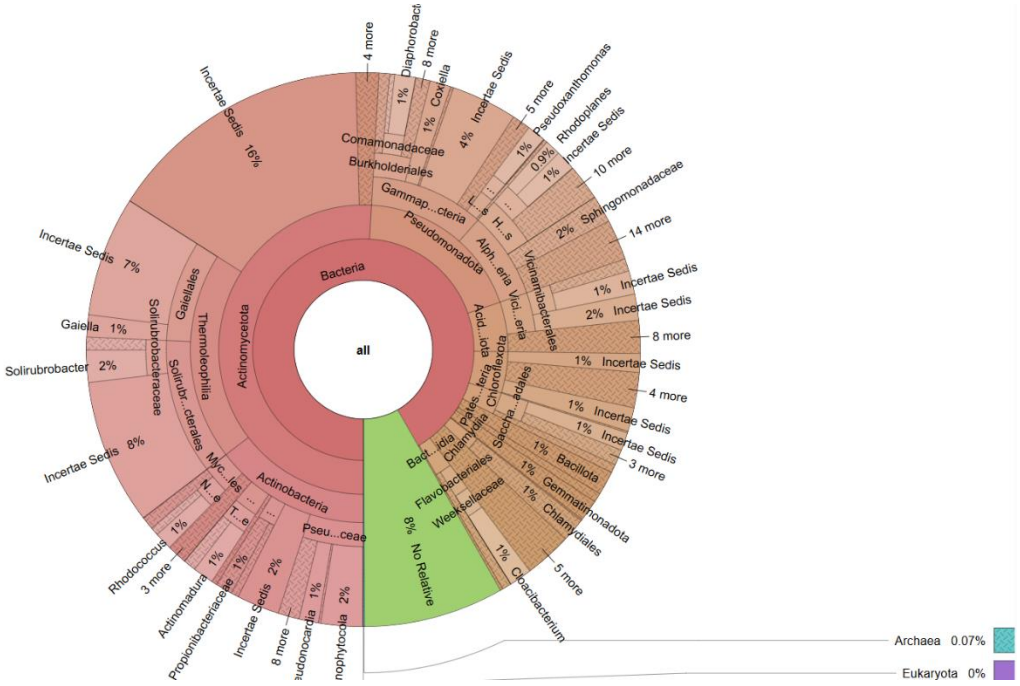
Şekil 13. 4504-1 örneğine ait Krona Pasta grafiği



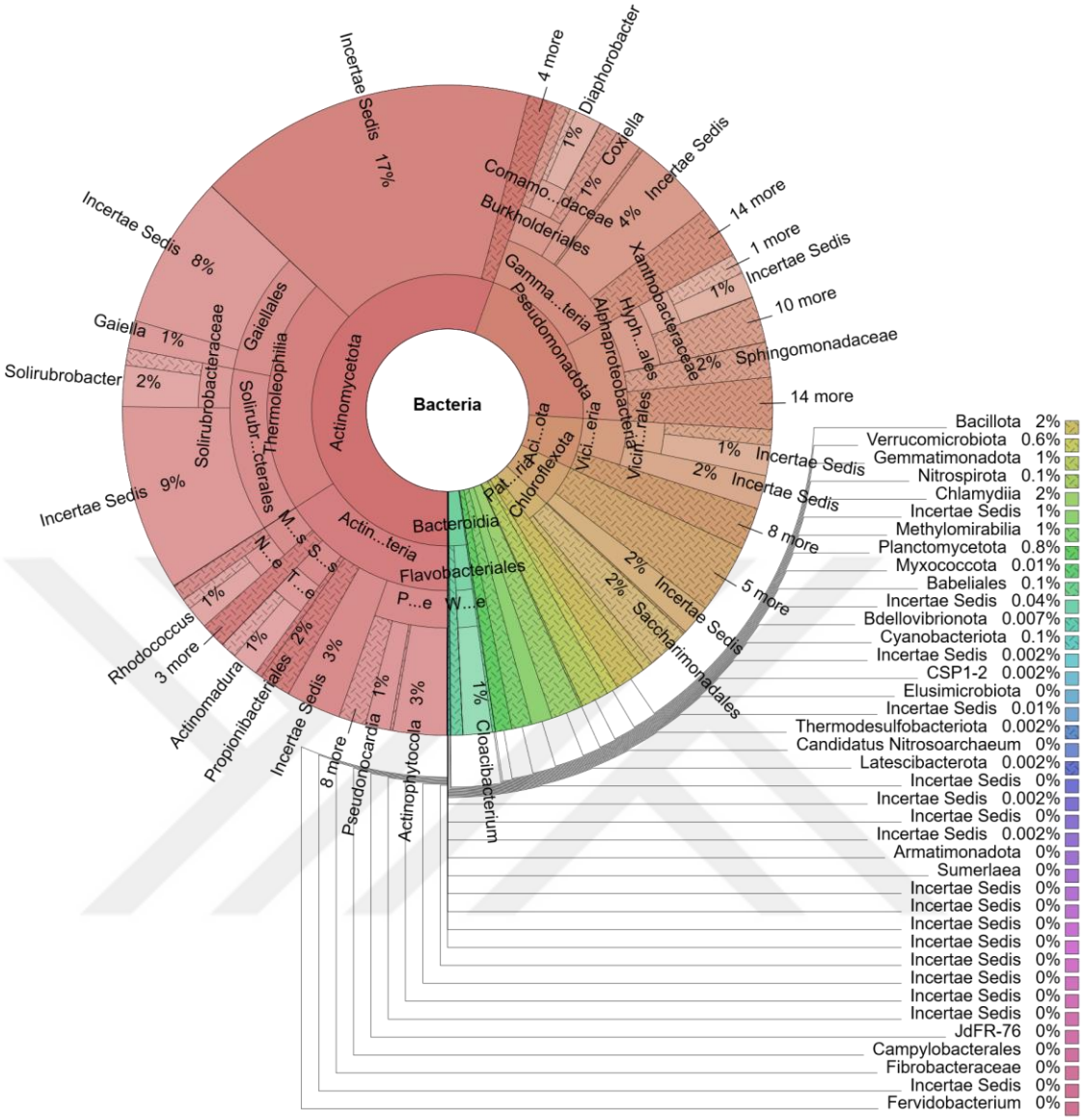
Şekil 14. 4504-1 örneğine ait belirlenen bakterileri gösteren Krona Pasta grafiği



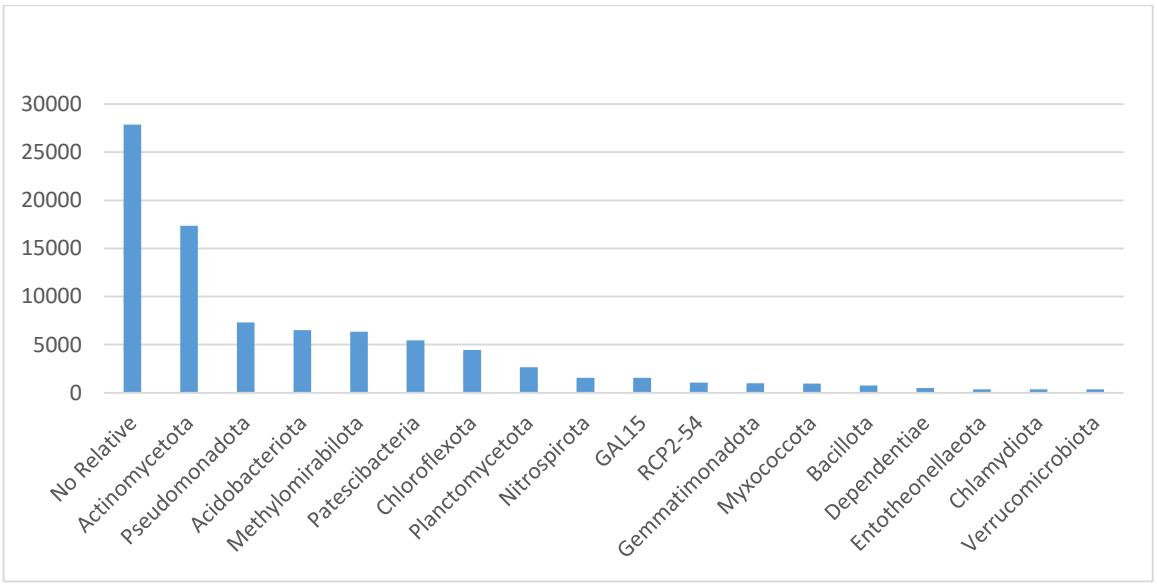
Şekil 15. 4504-2 örneğine ait örneğine ait bağıl OTU sonuçları



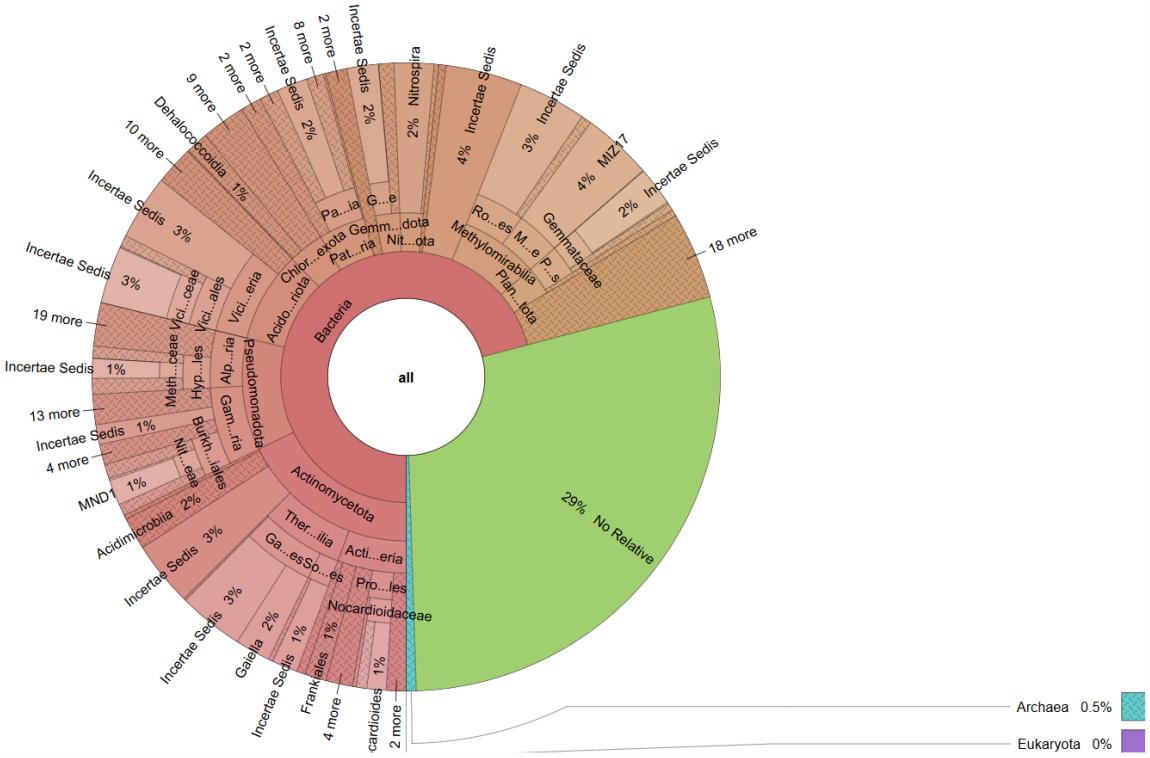
Şekil 16. 4504-2 örneğine ait örneğine örneğine ait Krona Pasta grafiği



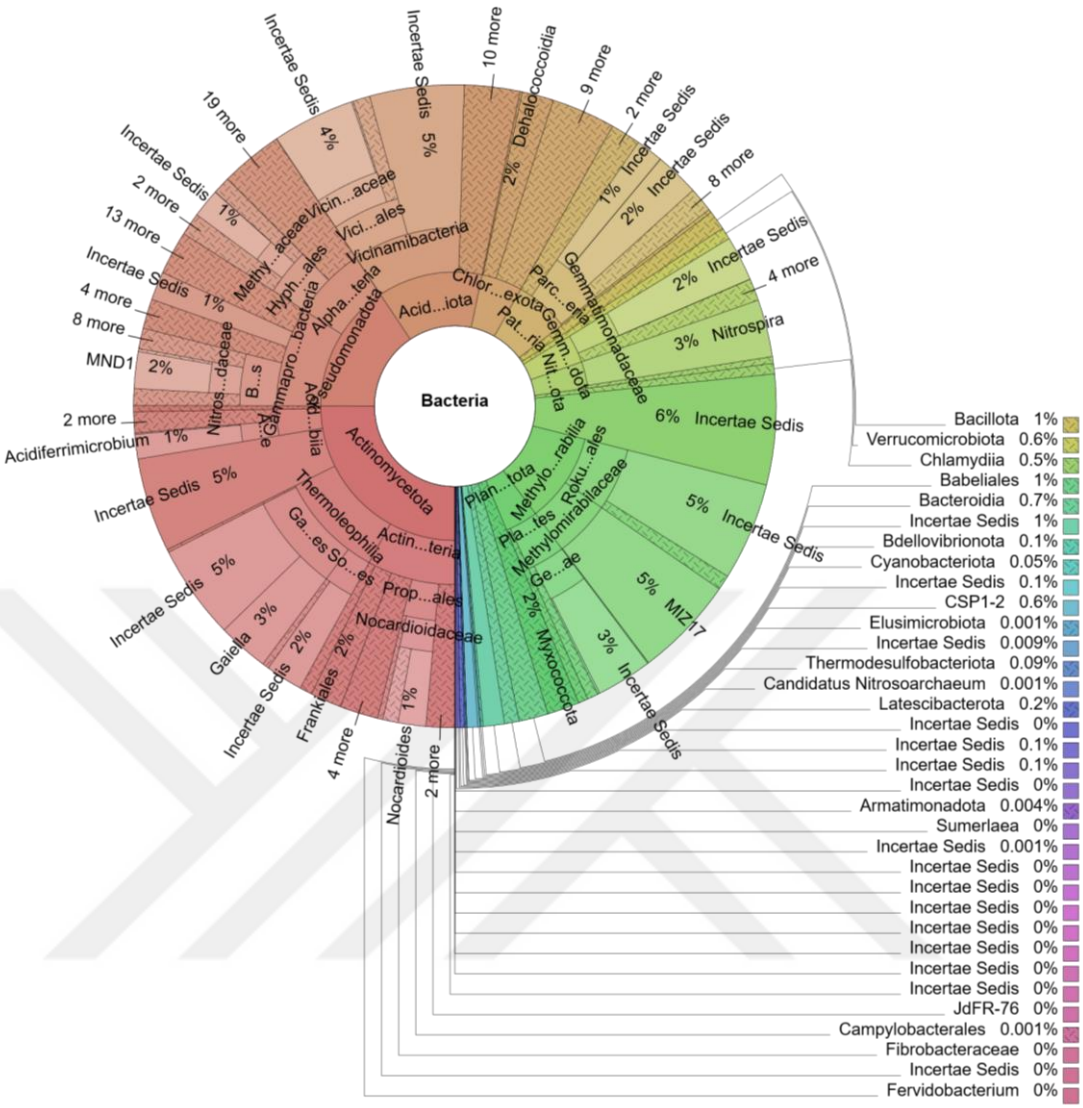
Şekil 17. 4504-2 örneğine ait belirlenen bakterileri gösteren Krona Pasta grafiği



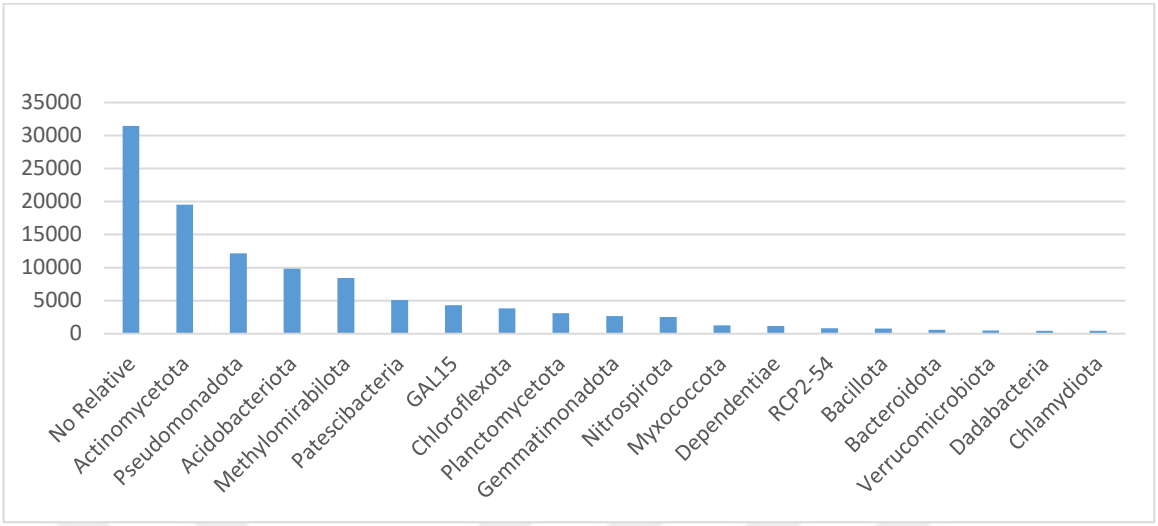
Şekil 18. 4505-1 örneğine ait örneğine ait bağıl OTU sonuçları



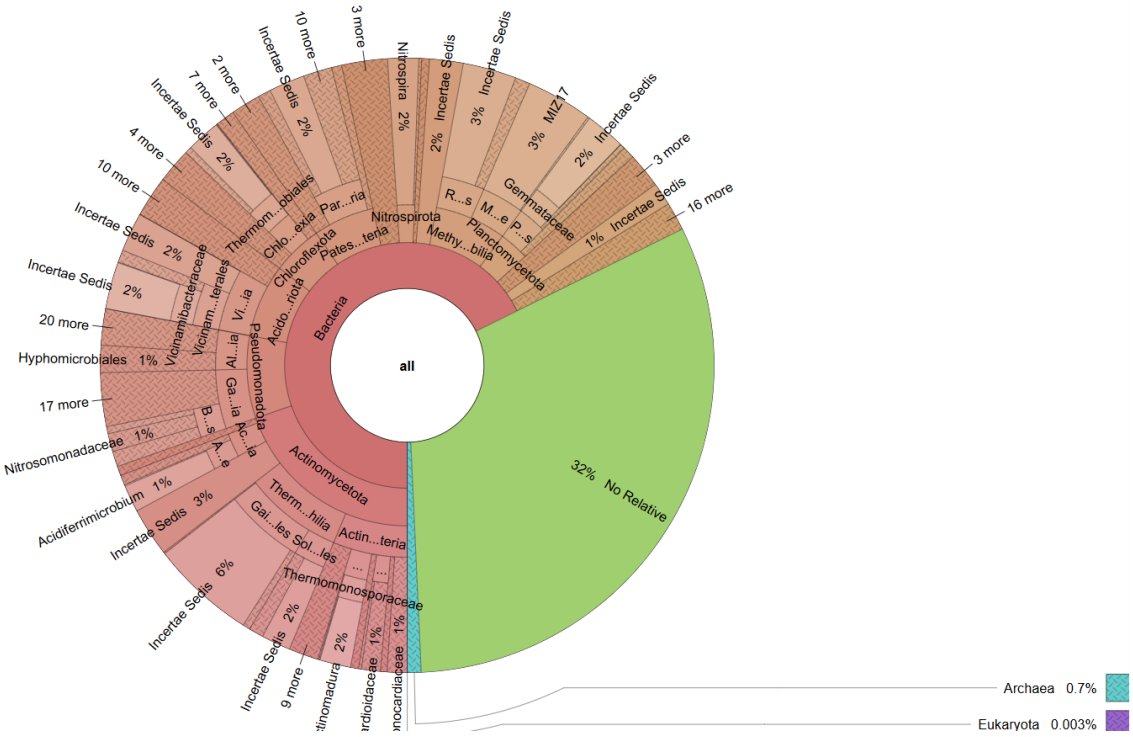
Şekil 19. 4505-1 örneğine ait örneğine örneğine ait Krona Pasta grafiği



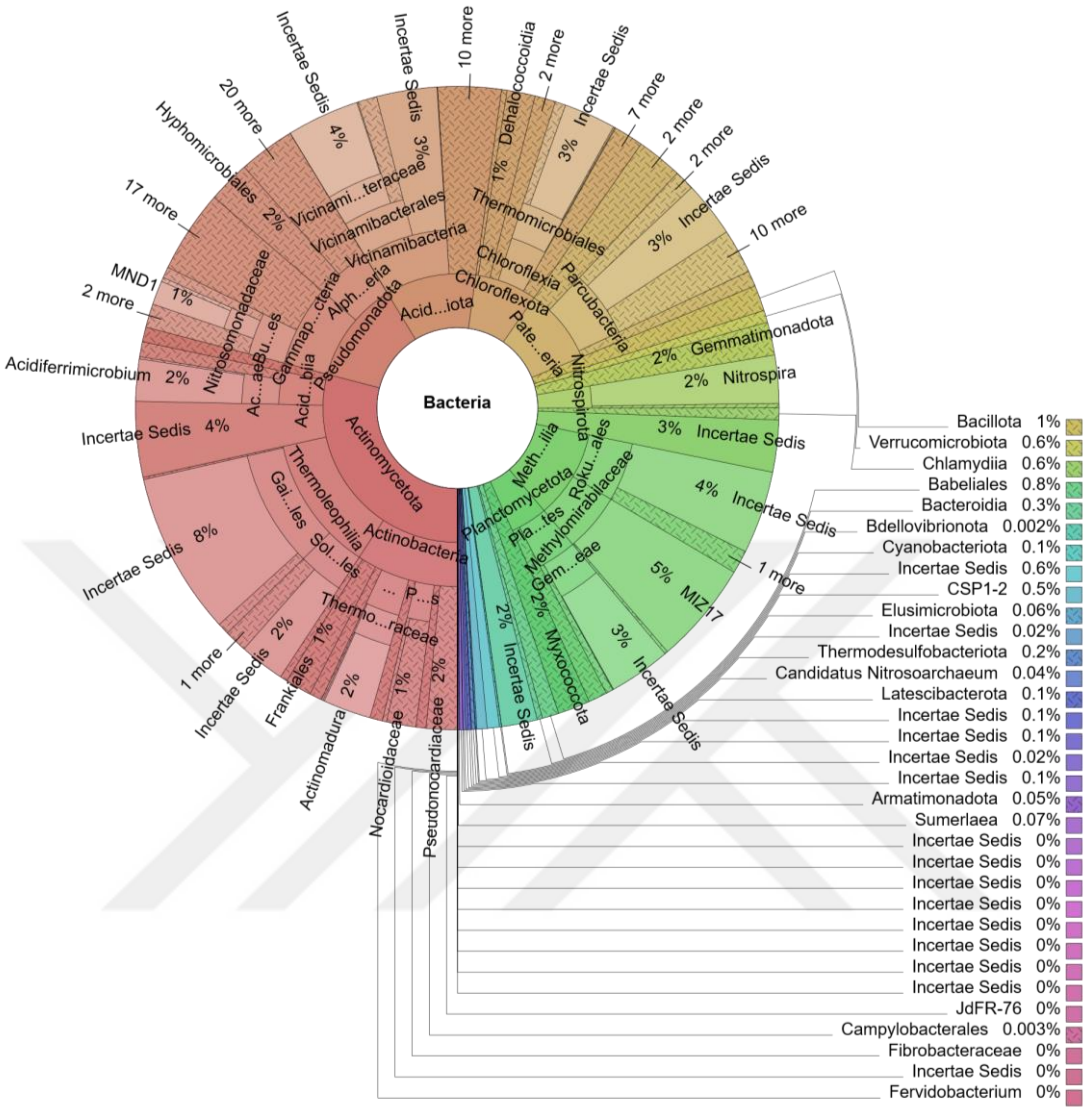
Şekil 20. 4505-1 örneğine ait belirlenen bakterileri gösteren Krona Pasta grafiği



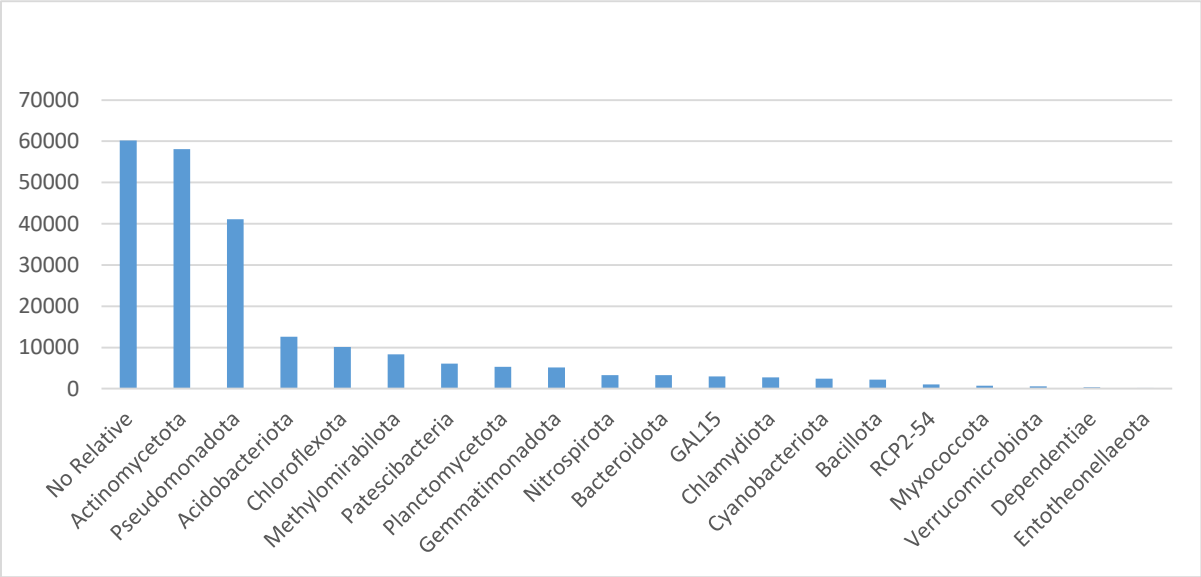
Şekil 21. 4505-02 örneğine ait örneğine ait bağıl OTU sonuçları



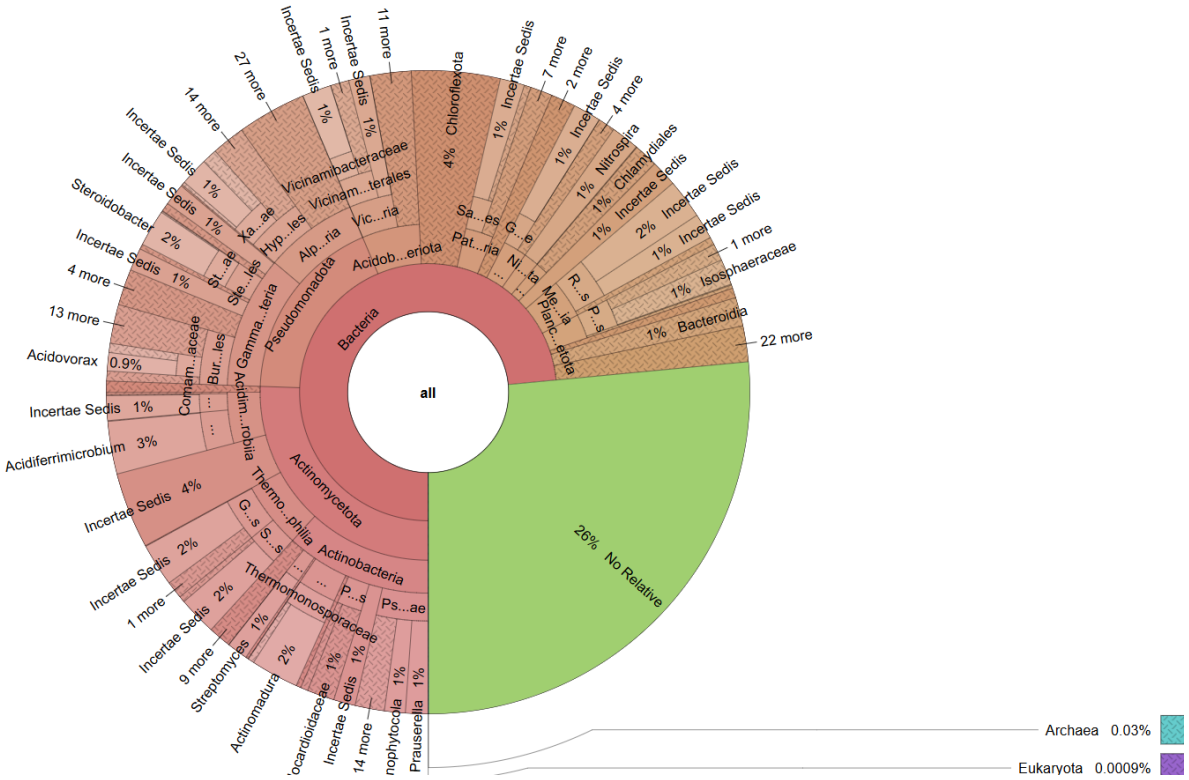
Şekil 22. 4505-02 örneğine ait örneğine örneğine ait Krona Pasta grafiği



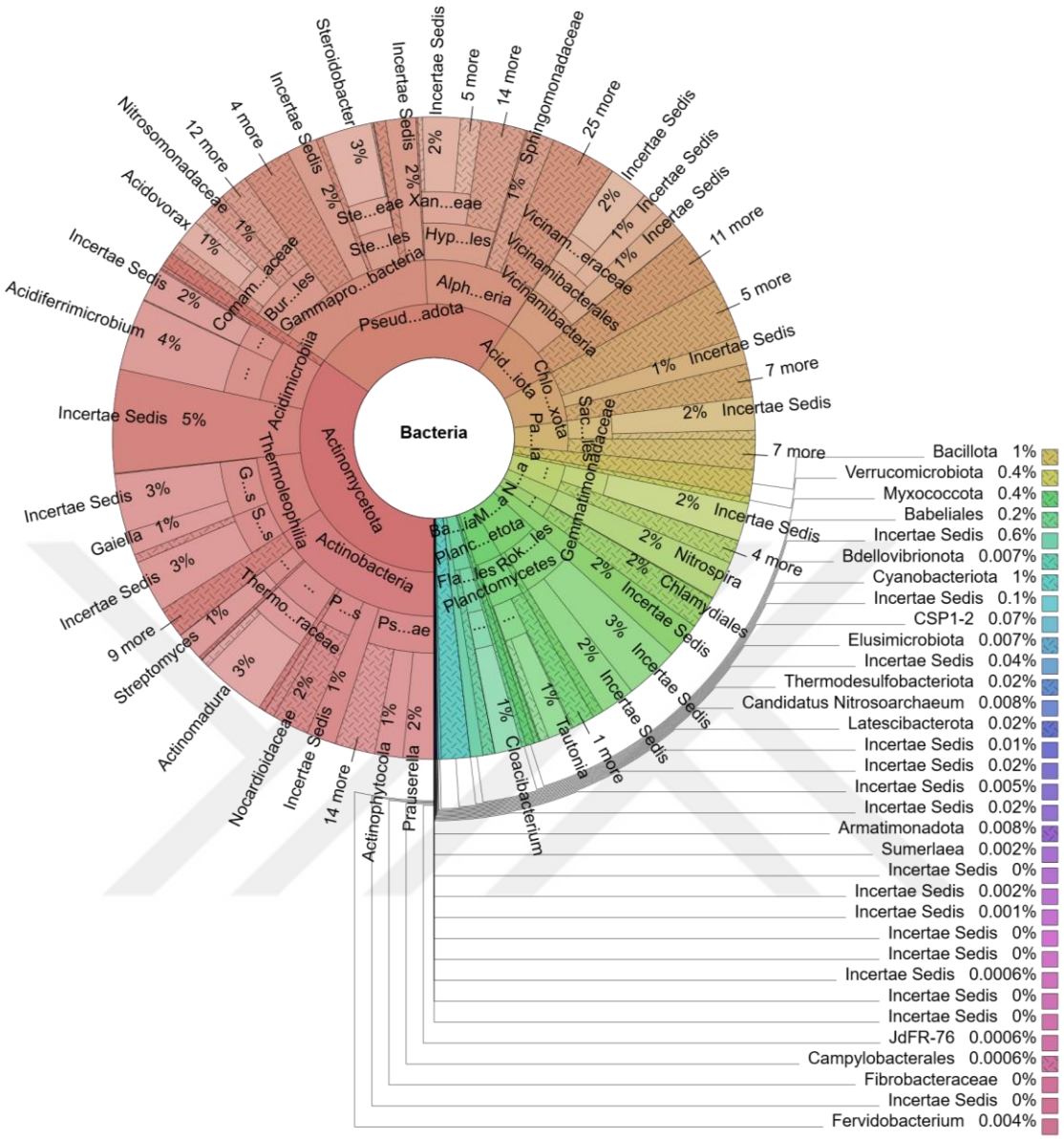
Şekil 23. 4505-02 örneğine ait belirlenen bakterileri gösteren Krona Pasta grafiği



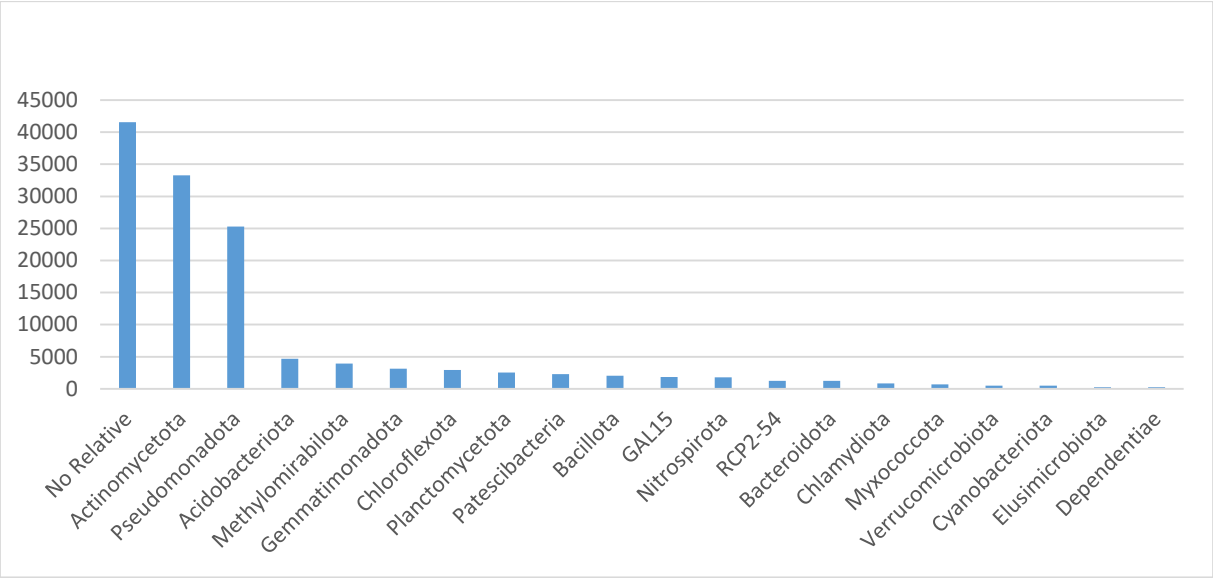
Şekil 24. 4506-1 örneğine ait örneğine ait bağıl OTU sonuçları



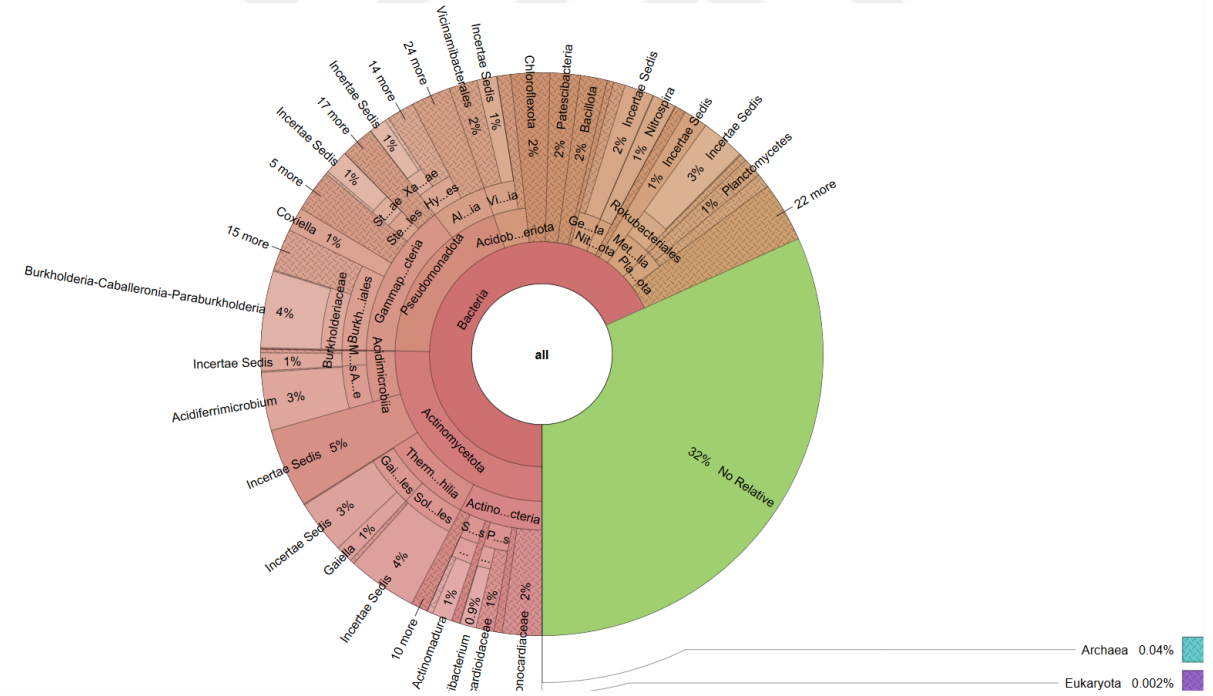
Şekil 25. 4506-1 örneğine ait örneğine örneğine ait Krona Pasta grafiği



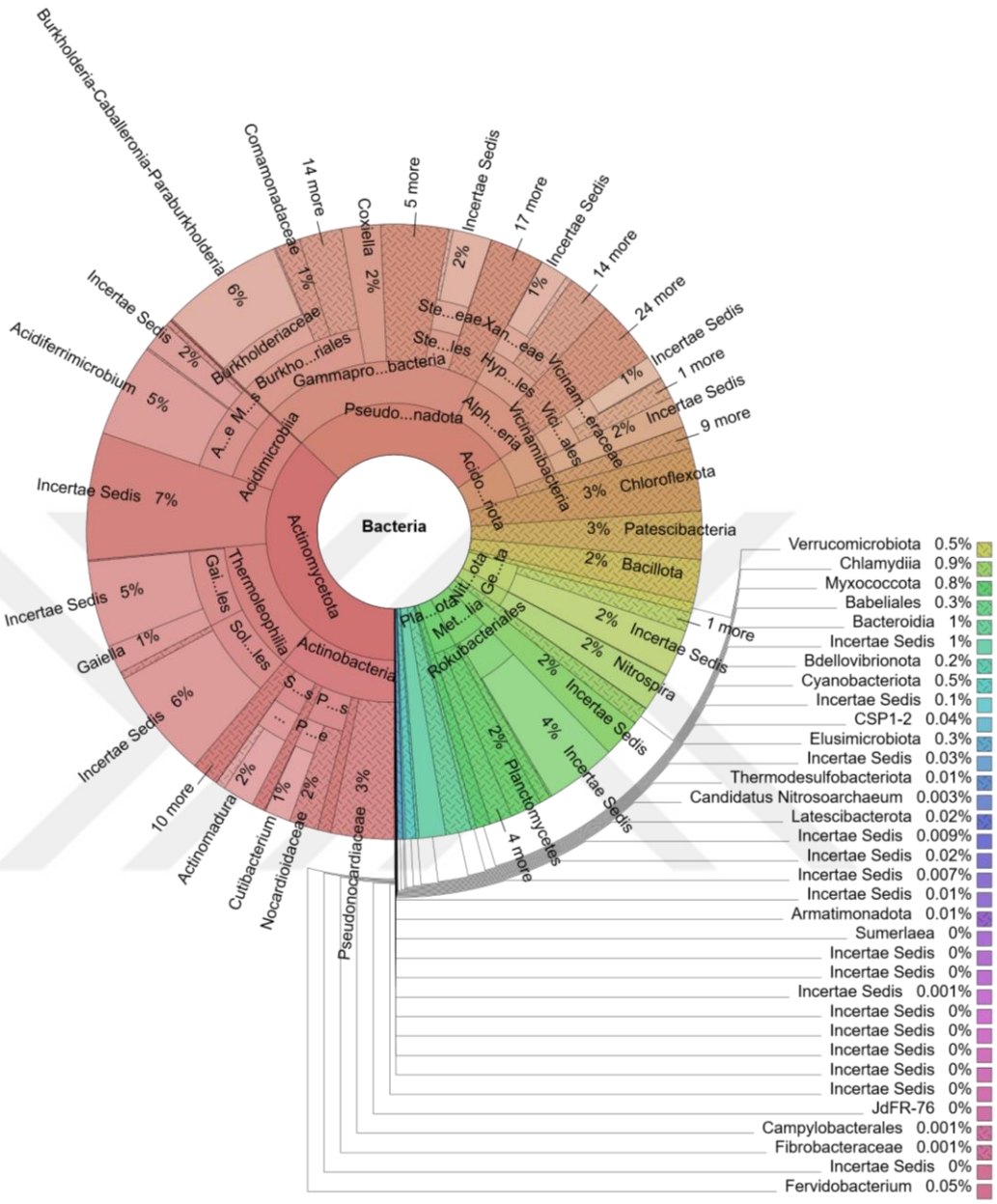
Şekil 26. 4506-1 örneğine ait belirlenen bakterileri gösteren Krona Pasta grafiği



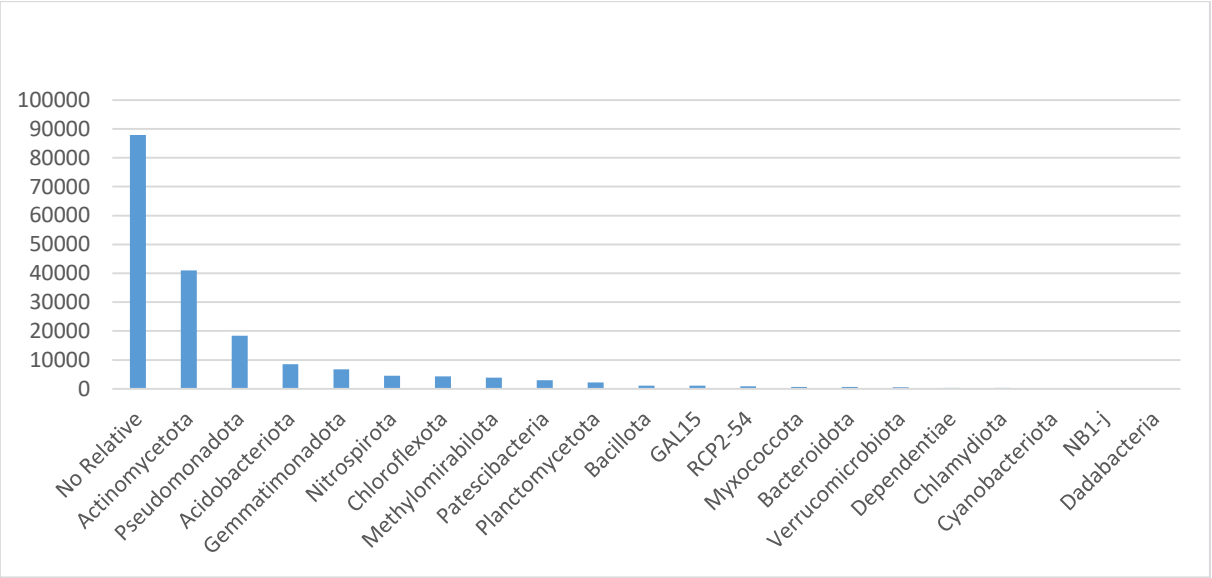
Şekil 27. 4506-2 örneğine ait örneğine ait bağıl OTU sonuçları



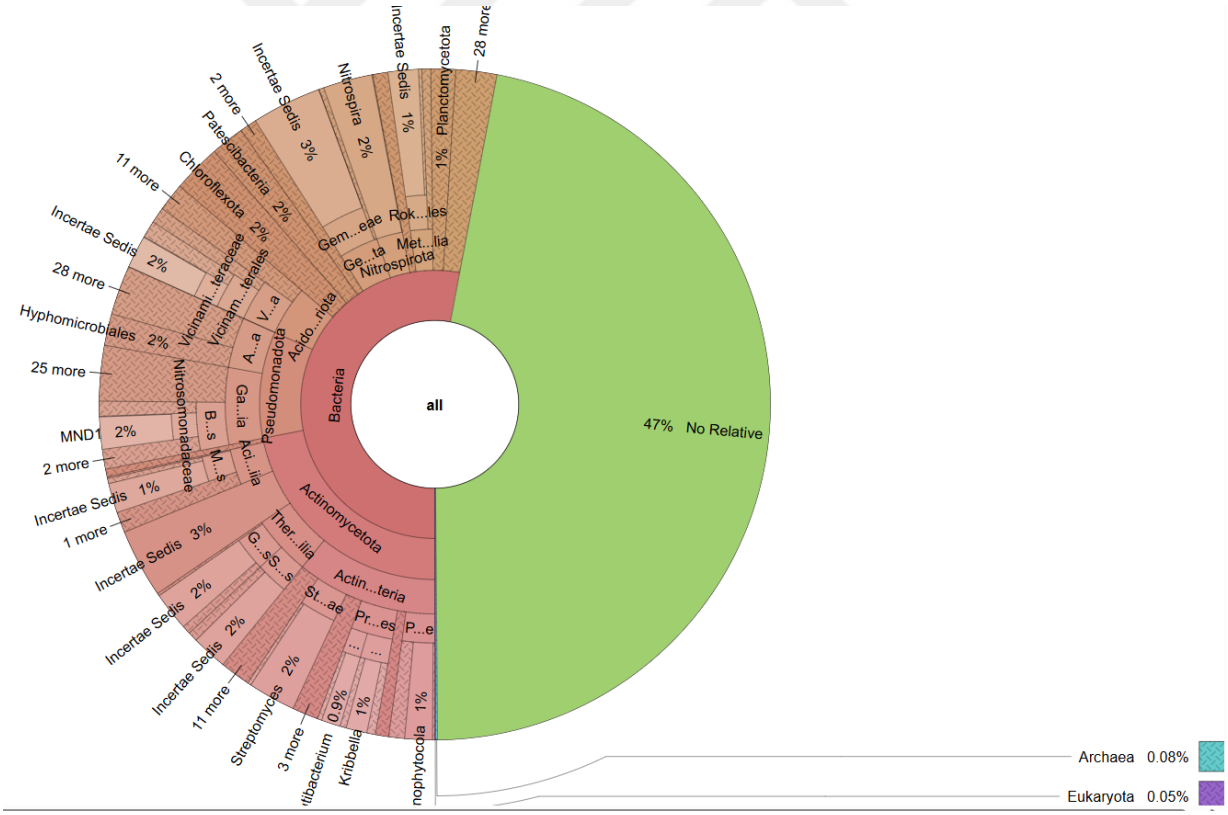
Şekil 28. 4506-2 örneğine ait örneğine örneğine ait Krona Pasta grafiği



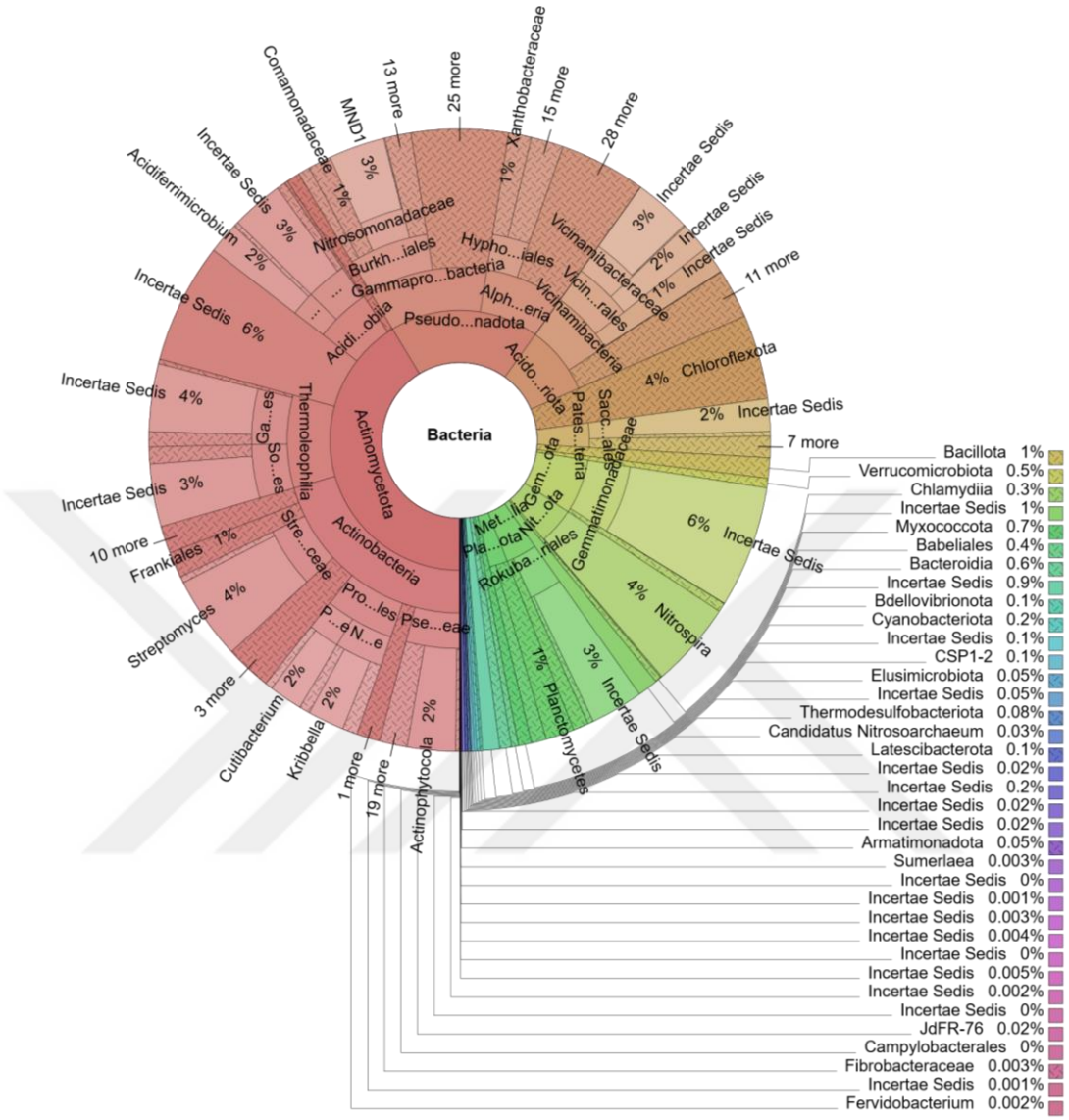
Şekil 29. 4506-2 örneğine ait belirlenen bakterileri gösteren Krona Pasta grafiği



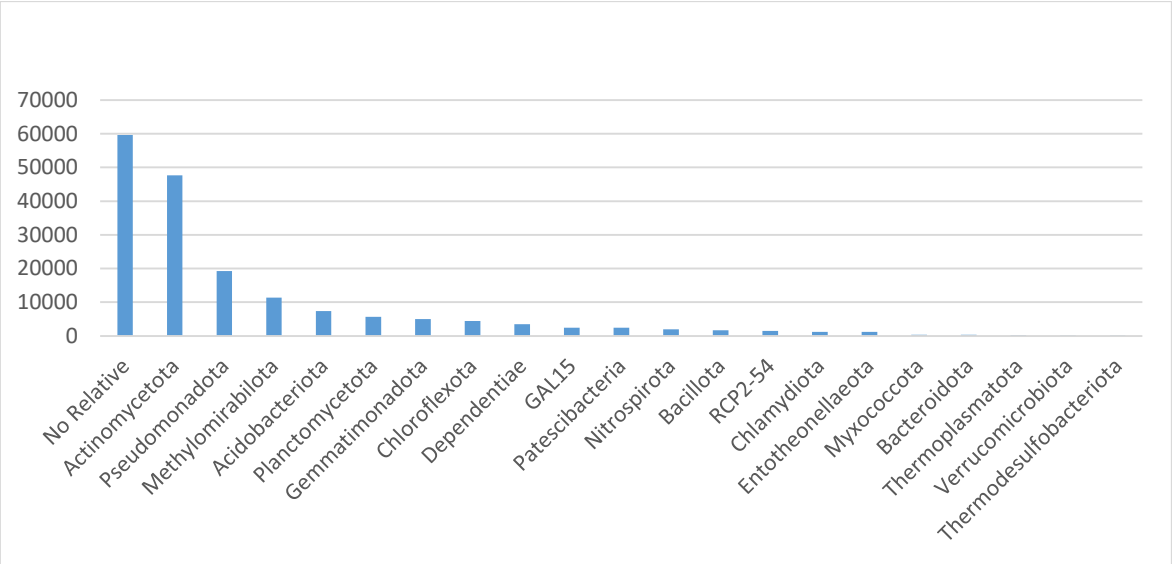
Şekil 30. 4507-1 örneğine ait örneğine ait bağıl OTU sonuçları



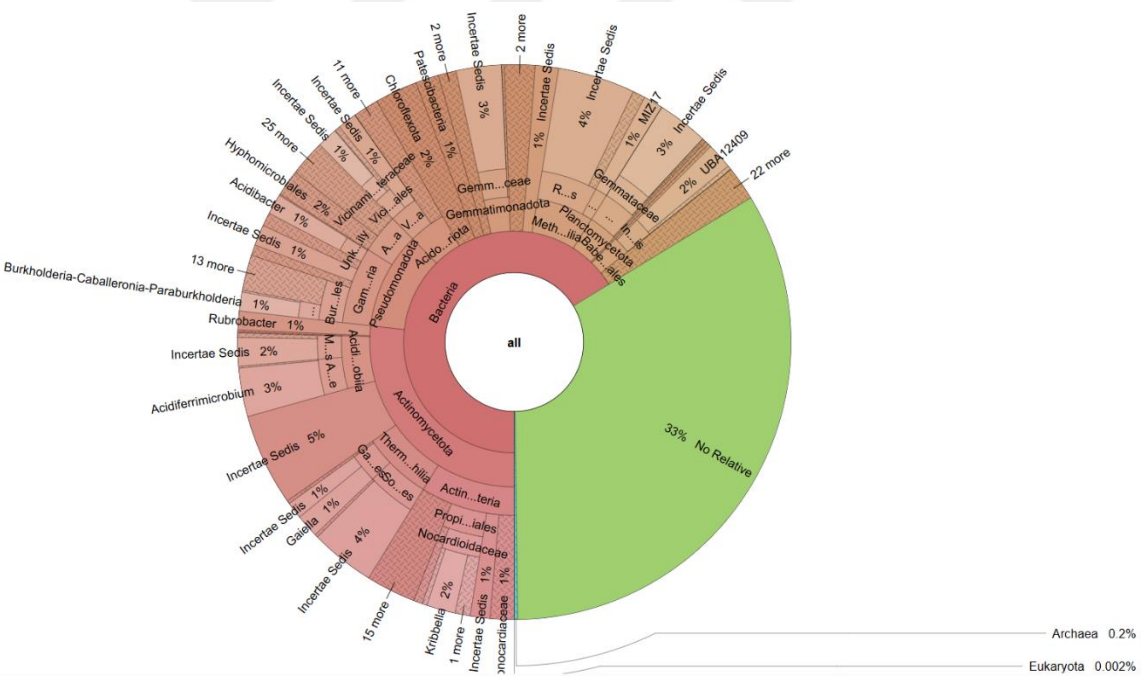
Şekil 31. 4507-1 örneğine ait örneğine örneğine ait Krona Pasta grafiği



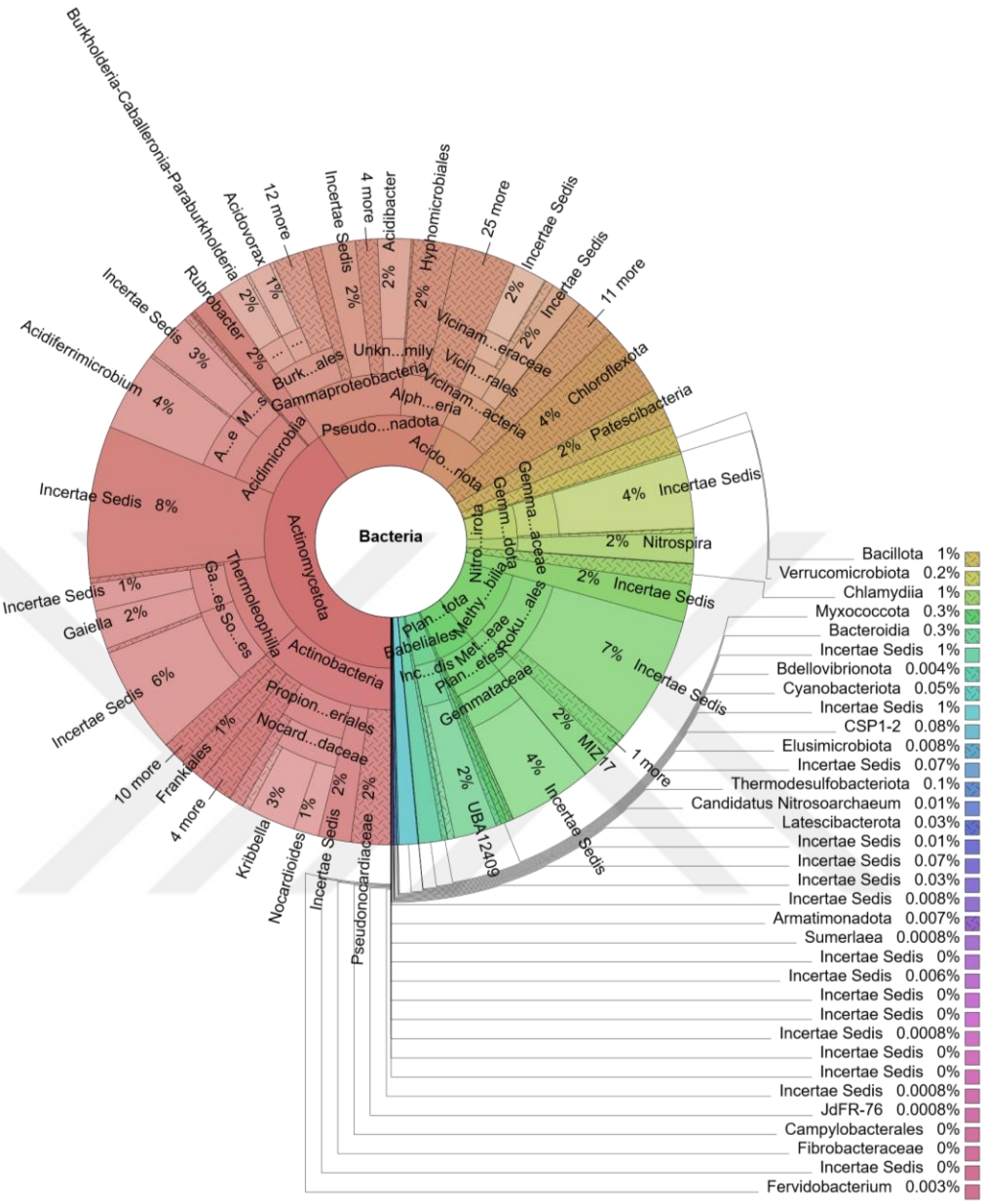
Şekil 32. 4507-1 örneğine ait belirlenen bakterileri gösteren Krona Pasta grafiği



Şekil 33. 4507-2 örneğine ait örneğine ait bağıl OTU sonuçları



Şekil 34. 4507-2 örneğine ait örneğine örneğine ait Krona Pasta grafiği


Bacteria
Actinomycetota
Actinobacteria
Thermoleophilia
Acidimicrobiia
Gammaproteobacteria
Pseudo...nadota
Acido...riota
Gemm...dota
Chloroflexota
Patescibacteria
Nitro...riota
Plan...lota
Methy...bilia
Babeliales
Inc...dis
Met...eae
Roku...ales
Plan...etes
Gemmataceae
UBA12409
MIZ17
Nocard...daceae
Propion...eriales
Frankiales
Kribbella
Nocardioides
Pseudonocardiaceae
Ca...es
So...es
Gaiella
Burk...ales
Vicinam...eraceae
Vicih...rales
Vicinam...acteria
Alph...eria
Hyphomicrobiales
Acidibacter
Vicinam...acteria
Unkn...mily
Rubrobacter
Acidovorax
Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia
Acidiferrimicrobium
Incertae Sedis 8%
Incertae Sedis 1%
Incertae Sedis 6%
Incertae Sedis 4%
Incertae Sedis 3%
Incertae Sedis 2%
Incertae Sedis 1%
Incertae Sedis 2%
Incertae Sedis 2%
Incertae Sedis 2%
Incertae Sedis 11 more
Incertae Sedis 25 more
4% Incertae Sedis
2% Nitrospira
2% Incertae Sedis
7% Incertae Sedis
2% MIZ17
1 more
4% Incertae Sedis
2% UBA12409
Incertae Sedis
Incertae Sedis
Incertae Sedis

5. TARTIŞMA

Son yıllarda antik DNA (aDNA) analizlerinde yaşanan teknik gelişmeler, arkeolojik insan kalıntılarından mikrobiyal DNA'nın elde edilmesini mümkün kılmış ve bu alanda çok sayıda disiplinlerarası çalışma yapılmasına olanak tanımıştır. Özellikle diş pulpası ve kemik dokusu gibi farklı biyolojik materyallerin mikrobiyal içerik açısından değerlendirilmesi, geçmişteki enfeksiyon hastalıklarının izlenebilmesi ve bireylerin mikrobiyal geçmişlerinin anlaşılması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda yapılan çeşitli çalışmalarda, örnek tipine bağlı olarak elde edilen antik mikrobiyal DNA'nın miktarı, korunmuşluğu ve çeşitliliği arasında farklılıklar olabilir.

Literatürde mikrobiota çalışmaları incelendiğinde OTU sayısının güncel bakteri taramalarında İnsan bağırsak mikrobiyotası için 500 - 1.000 OTU, Ağız / Deri gibi diğer vücut bölgeleri için 100 - 500 OTU, Toprak / çevresel örnekler için 2.000 - 10.000+ OTU, Su örnekleri için 500 - 5.000 OTU olduğu görülmektedir. Antik örneklerde ise Antik dışkı (coprolite) 50–300 OTU (iyi korunmuşsa), Antik diş taşı (calculus) için 100–500 OTU ve Kemik / iskelet kalıntısı için 10–200 OTU arası değişiklikler göstermektedir (Farrer vd.2021, s.7456; Lugli vd, 2017, s.1; Ottoni vd, 2021, 1; Philips vd, 2020, s.1; Ziesemer vd, 2015, s.1). Warinner et al. (2015) diş taşı (dental calculus) örneklerinde yapılan metagenomik analizlerde, bir örnek başına ortalama 500-800 OTU tespit edildiğini ve bu yüksek çeşitliliğin, diş taşının hem çevresel hem de oral mikrobiyal toplulukların korunması için zengin bir ortam olduğunu gösterdiğini bildirmiştir. Mann vd. (2018) antik diş pulpası ve kemik örnekleri karşılaştırıldığında, diş pulpasından izole edilen mikrobiyal toplulukların OTU sayısı 350-600 arasında değişirken, kemik örneklerinde bu sayı 150-400 arasında raporlanmıştır. Araştırıcılar tarafından diş örneklerinin daha yüksek mikrobiyal çeşitlilik barındırdığı ve DNA koruma kapasitesinin kemikten üstün olduğu belirtilmiştir. Adler vd. (2013) çalışmalarında farklı tarihsel dönemlere ait diş taşı örneklerinde ortalama 600-750 OTU tanımlamıştır. Ayrıca, diyet değişikliklerinin mikrobiyal çeşitliliği etkilediği ve bunun OTU sayılarındaki farklılıklara yansıdığını vurgulamışlardır. Sunulan bu çalışmada dört farklı örnek havuzundan her birinden ikişer örnek olmak üzere alınan kemik ve diş materyalleri üzerinden yapılan toplam sekiz çalışma örneğinin metagenomik analizleri sonucunda, arkeolojik kalıntılarda korunmuş mikrobiyal toplulukların yapısına dair önemli ipuçları elde edilmiştir. Myrina bölgesine ait kemik örneği (4504) ile Soğmatar kökenli diğer

kemik (4505) ve diş örneklerinden (4506, 4507) elde edilen OTU verileri karşılaştırıldığında, genel olarak *Actinomycetota*, *Pseudomonadota*, *Acidobacteriota*, *Chloroflexota* ve *Methylomirabilota* filumlarının tüm örneklerde ortak olarak tespit edildiği görülmektedir. Bununla birlikte, diş örneklerinde (4506 ve 4507), *Gemmatimonadota*, *Nitrospirota*, *Planctomycetota* ve *Patescibacteria* gibi çevresel filogenetik grupların daha çeşitlenmiş bir biçimde bulunması, diş pulpasının mikrobiyal çeşitlilik açısından daha zengin bir kaynak olabileceğini düşündürmektedir. Benzer şekilde, Mann ve ark. (2018) tarafından yürütülen bir çalışma, diş örneklerinden izole edilen antik DNA'nın, kemik dokusuyla kıyaslandığında genellikle daha iyi korunduğunu ve metagenomik çeşitlilik açısından daha zengin bir taksonomik temsil sunduğunu göstermektedir. Bu bulgu, diş dokusunun damar yapısı ve mineral yapısı sayesinde mikrobiyal DNA'nın çevresel bozunmalara karşı daha dirençli bir koruma sağladığını düşündürmektedir.

Analiz edilen kemik ve diş örnekleri arasında gözlemlenen mikrobiyal çeşitlilik, örneklerin coğrafi kökenine ve doku türüne bağlı olarak farklılık göstermektedir. Myrina bölgesine ait kemik örneğinde tespit edilen mikrobiyal filumlar, Soğmatar bölgesinden alınan kemik ve diş örneklerindekilere kıyasla daha sınırlı çeşitlilik göstermektedir. Bu durum, farklı coğrafi bölgelerdeki çevresel koşulların ve gömü uygulamalarının mikrobiyal korunum üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, diş örneklerinde tespit edilen *Gemmatimonadota*, *Nitrospirota*, *Planctomycetota* ve *Patescibacteria* gibi filumlar, diş pulpasının mikrobiyal DNA'nın korunumu açısından kemik dokusuna göre daha elverişli bir ortam sağlayabileceğini göstermektedir. Bu bulgular, diş örneklerinin antik mikrobiyal DNA analizlerinde tercih edilmesinin önemini vurgulamaktadır.

Sunulan bu çalışmada antik kemik ve diş örneklerinden elde edilen mikrobiyal topluluklar cins düzeyinde incelendiğinde, başlıca Actinomycetota (özellikle Actinomyces), Pseudomonadota (Pseudomonas gibi), Acidobacteriota, Chloroflexota, Methylomirabilota gibi gruplar belirlenmiştir. Bu sonuçlar, Warinner ve ark. (2014) tarafından antik diş taşlarında bildirilen Actinomyces ve Pseudomonas baskınlığı ile örtüşmektedir. Warinner ve ekibi, antik ağız mikrobiyomunun hem sağlık hem hastalık süreçlerinde önemli olduğunu göstermiştir (Warinner et al., 2014). Benzer şekilde, Adler ve ark. (2013) diş taşında metagenomik analizle Actinomyces ve Pseudomonas cinslerinin yaygın olduğunu raporlamış, bu bakterilerin diş ve kemik örneklerinde antik dönem mikroflorasının temel bileşenleri olduğunu ortaya koymuştur.

Myrina bölgesi kemik profilinde tespit edilen Actinomycetota, Pseudomonadota, Acidobacteriota ve Chloroflexota cinsleri, özellikle toprak ve çevresel kökenli mikroorganizmalar olup, Fierer vd. (2007) tarafından toprak mikrobiyomunda yaygın bulunan gruplar bildirilmiştir. Bu bulgu, kemik örneklerinin gömüldüğü toprağın mikrobiyal yapısı ile ilişkili olabilir.

Soğmatar bölgesi kemik örneğinde ayrıca Patescibacteria gibi az bilinen ancak çevresel DNA metagenomlarında bulunan cinslerin yer alması, bölgesel mikrobiyal çeşitliliğin ve çevresel koşulların farklılığını yansıtmaktadır (Rinke vd, 2013, s. 431–437).

Soğmatar bölgesi diş örnekleri daha zengin mikrobiyal topluluklar göstermiş, Planctomycetota, Gemmatimonadota ve Nitrospirota gibi çevresel bakteriler de saptanmıştır. Mann vd. (2018) diş pulpasından elde edilen örneklerde benzer şekilde daha yüksek çeşitlilik ve farklı mikrobiyal topluluklar rapor etmişlerdir, diş yapısının DNA korunumu için avantajlı olması bu farkı açıklamaktadır. Diğer bazı çalışmalar da (Ozga vd, 2016, s. 204–214; Cooper ve Poinar, 2000, s. 1139) antik diş örneklerinin yoğun mineralizasyonu nedeniyle DNA'nın daha iyi korunduğunu ve daha zengin mikrobiyal DNA elde edildiğini belirtmektedir. Bu çalışmada diş örneklerinde daha fazla OTU tespiti, bu literatürle paralellik göstermektedir. Öte yandan, DNA bozunması ve kontaminasyon riski halen paleomikrobiyoloji için temel zorluklardır. Warinner vd. (2015) tarafından önerilen steril protokoller ve negatif kontroller bu riskleri azaltmada kritik önemdedir. Çalışmada bu standartlara uyulması, sonuçların güvenilirliğini artırmaktadır.

Toprak kaynaklı bakteriler olan Acidobacteriota, Chloroflexota ve Gemmatimonadota'nın yüksek oranlarda bulunması, örneklerin gömüldüğü toprağın mikrobiyal topluluğunu yansıtmaktadır. Fierer vd. (2007) ve Rinke vd. (2013) gibi çalışmalar, bu bakterilerin nem, pH ve organik madde gibi çevresel parametrelere bağlı olarak çeşitlilik gösterdiğini belirtmektedir. Şanlıurfa ve İzmir bölgelerinin jeokimyasal ve iklimsel farkları mikrobiyal kompozisyondaki çeşitliliğin kaynağı olabilir (Adler vd, 2013, s. 450–455).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, İzmir Myrina Antik Kenti ve Şanlıurfa Soğmatar Antik Kenti mezarlarından alınan antik kemik ve diş örneklerinden elde edilen mikrobiyal DNA'nın metagenomik analizini yaparak, antik döneme ait mikrobiyal çeşitlilik ve ekolojiyi ortaya koymuştur. Elde edilen bulgular, diş örneklerinde antik DNA korunumunun kemiklere oranla genellikle daha iyi olduğunu ve metagenomik çeşitliliğin bu örneklerde çok daha zengin bir şekilde korunduğunu ortaya koymuştur. Bu durum, antik DNA araştırmalarında diş dokusunun, paleomikrobiyolojik analizlerde tercih edilecek kritik bir materyal olduğunu gösteren önceki bulgularla da tutarlıdır (Ozga vd, 2016, s. 204–214; Mann vd, 2018, s. 82–94). Tespit edilen mikrobiyal gruplar, hem antik insan ağız florasının bileşenlerini hem de gömüldükleri çevresel koşulların mikrobiyal yansımalarını içermektedir. Bu çalışma, paleomikrobiyoloji alanında bölgesel ve örnek tipine özgü mikrobiyal profillerin anlaşılmasına katkı sağlamaktadır.

Örneklerde bakteriler filum düzeyinde belirlenmiş olup *Actinomycetota* filumunda insan ve hayvanlarda tüberküloz ve insanlarda lepra etkeninin yert aldığı *Mycobacterium,* difteri etkeni *Corynebacterium*, insanlarda ve hayvanlarda enfeksiyonlar oluşturabilecek *Nocardia, Pseudomonadota* filumunda veba etkeni *Yersinia,* kolera etkeni *Vibrio,* gastrit etkeni *Helicobacter*, ayrıca sıklıkla görülen ve hastalık yapıcı olan *Salmonella*, *Escherichia, Pseudomonas* gibi genuslar yer almaktadır. Bu nedenle saptanan antik bakteriler sonraki aşamada tür düzeyinde belirlenmelidir. Belirlenen diğer filumlar ise daha çok hastalık yapmayan çevresel etkenleri içermektedir.

Sonuç olarak, sunulan bu çalışmada gözlenen mikrobiyal profiller hem antik ağız florasının hem de gömüldükleri çevrenin izlerini taşımakta ve literatürle uyumlu olarak antik mikrobiyoloji alanına katkı sağlamaktadır.

Öneriler

Tür düzeyinde analizlerin yapılması: Bu çalışmada bulgular cins düzeyinde sınırlı kalmıştır. İleri aşamada tür düzeyinde tanımlama ve fonksiyonel analizlerin yapılması, mikrobiyal toplulukların ekolojik ve patojenik rollerinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

Geniş örnek setleri ve farklı coğrafyalar: Bölgesel farklılıkların etkisini daha iyi ortaya koymak için farklı coğrafyalardan ve zaman dilimlerinden daha fazla örnekle çalışmaların genişletilmesi önerilir.

Metagenomik ile beraber proteomik ve metabolomik yaklaşımlar: Antik örneklerde mikrobiyal aktivitelerin fonksiyonel düzeyde incelenmesi için genom, transkriptom, proteom ve metabolom analizlerini içeren omik yaklaşımlar entegre edilmelidir.

Standart protokollerin geliştirilmesi: Antik DNA izolasyonu ve analizinde kontaminasyon riskini azaltmak amacıyla uluslararası geçerliliği olan standart protokoller geliştirilmesi ve uygulanması önem taşımaktadır.

Paleoekolojik verilerle entegrasyon: Mikrobiyal verilerin antik çevresel, arkeolojik ve antropolojik verilerle entegre edilmesi, tarih öncesi insan ve çevre etkileşimlerinin daha kapsamlı yorumlanmasını mümkün kılacaktır.

7. KAYNAKÇA

Adamiak, J.- Otlewska, A.- Tafer, H.- Lopandic, K.- Gutarowska, B.- Sterflinger, K. ve Piñar, G. (2018). "First evaluation of the microbiome of built Cultural Heritage by using the Ion Torrent next generation sequencing platform", *Int. Biodeterio, Biodegrad*, 131: 11–18.

Adler, C. J. - Dobney, K. - Weyrich, L. S.- Kaidonis, J. - Walker, A. W. - Haak, W. ve Cooper, A. (2013). Sequencing ancient calcified dental plaque shows changes in oral microbiota with dietary shifts of the Neolithic and Industrial revolutions. *Nature Genetics*, *45*(4), 450–455.

Albayrak Y. ve Mutlu S. İ. (2014). "Soğmatar Kutsal Alanı Ve Yakın Çevresi Yüzey Araştırması, 2012", 3*1. Araştırma Sonuçları Toplantısı, 27-31 Mayıs 2013 Muğla. 2. Cilt,* Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Basımevi, Yayın No. 163/2, Muğla, 337-352.

Albayrak, Y. - Mutlu, S. İ. - Mutlu, S. ve Çelik, B. (2019). "Soğmatar'da Sunaklı Kaya Oyuğu Mezarlar." *Karadeniz Uluslararası Bilimsel Dergi*, Sayı 41: 263-274.

Albayrak, Y. (2015). "Soğmatar Kült Merkezi ile İlgili Yeni Öneriler", *Belgü, Ardahan Üniversitesi İnsani Bilimler ve Edebiyat Fakültesi Dergisi*, sayı 2, 179-194.

Albayrak, Y. (2019). "Soğmatar Nekropolü 2017 Yılı Temizlik Çalışmaları", 40. Kazı Sonuçları Toplantısı, 3. Cilt, 651-668.

Albayrak, Y. (2019a). *Göbekli Tepe'den Edessa'ya Şanlıurfa*, Arkeoloji ve Sanat Yayınları, İstanbul.

Albayrak, Y. (2020). "Soğmatar Nekropolü 2018 Yılı Kazı ve Temizlik Çalışmaları", *41. Uluslararası Kazı, Araştırma ve Arkeometri Sempozyumu*, 17-21 Haziran 2019, Diyarbakır, 4. Cilt: 451-464.

Albayrak, Y. (2020a). "Soğmatar Nekropolu Roma Donemi Kaya Mezarları". İn Amanosların Golgesinde Hayriye Akıl Anı Kitabı, s. 19-28.

Albayrak, Y. ve Çelik, B. (2022). *Soğmatar'da Kaya Mezarlar Işığında Ölüm Olgusu*, Arkeoloji ve Sanat Yayınları Şanlıurfa Yazıları 1 (pp.41-62), Arkeoloji ve Sanat Yayınları, İstanbul.

Bean, G. E. (1997). *Eski Çağda Ege Bölgesi*, (Çev. İ. Delemen), Arion Yayınevi, İstanbul.

Boast, A.P.- Weyrich, L. S.- Wood, J. R.- Metcalf, J. L.- Knight, R.ve Cooper, A. (2018). "Coprolites reveal ecological interactions lost with the extinction of New Zealand birds", *Proc Natl Acad Sci USA*. Feb 13;115 (7): 1546-155.

Bos, K. I. - Schuenemann, V. J.- Golding, G. B. - Burbano, H. A.- Waglechner, N.- Coombes, B. K. ve Krause, J. (2011). *A draft genome of Yersinia pestis from victims of the Black Death*. Nature, 478 (7370): 506–510.

Bos, K. I. - Harkins, K. M.- Herbig, A.- Coscolla, M.- Weber, N. ve Comas, I. (2014). Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of new world human tuberculosis. *Nature*, 514: 494–497.

Brosch, R.- Gordon, S. V.- Marmiesse, M.- Brodin, P.- Buchrieser, C.- Eiglmeier, K.- Garnier, T.- Gutierrez, C.- Hewinson, G.- Kremer, K.- Parsons, L. M.- Pym, A. S.- Samper, S.- van Soolingen, D. Ve Cole, S. T. (2002). "A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex", *Proc Natl Acad Sci* U S A. Mar 19; 99 (6): 3684-3689.

Burrell, A.S. - Disotell, T. R. ve Bergey, C. M. (2015). "The use of museum specimens with high-throughput DNA sequencers", *J Hum Evol*, 79: 35–44.

Cano, R. J. - Rivera-Perez, J, - Toranzos, G. A. - Santiago-Rodriguez, T. M. - Narganes-Storde, Y. M. - Chanlatte-Baik, L. - García-Roldán, E. - Bunkley-Williams, L. ve Massey, S. E. (2014). "Paleomicrobiology: revealing fecal Microbiomes of ancient Indigenous cultures", *Plos One*, 14;9:e106833.

Cano, R.J. - Tiefenbrunner, F. - Ubaldi, M. - Del Cueto, C. - Luciani, S. - Cox, T. - Orkand, P. - Künzel, K. H. ve Rollo, F. (2000) Sequence analysis of bacterial DNA in the colon and stomach of the Tyrolean Iceman. *Am J Phys Anthropol*, 112 (3): 297–309.

Christner, B.C. - Mosley-Thompson, E. - Thompson, L. G. ve Reeve, J. N. (2001). Isolation of bacteria and 16S rDNAs from lake Vostok accretion ice. *Environmental Microbiology*, 3 (9): 570–577.

Comas I.- Coscolla, M.- Luo, T.- Borrell, S.- Holt, K.E.- Kato-Maeda, M.- Parkhill, J.- Malla, B.- Berg, S.- Thwaites, G.- Yeboah-Manu, D.- Bothamley, G.- Mei, J.- Wei, L.- Bentley, S.- Harris, S. R.- Niemann, S.- Diel, R.- Aseffa, A.- Gao, Q.- Young, D. ve Gagneux, S. (2013). "Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans", *Nat Genet*, Oct; 45 (10): 1176-1182.

Cooper, A. ve Poinar, H. N. (2000). "Ancient DNA: do it right or not at all", *Science, 289* (5482), 1139.

Çelik, I., ve Keskin, E. (2022). "Revealing the microbiome of four different thermal springs in Turkey with environmental DNA Metabarcoding", *Biology*, 11 (7): 998.

Devault, A. M. - Golding, G. B. - Waglechner, N. - Enk, J. M. - Kuch, M. - Tien, J. H. ve Poinar, H. N. (2014). "Second-pandemic strain of Yersinia pestis in skeletal remains from 14th-century London", *The New England Journal of Medicine*, 370 (26): 2521–2530.

Donoghue, H. D. - Marcsik, A. - Matheson, C. - Vernon, K. - Nuorala, E. - Molto, J. E. - Greenblatt, C. L. ve Spigelman, M. (2005). "Co-Infection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae* in human archaeological samples: a possible explanation for the historical decline of leprosy", *Proc Biol Sci*, 272 (1561): 389–394.

Donoghue, H.D. - Spigelman, M. - Zias, J. - Gernaey-Child, A.M. ve Minnikin, D. E. (1998). "Mycobacterium tuberculosis complex DNA in calcified pleura from remains 1400 years old", *Lett Appl Microbiol*, 27 (5): 265–269.

Drancourt, M. ve Raoult, D. (2005). "Paleomicrobiology: current issues and perspectives", Nature Reviews Microbiology, 3 (1): 23–35.

Drancourt, M, - Aboudharam, G. - Signoli, M. - Dutour, O. ve Raoult, D. (1998) "Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: an approach to the diagnosis of ancient septicemia", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95 (21): 12637–12640.

Duval, R. (1975). *Histoire D'édesse, Politique, Religieuse et Littéraire*. Amsterdam.

Farrer, A. G. - Wright, S. L. - Skelly, E. - Eisenhofer, R. - Dobney, K. ve Weyrich, L. S. (2021). "Effectiveness of decontamination protocols when analyzing ancient DNA preserved in dental calculus", *Scientific reports*, 11 (1): 7456.

Fierer, N. - Bradford, M. A. ve Jackson, R. B. (2007). "Toward an ecological classification of soil bacteria", *Ecology*, *88* (6): 1354-1364.

Fuente C. D. L. - Flores, S. ve Moraga, M. (2013). "Dna from human ancient bacteria: a novel source of genetic evidence from archaeological dental calculus", *Archaeometry*, 55 (4): 767–778.

Gamble, C. (2014). *Arkeolojinin Temelleri*, Aktüel Arkeoloji Yayınları, İstanbul.

González, J. M. ve Saiz-Jimenez, C. (2005). "Application of molecular microbial techniques to the study of microbial communities in monuments", *International Microbiology*, 8 (3): 189–194.

Gorgé, O. - Bennett, E. A. - Massilani, D. - Daligault, J.- Pruvost, M. - Geigl, E. M. ve Grange, T. (2016). "Analysis of Ancient DNA in Microbial Ecology", *Methods Mol Biol*, 1399: 289-315.

Green, R. E. - Krause, J. - Briggs, A.W.- Maricic, T.- Stenzel, U.- Kircher, M. - Patterson, N. - Li, H. - Zhai, W. - Fritz, M. H. - Hansen, N. F. - Durand, E. Y. - Malaspinas, A. S. -

Jensen, J. D. - Marques-Bonet, T. - Alkan, C. - Prüfer, K. - Meyer, M. - Burbano, H. A. ve Good, J. M. (2010). "A draft sequence of the Neandertal genome", *Science*, 328 (5979): 710-722.

Gutarowska B. - Celikkol-Aydin S. - Bonifay, V. - Otlewska, A. - Aydin, E.- Oldham, A. L.- Brauer, J. I.- Duncan, K. E.- Adamiak, J. - Sunner, J. A. ve Beech, I. B. (2015). *Metabolomic and high-throughput sequencing analysis-modern approach for the assessment of biodeterioration of materials from historic buildings*, Front Microbiol

Herodotos, (1983). *Herodot Tarihi*, (Çev. M. Ökmen ve A. Erhat), Remzi Kitabevi, İstanbul.

Higuchi, R.- Bowman, B.- Freiberger, M.- Ryder, O. A. and Wilson, A. C. (1984). "DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family", *Nature*, 312 (5991): 282-284.

Jackson, P. J. ve Hugh-Jones, M. E. ve Adair, D. M. ve Green, G. ve Hill, K. K. - Kuske, C. R. - Grinberg, L. M. - Abramova, F. A. ve Keim, P. (1998). "PCR analysis of tissue samples from the 1979 Sverdlovsk anthrax victims: the presence of multiple Bacillus anthracis strains in different victims", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (3): 1224-1229.

Kaya, İ. ve Albayrak, Y. (2024). "Çeşitli Müzelerden Myrina Koroplastik Eserler", Arkeoloji ve Sanat 175: 95-106.

Keskin, O. ve Albayrak, Y. (2023). "Paleomikrobiyoloji: Arkeolojiden Mikrobiyolojiye", *Karadeniz Uluslararası Bilimsel Dergi*, 60, 111–126.

Liu, Y.- Weyrich, L.S. and Llamas, B. (2020). "More arrows in the ancient DNA quiver: use of paleoepigenomes and paleomicrobiomes to investigate animal adaptation to environment", *Molecular Biology and Evolution* 37: 307–319.

Lugli, G. A. - Milani, C. - Mancabelli, L. - Turroni, F. - Ferrario, C. - Duranti, S. ve Ventura, M. (2017). "Ancient bacteria of the Ötzi's microbiome: a genomic tale from the Copper Age", *Microbiome, 5*: 1-18.

Mann, A. E. - Wang, P. Ve Ziesemer, K. A. (2018). "The oral microbiome in ancient human remains", *Journal of Archaeological Science*, 98: 82–94.

Metcalf, J. L. - Song, S. J.- Morton, J. T. - Weiss, S.- Seguin-Orlando, A.- Joly, F.- Feh, C.- Tab erlet, P.- Coissac Amir, A. E.- Willerslev, E.- Knight, R.- McKenzie, V. ve Orlando L. (2017). Evaluating the impact of domestication and captivity on the horse gut microbiome", *Scientific Reports* Nov 14; 7 (1): 15497.

Mullis, K. B. ve Faloona, F. A. (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction", *Meth Enzymol*, 155: 335–350.

Orthmann, W. ve Rova, E. (1991). *Graber des III Jahrtausends v. Chr. Im Syrischen Euphrattal 2*, Ausgrabungen in Wreide, Bonn.

Ottoni, C.- Guellil, M.- Ozga, A. T.- Stone, A. C.- Kersten, O.- Bramanti, B.- Porcier, S. ve van Neer, W. (2019). "Metagenomic analysis of dental calculus in ancient Egyptian baboons", *Sci Rep*. Dec 23; 9 (1): 19637.

Ottoni, C. - Borić, D. - Cheronet, O. - Sparacello, V. - Dori, I. - Coppa, A. ve Cristiani, E. (2021). "Tracking the transition to agriculture in Southern Europe through ancient DNA analysis of dental calculus", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118* (32), e2102116118.

Ozga, A. T. - Schuenemann, V. J. - Peltzer, A. - Lalueza-Fox, C. - Herrero-Corral, A. M. ve Speller, C. F. (2016). "Successful enrichment and recovery of whole mitochondrial genomes from ancient human dental calculus", *American Journal of Physical Anthropology*, *160* (2): 204–214.

Ozga, A.T.- Gilby, I.- Nockerts, R. S.- Wilson, M. L.- Puseyi, A. ve Stone, A. C. (2019). "Oral microbiome diversity in chimpanzees from Gombe National Park", *Scientific Reports* 9: 17354.

Özbilen, S. (2020). "Arkeoloji; Geçmiş, Zaman ve Kuram", *Uluslararası Eskiçağ Tarihi Araştırmaları Dergisi*, 2/1: 41 - 65.

Pääbo, S. (1985). "Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA", *Nature*, 314 (6012): 644–645.

Pääbo, S. - Poinar, H. - Serre, D. - Jaenicke-Despres, V. - Hebler, J. - Rohland, N. - Kuch, M. - Krause, J. - Vigilant, L. ve Hofreiter, M. (2004). "Genetic analyses from ancient DNA", *Annu Rev Genet*, 38: 645-679.

Philips, A. - Stolarek, I. - Handschuh, L. - Nowis, K. - Juras, A. - Trzciński, D. ve Figlerowicz, M. (2020). "Analysis of oral microbiome from fossil human remains revealed the significant differences in virulence factors of modern and ancient Tannerella forsythia", *BMC genomics*, 21: 1-14.

Piñar, G. - Sterflinger, K. ve Ettenauer, J. (2015). *Molecular techniques in the conservation of cultural heritage: microbial communities and their role in the deterioration of materials*. In "Microbial Biotechnology" (pp. 149–178). Springer.

Pognon, H. (1907). *Inscriptions sémitiques de la Syrie, de la Mésopotamie et de la région de Mossoul*, Paris.

Pottier, E. - Reinach, S. ve Veyries, A. (1887). *La Nécropole de Myrina*, École Française d'Athènes, Paris.

Preus, H.R. - Marvik, O. J. - Selvig, K. A. ve Bennike, P. (2011). "Ancient bacterial DNA (aDNA) in dental calculus from archaeological human remains", *Journal of Archaeological Science*, 38 (8): 1827–1831.

Priscu, J. C. - Adams, E. E. - Lyons ,W. B. - Voytek, M. A. - Mogk, D. W.- Brown, R. L.- McKay, C.P. - Takacs, C. D. - Welch, K. A. - Wolf, C. F. - Kirshtein, J. D. ve Avci, R. (1999). "Geomicrobiology of subglacial ice above Lake Vostok, Antarctica", *Science*, 286 (5447): 2141-2144.

Rafi, A. - Spigelman, M. - Stanford, J. - Lemma, E. - Donoghue, H. ve Zias, J. (1994). "Mycobacterium leprae DNA from ancient bone detected by PCR", *Lancet*, 343 (8909): 1360–1361.

Renfew, C. ve Bahn, P. (2017). *Arkeoloji: Kuramlar, Yöntemler ve Uygulama*, Homer Kitapevi, İstanbul.

Rinke, C. - Schwientek, P. - Sczyrba, A. - Ivanova, N. N. - Anderson, I. J. - Cheng, J. F.ve Woyke, T. (2013). "Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter", *Nature, 499* (7459): 431–437.

Saiz-Jimenez, C. (1999). "Biodeterioration vs. biodegradation: the role of microorganisms in the removal of pollutants deposited on historic buildings", *International Biodeterioration & Biodegradation*, 43 (3): 205–210.

Salo, W. L. - Aufderheide, A. C. - Buikstra, J. ve Holcomb, T.A. (1994). "Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy", *Proc Natl Acad Sci USA*, 91 (6): 2091-2094.

Sayce, A. H. (1882). "Explorations in Aeolis", *The Journal of Hellenistic Studiens 3*: 218-227.

Segal, J. B. (1953). "Pagan Syriac Monuments in the Vilayet of Urfa", *Anatolian Studies*, Vol. 3: 97-119.

Sevin, V. (1999). *Arkeolojik Kazı Sistemi El Kitabı*, Arkeoloji ve Sanat Yayınları, İstanbul.

Slatkin, M. ve Racimo, F. (2016). "Ancient DNA and human history", *Proc Natl Acad Sci USA*, 113 (23): 6380-6387.

Smith, W. (1860). *A New Classical Dictionary of Greek and Roman*, Harper & Brothers Publishers, New York.

Spigelman, M. ve Lemma, E. (1993). "The use of the polymerase chain reaction (PCR) to detect Mycobacterium tuberculosis in ancient skeletons", *International Journal of Osteoarchaeology*, 3 (2): 137–143.

Spyrou, M. A.- Keller, M.- Tukhbatova, R. I.- Scheib, C. L.- Nelson, E. ve Andrades Valtueña, A. (2019). "Phylogeography of the second plague pandemic revealed through analysis of historical Yersinia pestis genomes", *Nat Commun*, 10: 4470.

Strabon, (2000). *Geographika: Antik Anadolu Cografyası*. (Çev. A. Pekman), Arkeoloji ve Sanat Yayınları, İstanbul.

Tito, R.Y. - Macmil, S. - Wiley, G. - Najar, F. - Cleeland, L. - Qu, C. - Wang, P. - Romagne, F. - Leonard, S. - Ruiz, A. J. - Reinhard, K. - Roe, B. A. ve Lewis, C. M. Jr. (2008). "Phylotyping and functional analysis of two ancient human microbiomes", *PLoS One*, 3(11): e3703.

Ubaldi, M. - Luciani, S. - Marota, I. - Fornaciari, G. - Cano, R. J. ve Rollo, F. (1998). "Sequence analysis of bacterial DNA in the colon of an Andean mummy", *Am J Phys Anthropol*, 107 (3): 285-295.

Umar, B. (1993). *Türkiye'deki Tarihsel Adlar*, İnkılâp Kitabevi, İstanbul

Vardar, S. ve Yavaşlı. D. D. (2016). "Myrina Antik Kenti (Aliağa-İzmir) Çevresinde Paleocoğrafya Araştırmaları", *Celal Bayar Üniversitesi Sosyal Bilimler Dergisi*, 14 (3): 163-182.

Wagner, D. M.- Klunk, J.- Harbeck, M.- Devault, A.- Waglechner, N.- Sahl, J. W.- Enk, J.- Birdsell, D. N.- Kuch, M.- Lumibao, C.- Poinar, D.- Pearson, T.- Fourment, M.- Golding, B.- Riehm, J. M.- Earn, D. J.- Dewitte, S.- Rouillard, J. M.- Grupe, G.ve Wiechmann, I. (2014). "Yersinia pestis and the plague of Justinian 541-543 AD: a genomic analysis", *Lancet Infect Dis*, 14 (4): 319-326.

Warinner, C. - Rodrigues, J. F. - Vyas, R. - Trachsel, C. - Shved, N. - Grossmann, J. ve Krause, J. (2014). "Pathogens and host immunity in the ancient human oral cavity", *Nature Genetics*, *46* (4): 336–344.

Warinner, C. - Speller, C. ve Collins, M. J. (2015). "A new era in palaeomicrobiology: prospects for ancient dental calculus as a long-term record of the human oral microbiome", Philosophical Transactions of the Royal Society B: *Biological Sciences*, 370 (1660), 20130376.

Welker, F.- Duijm, E.- Gaag, K. J.- van der Geel, B.- van Knijff, P. De.- Leeuwen, J.- van Mol, D.- Plicht, J.- van der Raes, N.- Reumer, J. ve Gravendeel, B. (2014). "Analysis of coprolites from the extinct mountain goat Myotragus balearicus", *Quaternary Research* 81 (1): 106–116.

Ziesemer, K. A. - Mann, A. E. - Sankaranarayanan, K. - Schroeder, H. - Ozga, A. T. - Brandt, B. W. ve Warinner, C. (2015). “Intrinsic challenges in ancient microbiome reconstruction using 16S rRNA gene amplification”, *Scientific reports*, *5* (1): 16498.

Zink, A.R. - Molnár, E. - Motamedi, N. - Pálfy, G. - Marcsik, A. ve Nerlich, A. G. (2007). “Molecular history of tuberculosis from ancient mummies and skeletons”, *International Journal of Osteoarchaeology*, 17 (4): 380–391.