

**KÜTAHYA (TURANOCAĞI ve ORTAOCAK)
MANYEZİT OCAKLARINDAN CEVHER
ZENGİNLEŞTİRME POTANSİYELİ BULUNAN
BAKTERİLERİN ve KÜFLERİN İZOLASYONU
ve MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Selin HÜNDÜR

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE**

2015

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KÜTAHYA (TURANOCAĞI VE ORTAOCAK) MANYEZİT
OCAKLARINDAN CEVHER ZENGİNLEŞTİRME POTANSİYELİ
BULUNAN BAKTERİLERİN VE KÜFLERİN İZOLASYONU VE
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Selin HÜNDÜR

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Genel Biyoloji Bilim Dalı**

**ERZURUM
2015**

Her hakkı saklıdır



TEZ ONAY FORMU




**KÜTAHYA (TURANOCAĞI VE ORTAOCAK) MANYEZİT OCAKLARINDAN
CEVHER ZENGİNLEŞTİRME POTANSİYELİ BULUNAN BAKTERİLERİN
VE KÜFLERİN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Prof.Dr. Medine GÜLLÜCE danışmanlığında, Selin HÜNDÜR tarafından hazırlanan bu çalışma, 01/06/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Genel Biyoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği /oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof.Dr. Medine GÜLLÜCE

Üye : Doç.Dr. Hatice ÖĞÜTCÜ

Üye : Doç.Dr. Özlem BARIŞ

İmza : 
İmza : 
İmza : 

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 11.06/2015 tarih ve 23/785 nolu kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projesi kapsamında desteklenmiştir.
Proje No:2014/185

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KÜTAHYA (TURANOCAĞI VE ORTAOCAK) MANYEZİT OCAKLARINDAN CEVHER ZENGİNLEŞTİRME POTANSİYELİ BULUNAN BAKTERİLERİN VE KÜFLERİN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Selin HÜNDÜR

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Bilim Dalı

Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

Bu çalışmada; Kütahya- Eskişehir bölgesinde yer alan iki farklı manyezit madeni ocağından örnekler alınarak, cevher zenginleştirme potansiyeli olan mikroorganizmaların izolasyonu gerçekleştirildi.

Elde edilen izolatların tanı ve karakterizasyonu konvensiyonel (morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler) ve 16S rDNA PCR ve ITS PCR moleküler yöntemlerine göre yapıldı. Sekans analizleri sonucunda, bakteri izolatlarından izole edilen bakterilerden 3'ünün *Bacillus* sp, 2'sinin *Arthrobacter* sp, 3'ünün *Bacillus atrophaeus*, 1'inin *Bacillus drentensis*, 2'sinin *Paenibacillus* sp. 1'inin *Bacillus thuringiensis*, 1'inin *Microbacterium schleiferi*, 1'inin *Bacillus circulans*, 1'inin *Streptomyces* sp. 1'inin *Terribacillus aidingensis*, 3'ünün *Bacillus simplex*, 1'inin *Bacillus endophyticus*, 1'inin *Bacillus idriensis* olduğu; fungal izolatların ise 3'ünün *Aspergillus alliaceus*, 1'inin *Penicillium chrysogenum*, 4'ünün *Penicillium* sp. 2'sinin *Fusarium tricinctum*, 2'sinin *Aspergillus flavus*, 1'inin *Aspergillus leporis* ve 1'inin *Aspergillus nomius* olduğu belirlendi.

2015, 129 sayfa

Anahtar Kelimeler: Manyezit, Bakteri, Küf, İzolasyon, 16S rDNA PCR, ITS PCR

ABSTRACT

Master Thesis

ISOLATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE BACTERIA AND FUNGI WHICH HAVE POTENTIAL OF ORE ENRICHMENT IN MAGNESITE QUARRIES IN KÜTAHYA (TURANOCAĞI AND ORTAOCAK)

Selin HÜNDÜR

Ataturk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Science of General Biology

Supervisor: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

In the present study, the magnesite samples were collected from two magnesite mines placed in Kütahya-Eskişehir region and the isolation studies of the microorganisms with magnesite enrichment potential from the ore samples were done.

The identification and characterization studies of the isolates were done by using conventional (morphological, physiological and biochemical) and molecular (16S rDNA PCR and ITS PCR analysis) techniques. According to the results, 3 isolate were assigned to *Bacillus* sp, 2 isolates to *Arthrobacter* sp., 3 isolates to *Bacillus atrophaeus*, 1 isolate to *Bacillus drentensis*, 2 isolate to *Paenibacillus* sp., 1 isolate to *Bacillus thuringiensis*, 1 isolate to *Microbacterium schleiferi*, 1 isolates to *Bacillus circulans*, 1 isolate to *Streptomyces* sp., 1 isolates to *Terribacillus aidingensis*, 3 isolates to *Bacillus simplex*, 1 isolate to *Bacillus endophyticus* and 1 isolates to *Bacillus idriensis*; According to results of fungi isolation, 3 isolates to *Aspergillus alliaceus*, 1 isolate to *Penicillium chrysogenum*, 4 isolate to *Penicillium* sp., 2 isolate to *Fusarium tricinctum*, 2 isolate to *Aspergillus flavus*, 1 isolates to *Aspergillus leporis* and 1 isolate to *Aspergillus nomius*.

2015, 129 pages

Keywords: Magnesite, Bacteria, Mold, Isolation, 16S rDNA, ITS PCR

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı (2014/185) tarafından desteklenmiş olup; Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji laboratuvarlarında yürütülmüştür.

Tez çalışmamın her aşamasında engin bilgi ve deneyimleriyle bana öncülük eden, çalışmalarımı büyük bir titizlikle yürüten, her zaman manevi desteğini ve yardımını gördüğüm tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE'ye tezin oluşum sürecinde ve bulguların değerlendirilmesinde emeği geçen hocam Sayın Doç. Dr. Özlem BARIŞ'a, çalışmalarımın çoğu aşamasında; tezin hazırlanma, değerlendirilme sürecinde büyük emeği geçen hocam Sayın Arş. Gör. Mehmet KARADAYI'ya ve KÜMAŞ Genel Müdürü Sayın Hüseyin GÜRCAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın farklı aşamalarında ve tezin hazırlanma sürecinde fikirlerinden istifade ettiğim Sayın Uzm. Biy. Ceyda BOZOĞLU'na, Sayın Uzm. Biy. Selma SEZEN'e manevi desteklerinden dolayı Sayın Taha Yasin KOÇ'a, Sayın Uzm. Biy. Burak ALAYLAR'a, Hatice GÜLMEZ'e ve tüm Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji Laboratuvarı çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım boyunca benim bütün zorluklarıma katlanan, eğitimimin her aşamasında maddi, manevi desteklerini esirgemeyen ve bana olan güvenlerinden dolayı anneme, babama, kardeşlerime, ev arkadaşlarıma ve Fatih DOĞAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Selin HÜNDÜR

Mayıs, 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	8
2.1. Magnezyum.....	8
2.2. Önemli Magnezyum Mineralleri ve Doğada Bulunuş Şekilleri.....	8
2.3. Manyezit.....	11
2.4. Manyezitin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	12
2.4.1. Kriptokristalin (jel amorf) manyezit.....	12
2.4.2. Kristalen (iri kristalli) manyezit.....	12
2.5. Manyezitin Oluşumu.....	14
2.5.1. Hidrotermal kristalin manyezit yatakları.....	15
2.5.2. Hidrotermal masif manyezit yatakları.....	17
2.5.3. Yüzey suları ile oluşan masiv manyezit yatakları.....	18
2.5.4. Sedimenter masiv manyezit yatakları.....	20
2.6. Magnezyum Ürünlerinin ve Manyezitin Kullanım Alanları.....	23
2.7. Doğada Bulunan Magnezyum Oksit (Magnezya) Çeşitleri:.....	23
2.8. Manyezitin kullanım alanları.....	25
2.9. Dünya Manyezit Yatakları.....	26
2.10. Türkiye Manyezit Yatakları.....	29
2.11. Manyezit Üretim Teknolojisi ve Üretim Miktarı.....	31
2.12. Kümaş Tesisinde Üretim.....	34
2.13. Manyezitin Fiyatlandırılmasını Etkileyen Faktörler.....	38
2.13.1. Kimyasal bileşim.....	38
2.13.2. CaO/SiO ₂ Faktörü.....	39

2.13.3. Dökme özgül ağırlık.....	39
2.13.4. Kristalin boyutu.....	40
2.13.5. Magnezyum oksit (MgO) oranı.....	40
2.13.6. Bor oranı.....	40
2.14. Geleceğe Dönük Alternatif Bir Yaklaşım Olarak Biyoteknolojik Zenginleştirme Yöntemi ve Doğal Biyolojik Süreçler	40
2.15. Biyoliç	42
2.16. Biyomineralizasyon.....	43
2.17. Maden Zenginleştirmede Kullanılabilecek Mikroorganizmaların Tanılanması ve Moleküler Karakterizasyonuna Yönelik Yaklaşımlar	44
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	46
3.1. Manyezit Madeni Örneklerinin Alınması.....	46
3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar.....	46
3.1.2. Kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı.....	47
3.2. Yöntem	51
3.2.1. Manyezit madeni mikroflorasından bakterilerin izolasyonu ve muhafazası....	51
3.2.2. Bakteri İzolatlarının CaCO ₃ üzerine çözücü özelliklerinin araştırılması	52
3.2.3. Bakteri İzolatlarının MgCO ₃ üzerine çözücü özelliklerinin araştırılması	52
3.2.4. Bakteri İzolatların bazı morfolojik özelliklerinin belirlenmesi.....	52
3.2.4.a. Hücre morfolojisi.....	52
3.2.4.b. Hücre boyutlarının belirlenmesi.....	52
3.2.4.c. Gram reaksiyon testi.....	53
3.2.4.d. Endospor varlığının ve hücre içindeki yerinin belirlenmesi	54
3.2.4.e. Hareketlilik testi	54
3.2.4.f. Kültür özelliklerinin belirlenmesi	54
3.2.5. Bakteri İzolatların bazı fizyolojik özelliklerinin belirlenmesi	55
3.2.5.a. Bakteri İzolatların tuz toleranslarının belirlenmesi	55
3.2.5.b. Bakteri İzolatların gelişme sıcaklıklarının belirlenmesi.....	55
3.2.5.c. Bakteri İzolatlarının gelişebildikleri pH aralıklarının belirlenmesi.....	55
3.2.6. Bakteri İzolatların bazı biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi.	56
3.2.6.a. Katalaz testi	56
3.2.6.b. Amilaz testi.....	56

3.2.7. Bakteri İzolatların bazı hidrolitik özelliklerinin belirlenmesi	57
3.2.7.a. Jelatin hidrolizi	57
3.2.8. Moleküler Testler	57
3.2.8.a. Tanılanacak bakterilerin standart besiyerinde (TSA) geliştirilmesi	57
3.2.8.b. Bakteri İzolatlarının bazı genetiksel özelliklerinin belirlenmesi.....	57
3.2.9. Manyezit madeni mikroflorasından küf izolasyonu ve muhafazası	61
3.2.9.a Stok kültürlerin alınması	62
3.2.9.b Küf hücresinden genomik DNA'ların izolasyonu.....	62
3.2.9.c Küf Genomik DNA'sı için jel elektroforezi ve görüntüleme	64
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	66
4.1. Bakteri İzolasyonu Sonuçları	66
4.2. İzole Edilen Bakterilerin CaCO ₃ Üzerine Çözücü Özelliklerinin Sonuçları.....	66
4.3. Bakteri İzolatlarının MgCO ₃ Üzerine Çözücü Özelliklerinin Sonuçları.....	69
4.4. Bakteri İzolatlarının Fizyolojik Test Sonuçları	70
4.5. Bakteri İzolatlarının Morfolojik Test Sonuçları.....	72
4.6. Bakteri İzolatlarının Kültür Özelliklerinin Belirlenmesi.....	73
4.7. Bakteri İzolatlarının Biyokimyasal Test Sonuçları	74
4.8. Bakteri İzolatların Hidroliz Test Sonuçları	75
4.9. 16S rRNA PCR Amplifikasyon Sonuçları	76
4.10. Bakteri İzolatların 16S rRNA Gen Bölgelerinin Baz Dizileri.....	77
4.11. Küf İzolatlarının CaCO ₃ Üzerine Çözücü Özelliklerinin Sonuçları	78
4.12. Küf İzolatlarının MgCO ₃ Üzerine Çözücü Özelliklerinin Sonuçları	80
4.13. ITS PCR Amplifikasyon Sonuçları	82
4.14. Küf İzolatlarının Mikroskopik incelemeleri	82
4.15. Fungal İzolatların 18S rDNA Gen Bölgelerinin Baz Dizileri	84
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	85
KAYNAKLAR	90
EKLER	96
EK 1.....	96
EK 2.....	97
EK 3.....	98
EK 4.....	99

EK 5.....	100
EK 6.....	101
EK 7.....	102
EK 8.	103
EK 9.....	104
EK 10.....	105
EK 11.....	106
EK 12.....	107
EK 13.....	108
EK 14.....	109
EK 15.....	110
EK 16.....	111
EK 17.....	112
EK 18.....	113
EK 19.....	114
EK 20.....	115
EK 21.....	116
EK 22.....	117
EK 23.....	118
EK 24.....	119
EK 25.....	120
EK 26.....	121
EK 27.....	122
EK 28.....	123
EK 29.....	124
EK 30.....	125
EK 31.....	126
EK 32.....	127
EK 33.....	128
EK 34.....	129
ÖZGEÇMİŞ	130

SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre (10 ⁻⁶)
µM	Mikromolar
bp (bç)	Base pair (Baz çifti)
BSA	Bovine Serum Albumin
CTAB	Hekzadesil trimetil-amonyum bromit
dk	Dakika
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNA	Deoksiribonükleotik asit
dNTP	Deoksinükleotittrifosfat
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ERIC-PCR	Enterobacterial repetitive intragenic consensus
g	Gram
H ₂ O ₂	Hidrojen per oksit
KI	Potasyum iyodit
KOH	Potasyum hidroksit
L	Litre
M	Molar
MIS	Mikrobiyal tanılama sistemi
ml	Mililitre (10 ⁻³)
N	Normal
NA	Nutrient Agar
NaCl	Sodyum klorit tuzu
NAS	Nutrient Agar + sükröz
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PVC	Polivinil klorür

RAPD	Randomly amplified polymorphic DNA
Rep-PCR	Repetitive extragenic palindromic
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
s	Saniye
sdH ₂ O	Steril distile su
SDS	Sodyum Dedosil Sülfat
sH ₂ O	Steril su
TAE	Tris Asetat EDTA tamponu
TE	Tris-EDTA tamponu
Tris-HCl	Trihidroksimetil amino metan-hidroklorik asit
tRNA	Transfer RNA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Karagati manyezit yatağının enine jeolojik kesiti	17
Şekil 2.2. Yüzey suları ile oluşan masiv manyezit yatakları	19
Şekil 2.3. Hidrotermal alterasyon modeli (21°N Doğu Pasifik'te meydana gelen).....	20
Şekil 2.4. Sedimenter oluşumları	22
Şekil 2.5. Dünya manyezit rezervlerinin dağılımı	27
Şekil 2.6. Dünya doğal manyezit rezervleri	29
Şekil 2.7. Türkiye'deki manyezit rezervlerinin bölgelere göre dağılımı	30
Şekil 2.8. Bakterilerin katı yüzeylere yapışma basamakları	41
Şekil 4.1. YDC-agar besiyerinde zon oluşturan 12 izolatın fotoğrafları	67
Şekil 4.2. MgCO ₃ agar besiyerinde zon oluşturan 8 izolatın fotoğrafları.....	69
Şekil 4.3. Bakteri izolatlarının 16S rRNA PCR elektroforez sonuçları.....	76
Şekil 4.4. YDC-agar besiyerinde zon oluşturan küf izolatının fotoğrafları.....	78
Şekil 4.5. MgCO ₃ -agar besiyerinde zon oluşturan küf izolatının fotoğrafları	80
Şekil 4.6. Küf izolatlarının YDC-agar besiyerinde CaCO ₃ çözünürlüğünü gösteren fotoğraf.....	81
Şekil 4.7. Küf izolatlarının ITS PCR elektroforez sonuçları	82
Şekil 4.8. Bazı küf izolatlarının mikroskop görüntüleri	83

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Doğada en çok bulunan Başlıca magnezyum mineralleri ve kimyasal formülleri	9
Çizelge 2.2. Refrakter tüketiminin sektörel dağılımı.....	26
Çizelge 2.3. Dünya Doğal Manyezit Rezervleri ve Üretimi (x1000 ton)	28
Çizelge 2.4. Türkiye'deki manyezit rezervleri	31
Çizelge 2.5. Türkiye'de manyezit üreten firmalar ve kapasiteleri.....	34
Çizelge 2.6. Türkiye Sinter Mag. İhracatı (Devlet İstatistik Enstitüsü İthalat İhracat Raporları 1998)	36
Çizelge 4.1. İzolatların fizyolojik test sonuçları	71
Çizelge 4.2. İzolatların morfolojik test sonuçları.....	72
Çizelge 4.3. İzolatların kültür özellikleri	73
Çizelge 4.4. İzolatların biyokimyasal test sonuçları	74
Çizelge 4.5. İzolatların hidroliz test sonuçları	75
Çizelge 4.6. Bakteri izolatlarının gen bank numaraları ve nükleotit sayıları.....	77
Çizelge 4.7. Fungal izolatların gen bank numaraları ve nükleotit sayıları	84

1. GİRİŞ

Elementlerin bir takım fiziko-kimyasal şartlar altında bir araya gelmesiyle mineraller; minerallerin de yer kabuğunda oluşturdukları birikimlerle maden yatakları oluşur. Maden yataklarının da çeşitli amaçlar doğrultusunda işletilmesi ile maden ocakları ve işletmeler oluşmuştur. Teknolojik çalışmalarla insanların kullanımına sunulan, ekonomik açıdan değer taşıyan mineral grupları ve kayalıklara maden adı verilir. Büyük ölçüde yerin jeolojik yapısına ve oluşum şekillerine bağlı olarak şekillenirler. Madenler oluşum süreci oldukça uzun olan ve tüketildiğinde yenilenemeyen kaynaklardır (TBMM 2010).

Madenlerin doğada bulunuş şekilleri rastgele değildir. Çok karmaşık mekanizmalar içeren doğa olayları sonucu oluşurlar ve yer kabuğunun belli özelliklere sahip bölgelerine yerleşirler. Bir doğa gizemi sayılan madenler fiziksel ve kimyasal özelliklerine, oluşum şekillerine, kullanıldıkları sektörlere göre çok çeşitli biçimlerde sınıflandırılır ve insanlık yararına sunulurlar (TOBB 2007; TBMM 2010).

Madencilik faaliyetleri ilk insanın varoluşuyla başlamış ve günümüze kadar ulaşmıştır. Tarihin her döneminde vazgeçilmez değer içeren madencilik insanoğlunun yeryüzüne yakın kısımlardan ve erişebilecekleri derinliklerden her türlü mineralin çıkarılması ve kullanılmasıyla yaşamımızın her alanına derinlemesine işlemiş ve böylece medeniyetin doğuşu sağlanmıştır (TOBB 2007; TMMOB 2011).

Ülkelerin gelişmişlik düzeyleriyle sahip olduğu maden rezervleri ve bunların işlenmesi arasında doğrudan bir ilişki vardır. Doğal kaynaklarını etkin bir biçimde kullanan gelişmiş ülkeler var olan ekonomik güçlerini büyük anlamda buna borçludurlar (Borand 2012).

Dünyada madenciliğin güçlü olduğu ülkelerin başında Amerika Birleşik Devletleri gelirken bunu sırasıyla Çin, Güney Afrika, Kanada, Avustralya ve Rusya takip

etmektedir. Maden aramacılığına en çok yatırım yapan ülkeler ise Kanada, Avustralya ve ABD'dir. Bu oranlar ülkenin gelişmişliği yanında maden çeşitliliği potansiyeli ile de ilgilidir. Güney Afrika Cumhuriyeti - Altın, platin grubu metaller, manganez, krom, alüminyum; Çin - Demir, kurşun, manganez, molibden, kalay, zirkonyum, çinko ve fosfat; Kanada - Uranyum, çinko, altın, bakır, nikel, kobalt, demir, petrol ve doğal gaz; Avustralya - Kömür, demir, rutil, çinko, kurşun ve uranyum ABD - Kurşun, molibden ve fosfat cevherleri yönünden oldukça zengindir (TOBB 2007; TBMM 2010).

Ülkemiz gerek jeolojik ve tektonik yapısı bakımından gerekse kıtalar arası hareketliliğin, magmatik hareketlerin ve volkanik faaliyetlerin çok yoğun gerçekleştiği bir coğrafyada yer alması ayrıca farklı jeolojik zamanları yaşaması bakımından çok çeşitli maden yataklarını bünyesinde barındırmaktadır. Bu jeolojik durum ülkemizde süreklilik gösteren büyük maden rezervlerinin oluşumunu engellerken, çok çeşitli madenlerin de oluşumuna neden olmuştur. Günümüz dünyasında 90 çeşit madenin üretimi yapılmaktayken bunlardan 60'ının üretimi ülkemizde mevcuttur. Ülkemiz dünyada maden çeşitliliği bakımından 10. sırada yer alırken maden üretim değeri itibariyle de 132 ülkeden 28. sırada yer almaktadır (TBMM 2010; Tuna 2011).

Türkiye'deki yetersiz mineral kaynakları arasında bakır, manganez, grafit, boya toprakları, kurşun, alüminyum, maden kömürü, zirkon, çinko, arsenik, talk, titan, demir, kükürt, mika, nikel, fosfat, kil mineralleri sayılırken; Bor tuzları, barit, jips, lületaşı, mermer, diatomit, perlit, stronsiyum tuzları, sepiyolit, fluorit, kireçtaşı, ponza, sodyum-sülfat, zeolit, profilit, kuvars-kuvarsit, linyit, feldspat, kaya tuzu, olivin, dolomit, silis kumu, altın, bentonit, trona, asbest, kalsit zımpara taşı ve manyezit zengin mineral kaynakları arasında sayılabilmektedir (Özkök 2005; DPT 2007; Tuna 2011).

Ülkemizin önemli ekonomik değere sahip madenlerinden biri olan Manyezit ($MgCO_3$); saf magnezyum ve çeşitli magnezyum bileşenlerinin üretiminde kullanılan en temel kaynak olup yer kabuğunda %1,39 oranla en çok bulunan 8. mineraldir. Dünyada manyezit rezervleri bakımından en büyük yataklara sahip ülkeler arasında Çin 1. Sırada

yer alırken Türkiye 68 milyon ton rezervle 5. sırada bulunur ve Dünya toplam manyezit rezervinin %4,12'sini içerir (TOBB 2007; Sha-Sha *et al.* 2011).

Manyezit bir magnezyum karbonat minerali olup yapısında %47,62 oranında magnezyum oksit (MgO) %52,38 karbondioksit (CO₂) ve çok az miktarda da Fe₂O₃ içerirken bulunduğu bölgenin jeolojik özelliklerine bağlı olarak birtakım kirleticileri de bulundurabilir. Manyezit madeninin rengi beyaz, sarı, gri ve kahverengi arasında değişirken, sertliği 3,4-4,5 özgül ağırlığı 2,9-3,1 arasında olan bir mineraldir. Manyezit MgO hammaddesinde oluşur 1000°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda uzun süre kullanılabilen ateşe dayanıklı olduğundan refrakter sanayisinde önemli bir ham maddedir. Bunun yanında diğer MgO bileşikleri çimento, kozmetik, ilaç, kimya, demir-çelik tekstil, otomatik kauçuk, boya gibi pek çok sanayi alanında da ham madde olarak kullanıma sahiptir (DPT 2007; Tuna 2011).

Manyezit madeninin bünyesinde bulunan magnezyum oksit (MgO), karbondioksit (CO₂), silisyum, alüminyum, demir ve kalsiyum gibi minerallerin manyezitin kullanılacağı alana bağlı olarak birtakım olumlu ve olumsuz etkileri vardır. Örneğin ham manyezitin sinterleşme işlemine tabi tutulmasında demir olumlu etki gösterip sinterleşmeyi kolaylaştırırken refrakter malzeme üretiminde demir yüksek sıcaklığa mukavemeti azalttığından istenmeyen bir durumdur (Friedrich and Mordike 2006). Doğal manyezit madeninin yapısındaki alüminyum oranının çok az olması dolayısıyla bu kirleticinin uzaklaştırılması göz ardı edilebilirken silisyum oranının yüksek olması demir mineralinde olduğu gibi sıcaklık mukavemetini azalttığından refrakter sanayisinde olumsuz etki gösterir. Ülkemiz manyezitlerinde ise kullanımı sınırlayan en önemli safsızlık etkeni kalsiyum oksit (CaO) miktarıdır. Refrakter, sanayide ham madde olarak manyezitin kullanılabilmesi için yapısındaki kalsiyum oksit oranının %1'den az olması gerekir. Bunun yanında manyezit madenin kalitesini etkileyen bir başka parametre de CaO ve SiO₂'in birbirlerine oranlarının verdiği (CaO/SiO₂) değeridir. CaO ve SiO₂'in değişik oranlarda bir araya gelmesiyle değişik bileşikler oluşur ve bu bileşiklerin özelliklerine bağlı olarak da refrakter nitelikleri değişir. CaO/SiO₂ oranının

2130°C gibi yüksek ergime sıcaklığına sahip olmasından dolayı %2 dolaylarında olması istenir (Erşahan *et al.* 1994; Laçın *et al.* 2005).

Maden yatağındaki cevherin üretimi ile başlayan manyezit işleme teknolojisi çoğunlukla açık işletme yöntemleriyle, nadiren de kapalı işletme yöntemleriyle devam eder ve daha sonra çıkarılan cevher, genellikle ek bir zenginleştirme işlemine tabii tutulur. Geçmişten günümüze kadar yapılan cevher zenginleştirme çalışmaları manyezitin bünyesinde bulunan kirleticilerin ağır ortamla zenginleştirme, manyetik ayırma, triyaj (el ile zenginleştirme), elektrostatik ayırma, flotasyon ile zenginleştirme, optik zenginleştirme ve kimyasal madde uygulamalarıyla zenginleştirmeyi de içeren fiziksel ve kimyasal yöntemlerle uzaklaştırılmasına yöneliktir. Bu yöntemlerin uygulanmasında yüksek enerji miktarına ihtiyaç duyulması, düşük değerli cevherin zenginleştirilememesi, maliyetin yüksek ve atık miktarının fazla olmasına rağmen geri kazanılan ürün miktarının az olması nedeniyle alternatif zenginleştirme yöntemlerinin aranmasını zorunlu kılmıştır. Günümüzde bu alandaki araştırma trendleri mevcut geleneksel uygulamalara alternatif olabilecek çoğunlukla mikroorganizmaların kullanıldığı biyoteknolojik yöntemlere odaklandırmıştır (Kocafe 1982; Rulkens *et al.* 1995; Erdoğan ve Yıldız 1995; Sever 2006; Demir ve Dönmez 2008).

1960 yılında demir ve sülfürü oksitleyen bakterilerin tanınması ve özelliklerinin belirlenmesiyle madencilik alanında biyoteknolojik çalışmalar önem kazanmış ve düşük tenörlü cevherlerle, yeterli ölçüde zenginleştirilemeyen atık cevherlerin yeniden kazandırılmasında diğer zenginleştirme yöntemlerine nazaran daha az sermaye gerektirmesi, daha az enerji harcaması, uygulanabilir olması ve basit kimyasal yöntemlerle elde edilemeyecek olan kimyasal reaksiyonlar içermesinden dolayı mikroorganizmaların kullanımı yaygınlaşmıştır (Gilbertson 2000; Seifelnassr and Abouzeid 2000; Akçıl ve Çiftçi 2003).

Bu anlamda madencilik için önemli olan mikroorganizmalar, mineral yüzeylerde çoğunlukla biyofilm oluşturarak koloni olan, çoğu gelişme, enerji üretimi ve çoğalma gibi yaşamsal işlevlerini diğer hücrelerden bağımsız olarak tek başlarına

gerçekleştirebilen mikroskobik canlılar olarak tanımlanabilir (Busscher and Weerkamp 1987; Sulu-Gambari 2011).

Bazı mikroorganizmaların salgıladıkları metabolitler ve ligandlarla kayaçların mineral bileşenlerini çözünür hale getirerek bozunmasını hızlandırdıkları bilinmektedir. Bu mikroorganizmaların doğal yaşamlarını sürdürebilmesi için zorunlu olan bu ve benzeri olaylar mikroorganizmaların maden zenginleştirme gibi biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilme olanağının temelini oluşturur (Lower *et al.* 2000; Lower *et al.* 2001; Lower 2005).

Asidofilik mikroorganizmaların faaliyeti sonucu cevherlerden altın, bakır ve demir gibi mineralleri çözüdürerek sıvıdan geri kazanılmasına biyoliç denir. Biyoliç metodu kendiliğinden gerçekleşen, maden atıkları, çamur, toprak, atık çamurlarda ağır metal taşınımı, sedimental oluşumlardan mineral ayrıştırılması ve endüstriyel atıkların iyileştirilmesinde uzun yıllardır kullanılan düşük maliyetli bir yöntemdir (Chen *et al.* 2001). Biyoliç uygulaması (mikrobiyolojik liç) ile doğada var olan hava, su, mikroorganizma gibi bileşenlerin kullanımıyla basit aşamalarla gerçekleştirilebilen, maliyeti düşük, uygulanabilirliği olan ve enerji tasarrufu sağlayan çevre dostu bir zenginleştirme işlemi gerçekleştirilebilmektedir (Gilbertson 2000). Normal basınç altında ve 5°C ila 90°C sıcaklık aralığında mikroorganizmaların katalizör özelliğinden faydalanarak cevher veya mineral konsantrasyonlarından metallerin çözünmesini gerçekleştirebilir (Brierley 1982; Bosecker 1997; Brierley and Brierley 2001; Brierley 2002).

Biyoliç sürecini gerçekleştiren mikroorganizmalar; genellikle prokaryotik, aerobik ve zorunlu kemolitotrofdurlar. Bu mikroorganizmalar metalik minerallerin parçalanmasında katalizör görevi yaparak mineralin çözünme sürecini hızlandırırlar (Sever 2006; Sertkaya 2007).

Yine yapılan önceki çalışmalar bakterilerin ve fungusların da dâhil olduğu birçok mikroorganizmanın oksalik asit ve süksinik, pirüvik, laktik, sitrik, asetik ve propiyonik asit gibi diğer organik asitleri ve çeşitli ekstraselüler metabolitleri üreterek madenlerin yapısındaki kalsiyum karbonatı biyoliç yoluyla uzaklaştırdığını göstermiştir (Perry *et al.* 2004; Lüttge and Conrad 2004).

Çevrede kolayca bulunabilen hava, su ve mikroorganizmaları kullanarak düşük basınç ve sıcaklıkta doğal olarak kendiliğinden oluşabilen biyoliç yönteminin reaktörlerin modüllerinde veya tek bir reaktörde basit olarak gerçekleşmesi, süreç boyunca hiç zararlı gaz üretmemesi ve çevre dostu bir teknik oluşu, basit kimyasal yöntemlerle elde edilemeyecek olan kimyasal reaksiyonları içermesi, mineral kaynakların çoğunluğunda uygulanabilmesi ve böylece sistemlerinin çok çeşitli olması, diğer sistemlere göre çok az enerjiye gereksinim duyması, işleme tabi tutulacak minerale üretim kaynağında uygulanabilir olması böylece işleme ve koruma kolaylığı sağlaması en önemli avantajlarıdır (Tipre *et al.* 1999).

Son yıllarda yapılan araştırmalar manyezit madeninin de diğer madenler gibi biyoliç yöntemiyle zenginleştirilebileceğine işaret etmektedir (Yanmış 2013).

Manyezit madeninin gerek magnezyum bileşenlerinin temel kaynağı olması gerekse yüksek ergime sıcaklığı ile refrakter malzeme endüstrisinin en önemli girdisi olması bakımından yapısındaki kirleticilerden uzaklaştırılarak, kullanıma uygun hale getirilmesi diğer ülkelerde olduğu kadar ülkemiz için de büyük önem teşkil eder (Carretero and Pozo 2010; Sha-Sha *et al.* 2011; Torun ve Avşaroğlu 2012).

Dünya literatürlerine bakıldığında manyezit zenginleştirmeye yönelik yapılan çalışmaların daha çok fiziksel ve kimyasal yöntemlere dayalı olduğu; yalnızca Mishra ve arkadaşlarının 1986 yılında manyezitten silisyum biyoliçi ve Mohanty- Mishra'nın 1993 de manyezit madeninden izole ettikleri *Bacillus licheniformis*'in taramalı elektron mikroskobu ile çekilen görüntülerinin toplandığı raporla sınırlıdır. Manyezit madeni oluşumu bakımından oldukça zengin olan ülkemiz, benzer şekilde manyezit madeninin

iyileştirilmesine yönelik yapılan çalışmalar bakımından yetersizdir (Chou *et al.* 1989; Liu *et al.* 2003; Sever 2006; Abalı vd 2006; Mesci and Sevim 2006; Demir and Dönmez 2008; Dönmez vd 2009; Bayrak vd 2010; Raschman *et al.* 2010).

Mevcut eksikliğin giderilmesine ve nihayetinde ülke ekonomimize kazanç sağlamak amacıyla tasarlanan çalışmamızda, Türkiye'nin önemli rezervlerinden biri olan Kütahya-Eskişehir bölgesi, KÜMAŞ Manyezit işletmeleri bünyesinde olan Turan ocağı ve Orta ocak manyezit yataklarından alınan manyezit örneklerinden mikroorganizma izolasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bunun ardından cevher zenginleştirmede kullanılacak kalsiyum karbonat ve magnezyum karbonatı çözen aktif izolatların moleküler karakterizasyonu ve tanılması yapılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Magnezyum

Periyodik sistemin ikinci grubu olan toprak alkali elementlerin ikinci sırasında yer alan ve yer kabuğunda %1,39'luk oranla en çok bulunan sekizinci element olan magnezyumun simgesi Mg atom ağırlığı ise 12'dir (Takmak 2007).

Magnezyum elementinin özgül ağırlığı $1,74 \text{ gr/cm}^3$ olup 651°C 'de eriyen 1110°C 'de kaynayan gümüş renkli hafif bir metaldir. Magnezyum metali hava ile temas ettiğinde oksitlenerek üzerinde ince bir film tabakası oluşur. 500°C 'nin üzerinde bir sıcaklığa maruz bırakıldığında ise parlak bir alevle yanarak magnezya'ya (MgO) dönüşür, bu sayede ince plak halini getirilerek, kolayca şekil alabilen tel haline dönüştürülebilir (MTA 1981; Çakır 2007). Magnezyum elementinin oksijene yüksek afinitesinin bulunması ve birlikte oluşturdukları MgO bileşiğinin 2800°C 'ye kadar erimeyip katı yapısını koruyabilmesi, magnezyuma refrakter malzeme endüstrisinde temel element niteliği kazandırmıştır (Önal 2007).

Doğada magnezyum elementine yüksek kimyasal reaksiyon yeteneği ve en çok rastlanan oksijen bileşiği olan silisyum dioksit ile bulunduğu ortamda hızlı bileşik oluşturması nedeniyle saf olarak rastlanamaz. Ayrıca tabiatta bulunan 60'dan fazla magnezyum minerallerinin 2/3'ünün silikatlardan oluştuğu bilinmektedir (Kocaefe 1982).

2.2. Önemli Magnezyum Mineralleri ve Doğada Bulunış Şekilleri

Magnezyum tabiatta bulunış sırasına göre oksijen, alüminyum, demir, kalsiyum, potasyum ve sodyumdan sonra 8.sırada yer alan elementtir. Bununla birlikte magnezyum bileşiklerinin en önemli kaynağı deniz suyu olduğundan yeryüzüne yaygın bir dağılım göstermişleridir (Çakır 2007).

Doğada saf halde bulunmayan magnezyum elementinin asıl bulunuş şekli suda çözünebilir, kaya tuzunun üzerinde tabakalar oluşturan $MgCl_2$ ve $MgSO_4$, bunların potasyum bileşikleriyle oluşturdukları kainit ($KCl.MgSO_4.3H_2O$), şönit ($K_2SO_4.MgSO_4.6H_2O$) ve karnalit ($MgCl_2.KCl.H_2O$) ile suda çözünemeyen dolomit ($MgCaCO_3$) ve manyezit ($MgCO_3$) formlarıdır (Çakır 2007). Doğada en çok bulunan başlıca magnezyum mineralleri ve kimyasal formülleri Çizelge 2.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Doğada en çok bulunan Başlıca magnezyum mineralleri ve kimyasal formülleri

Karbonatlar	Kimyasal formül
Manyezit	$MgCO_3$
Dolomit	$MgCO_3CaCO_3$
Neskhonit	$MgCO_3.3H_2O$
Lonsfordit	$MgCO_3.5H_2O$
Hidromanyezit	$3MgCO_3.Mg(OH)_2.3H_2O$
Ankerit	$(MgFe)Ca(CO_3)_2$
Antinit	$Mg_2(CO_3)_2(OH)_2.12H_2O$
Breunerit	$MgFeCO_3$
Huntit	$CaMg_3(CO_3)_4$

Klorürler	Kimyasal formül
Tahihidrit	$2MgCl_2.CaCl_2.12H_2O$
Bisoffit	$MgCl_2.6H_2O$
Karnalit	$MgCl_2.KCl.6H_2O$
Borasit	$5MgO.MgCl_2.7B_2O_3$

Oksit ve hidroksitler	Kimyasal formül
Periklas	MgO
Brusit	$Mg(OH)_2$
Spinel grubu	$MgAl_2O_4$
Ludvigit	$(Mg,Fe)_2Fe(BO)_3O_2$
Asarit	$MgHBO_3$
Geikielit	$MTiO_3$

Çizelge 2.1. (devam)

Sülfatlar	Kimyasal formül
Epsomit	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$
Kieserit	$MgSO_4 \cdot H_2O$
Kainit	$K_2Mg(SO_4)_2 \cdot 4H_2O$
Polihalit	$K_2SO_4 \cdot MgSO_4 \cdot 2H_2O$
Heksahidrat	$MgSO_4 \cdot 6H_2O$

Silikatlar	Kimyasal formül
Serpantin	$H_4Mg_3Si_4O_{10}(OH)_2$
Olivin	$(MgFe)_2SiO_4$
Humit	$Mg_7(SiO_4)_3(OH)_2$
Pirop	$Mg_3Al_2(SiO_4)_3$
Enstatit	$MgSiO_3$
Tremolit	$CaMg_5(Si_4O_{11})_2(OH)_2$

Sepiyolit	$Mg_2Si_4O_{11}H_2O_nH_2O$
Talk	$Mg_3(Si_3O_{10})(OH)_2$
Aktinolit	Demirli Tremolit
Poligorskit	Su içeren Mg-Al silikatlar
Flogopit	$KMg_3(AlSi_3O_{10})(OH)_2$
Biyotit	$K(MgFe)_3(AlSi_3O_{10})(OH)_2$
Penin	Mg lu klorit
Vermikülit	Mg kili
Diyopsit	$CaMg(Si_2O_6)$
Kerolit	$Mg_4[Si_4O_{10}][OH]_4 \cdot 4H_2O$
Saponit	$Mg_3[Si_4O_{10}][OH]_2 \cdot nH_2O$
Kumferit	$Mg_7[Si_4O_{10}]_2[OH]_2$
Klinoklor	$(MgFe)_{4,75}Al_{1,25}[Al_{1,25}Si_{2,75}O_{10}][OH]_8$

Çizelge 2.1. (devam)

Norberjit	$Mg_3[SiO_4][OH,F]_2$
Kondroit	$Mg_5[SiO_4]_2[OH,F]_2$

Florürler	Kimyasal formül
Sellait	MgF_2
Wagnerit	Mg_2PO_4F

Boratlar	Kimyasal formül
Asarit	$MgHBO_3$
Kotoit	$Mg_3[BO_3]_2$
Floborit	$Mg_3[BO_3][F,OH]_3$
Pinnoit	$Mg[BO_2]23H_2O$
Sulfoborit	$4MgHBO_32MgSO_47H_2O$

2.3. Manyezit

Sanayinin gelişmesiyle ülkelerin ham madde gereksinimleri gittikçe artmıştır. Magnezyum ve bileşiklerinin de günümüz teknolojileri için önemli bir ham madde olduğu bilinmektedir. Ancak bu bileşikler oksijene afinitelerinin yüksek olmasından dolayı tabiatta saf halde bulunamazlar (Erdoğan ve Yıldız 1995).

Manyezit magnezyum bileşiklerinin üretiminde en önemli ham maddedir. Manyezit minerali bulunmadan önce J.E. Delanetherie 1795 yılında Magnezyum Karbonat, Nitrat, Klorit ve Sülfat gibi tuzlara, A. Brongmart ise magnezyum karbonatlar ile silikatlara “Manyezit” adını vermiştir. Daha sonraları ise D.L.G. Karsten magnezyum karbonat için “manyezit” ifadesini kullanmıştır. Manyezitin refrakter malzeme endüstrisinde kullanımına dair ilk literatür bilgileri 1866-1868 yıllarına aittir. Manyezit ilk kez 1890 yılında Avrupa’da Beşemel ve açık fırınlarda astar olarak kullanılmaya başlanmıştır. Pensilvanya’da (ABD) 1913 yılında dolomitten magnezya (MgO) üretimi yapılmıştır.

1885 yılında ise Fransa'da deniz suyundan magnezyum hidroksit çöktürülerek sentetik manyezit elde edilmiştir (Erdoğan ve Yıldız 2012).

2.4. Manyezitin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Manyezit; bileşiminde %47,7 MgO, %52,3 CO₂ ve çok az miktarda Fe₂O₃ bulunan ayrıca yapısında değişik oranlarda demir, kalsiyum, mangan ve alüminyum elementlerini bulundurabilen kalsit (CaCO₃), dolomit (CaMg(CO₃)₂), manyezit (MgCO₃), breunerit (MgFeCO₃) ve siderit (FeCO₃) gibi trigonal (rombohedral) karbonhidratlar grubunda yer alan MgCO₃ formülünde bir mineraldir. Saf halde renksiz olan manyezitin içerdiği bileşenlerine göre rengi beyaz, sarı, gri ve kahverengi arasında değişebilir. Sertliği 3,4-4,5 arasında değerler alırken özgül ağırlığı 2,9-3,1 arasında olan bir mineraldir. Sert bir mineral yapısında olan manyezit serpantin ve benzeri kayaların bozunma ürünü olarak tanımlanır. Doğada manyezitin Kriptokristalin (jel amorf) ve Kristalen (iri kristalli) olmak üzere iki şekilde bulunduğu bilinmektedir (Sarıiz ve Nuhoglu 1992; DPT 2001; Topak 2006; Çakır 2007).

2.4.1. Kriptokristalin (jel amorf) manyezit

Kristalin manyezite göre genellikle daha saf halde bulunan, yapısında bir miktar kireç, alümin ve çok az miktarda da serbest silis bulundurabilen ve genellikle hiç demir içermeyen manyezit şeklidir. Serpantinleri genellikle filon, mercer ve damar şeklinde keserken serpantin kayalarında da kapalı basenler içinde tortul şeklinde horizonlar oluştururlar (Kuzvart 1984).

2.4.2. Kristalen (iri kristalli) manyezit

Nadiren saf olarak bulunan iri kristalli manyezitler, yapısında fazla miktarda demir, kireç ve silika içermektedirler. Daha çok yaşlı kayalarla birlikte bulunurken karbonatlı kayalarda da ramplasman şeklinde oluşurlar. En yaygın minerali Brunaerit olup

içerdiği demir oranına göre "düşük demirli" ve "demirce zengin" olarak isimlendirilirler. Bu mineraller yaygın olarak ABD, Çin, Rusya, K. Kore, Brezilya, İspanya, Avusturya ve eski Çekoslovakya sınırları dâhilinde bulunurlar (TMMOB 2011).

Manyezit ısıtılınca CO₂ çıkararak bozulur ve magnezya (MgO) oluşur. Isıtılmaya devam edildiğinde 700-1000°C'de kostik kalsine manyezite, 1450-1750°C arasında ise oldukça yoğun ve sert bir madde olan sinter manyezite dönüşmektedir. Yapısında %0,1 oranından düşük Fe içeren saf manyezit elektrikli fırınlarda 1700°C'nin üstünde sıcaklığa kadar ısıtıldığında özgül ağırlığı 3,65 olan, yoğun, çok yüksek sıcaklığa dayanabilen çakmaktaşına benzer görünümlü magnezyum oksite dönüşür (Kuzvart 1984).

Manyezit soğuk hidroklorik asitte hiçbir reaksiyon vermezken ısıtılmış asitlerde düşük çözünürlük gösterir. Buna karşılık kalsit soğuk hidroklorik asitte kuvvetli, dolomit ise zayıf köpürme gösterir. Bu özelliği ile manyezit bu iki mineralden kolayca ayrılabilir (Kuzvart 1984).

Magnezyum gerek metal, gerekse bileşik halinde önemli bir ham madde niteliğindedir. Endüstriyel alanda en yaygın magnezyum tüketimi MgO, MgCl₂, Mg(OH)₂, MgSO₄ vb. gibi magnezyum bileşikleri şeklindedir. Tüm bu özelliklerin dışında yüksek erime noktası özelliği ile refrakter malzeme endüstrisinin en önemli girdisi olan sinter manyezit Dünya manyezit bileşenleri tüketiminin %80'ini kapsar (Kuzvart 1984).

Magnezyum bileşiklerinin en önemli kaynağı bir magnezyum karbonat minerali olan manyezite tabiatta sık rastlanmasına karşın, istenilen formların mevcudiyetinin azlığı bu alandaki araştırma odaklarının dikkatini çekmektedir (Kuzvart 1984).

Manyezit mineralinin tabiatta istenilen formu için en önemli kriter; yapısında bulunan herhangi bir gang mineralin manyezit içerisinde %0,1 oranından az ve ya çok bulunması durumudur ve bu olay doğrudan manyezitin ekonomik değerini belirler. Bu nedenle

endüstride kullanacak manyezitte yüksek refrakterlik, yüksek mukavemet, düşük porozite, kimyasal dayanıklılık ve hacimsel kararlılık aranır. Kullanılacak manyezitin içerisinde bor oranı %0,17'den düşük, özgül ağırlık $3,0 \text{ gr/cm}^3$ 'den büyük olmalıdır (Sarız ne Nuhoglu, 1992; Erdoğan ve Yıldız 1995; DPT 2001; Çakır 2007).

2.5. Manyezitin Oluşumu

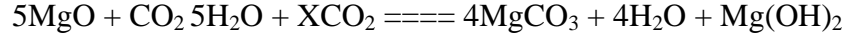
Bilim insanlarının yaptığı birçok araştırmaya rağmen manyezit oluşumu ve oluşum koşulları kesin olarak ortaya konulamamıştır. Fakat manyezit formasyonu ile ilgili bilinen en önemli gerçek, oluşum sırasında CO_2 ve Mg^{+2} kaynaklarının bir arada bulunmasıdır. Ortamın fiziko-kimyasal koşullarına da bağlı olarak bu iyonlardan birinin bol miktarda bulunması manyezit oluşumunu sağlar. Yapılan araştırmalar hidrotermal ankeritik manyezit oluşumları hariç tutulursa endojen ortamda diğer bir deyimle magmatik metamorfik evrimde yoğun manyezit oluşumuna rastlanmadığını ve özellikle ekonomik önem taşıyan manyezitin eksojen ortamın karakteristik bir minerali olduğunu göstermektedir (MMO 2002; MMO 2004).

Deniz suyunda Mg konsantrasyonu Ca konsantrasyonundan 3 kat fazla olmasına rağmen, deniz tortuları içerisinde kalsiyum oluşumlu kalkerler geniş yer tutarken hiçbir manyezit oluşumuna rastlanmaması eksojen ortamdaki manyezit dağılımının en ilginç yönüdür. Bu gözlemi, hem modern sedimentlerdeki hem de yaşlı kayalardaki manyezit eksikliği desteklemektedir (Evans 1993).

1950'lerde yapılan araştırmalar, manyezitin önce $\text{MgCO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ şeklinde çökeldiğini daha sonra ise suyunu kaybederek MgCO_3 formülüne uygun manyezit halini aldığını göstermiştir. 1960'larda ise modern manyezit oluşumları üzerine çalışan bilim insanları manyezit oluşumlarının primer yapıda olmadığını, diyojenik evrede dolomitin Mg iyonlarınca zengin bor eriyikleri tarafından yer değiştirilmesi sonucu oluştuğunu öne sürmüşlerdir (Takmak 2007)

1970'lerde manyezit yataklarının oluşumunun dolomit, serpantin gibi magnezyumca zengin kayaların hidrotermal ve yüzey sularıyla etkileşiminin ürünü olduğu düşünülürken, Barnes (1973) ve Langmuir (1965) gibi araştırmacılar manyezit oluşumunu sağlayan CO₂ ve Mg⁺² iyonlarını kontrol eden koşulların 55°- 60°C gibi düşük ısılarda bile gerçekleşebileceğini savunmuştur. Manyezit oluşumu ortamın Eh, Mg, pH ve CO₂ konsantrasyonu, CO₂ kısmi basıncı ve ortamdaki iyonların miktarı gibi çeşitli faktörlerin etkisi altında hidromanyezit çökelişi ile başlar (Takmak 2007).

Hidromanyezitin manyezite dönüşüm reaksiyonu aşağıdaki gibidir.



Hidromanyezit Manyezit Brusit

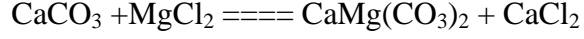
Burada X karbonhidrat miktarıdır. Karbonhidrat miktarı arttıkça reaksiyon sonucu oluşan manyezit miktarı artarken brusit miktarı azalır. Bununla beraber normal şartlar altında (NŞA) atmosfer ortamındaki CO₂ basıncı reaksiyon için yeterli değildir. Ayrıca normal atmosfer basıncı altında tüm MgO manyezitleşmemekte bu yüzden bir bölümü burosit olarak kalmaktadır. Bu reaksiyondan CO₂ basıncının artmasıyla geriye kalacak burosit oranının azaltılacağı sonucu çıkmaktadır. Bu yüzden CO₂'in basıncı manyezit oluşumu için tek belirleyici etmen değildir (Takmak 2007).

Oluşum mekanizmalarına göre manyezit yatakları dört ana başlık altında incelenir.

2.5.1. Hidrotermal kristalin manyezit yatakları

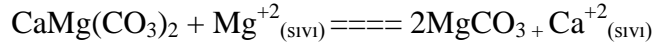
Doğu Alpler, Karpatlar, Pireneler ve Urallarda örneklerine rastladığımız hidrotermal kristalin manyezit yatakları; dolomit, dolomitik kireçtaşı veya grafitli, kumlu, killi ürünlerin hidrotermal metazomik ornatılmasıyla oluşur. Aşağıdaki reaksiyonda

gösterildiği gibi Mg'lu çözeltinin kalsitle reaksiyona girmesinden dolomit, dolomitten de manyezit oluşur (Kuzvart, 1984; Toprak 2006).



Kalsit

Dolomit



Dolomit

Manyezit

100-200°C aralıklarında kalsit, dolomit ve manyezit birbirlerine dönüşebilmektedirler.

Bütün magmatik hidrotermal çözeltilerin yapısında bir miktar Mg bulursa da esas olarak manyezit yataklarının oluşumunu sağlayan Mg'lu çözeltilerin etkisinde kalan dolomitler, peridotidler ve yüzey sularının olduğu sanılmaktadır. Manyezit oluşumunda daha çok Mg'un taşınması ve sıcaklığının artması sırasında magmatik çözeltilerin etkisi görülür (Kuzvart 1984; Toprak 2006).

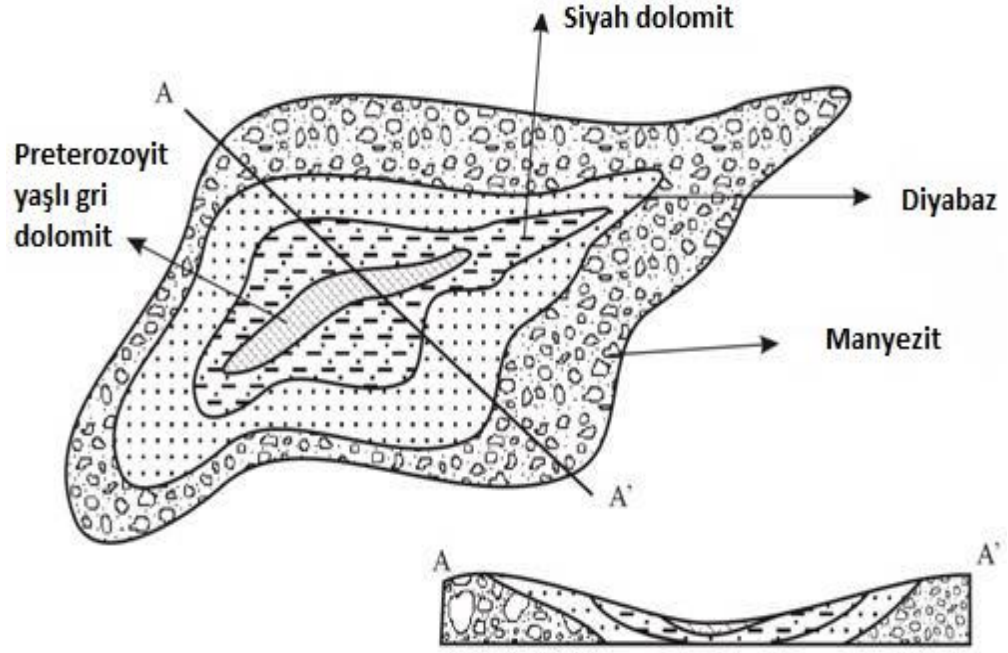
Kireçtaşı içindeki yataklarda, kireçtaşı ile magmatik sokulum kayacının içinde hemen hemen her zaman bir dolomitik kısmın varlığı gözlenmektedir. Styria (Avusturya) bu tip manyezit oluşumuna sahip en büyük yataktır. Güney Urallar da yer alan hidrotermal metazomik oluşumlu Karagati manyezit yatağının enine jeolojik kesiti aşağıda verilen 4 temel kısımdan oluşmaktadır (Kuzvart 1984; Toprak 2006) (Şekil 2.1).

Preterozoik yaşlı gri dolomit,

Şistli marnlı dolomitlerle ardalanmış siyah dolomit,

Diyabaz,

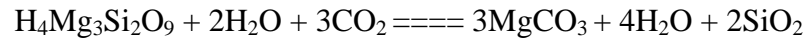
Manyezit şeklindedir (Kuzvart 1984; toprak 2006).



Şekil 2.1. Karagati manyezit yatağının enine jeolojik kesiti

2.5.2. Hidrotermal masif manyezit yatakları

Serpantinleşmiş ultrabazik kayaların içinde hareket eden hidrotermal çözeltiler tarafından serpantinlerden alınan Mg'un CO₂ ile reaksiyon vermesi sonucu hidrotermal masif manyezit yatakları oluşmuştur. Bu oluşum aşağıdaki reaksiyonla açıklanmaktadır.



Serpantin Manyezit Kalsedon opal kristobalit

Cevher oluşumu düşük sıcaklık ve basınç şartları altında gerçekleşir ve oluşan ürünler çok ince kristalli veya masivdirler.

Hidrotermal kriptokristalin manyezit yataklarının yan kayaçları, ornatmaya maruz kalan kayaçlardır ve içlerinde yan kayaç atıklarına rastlamak mümkün değildir. Büyük

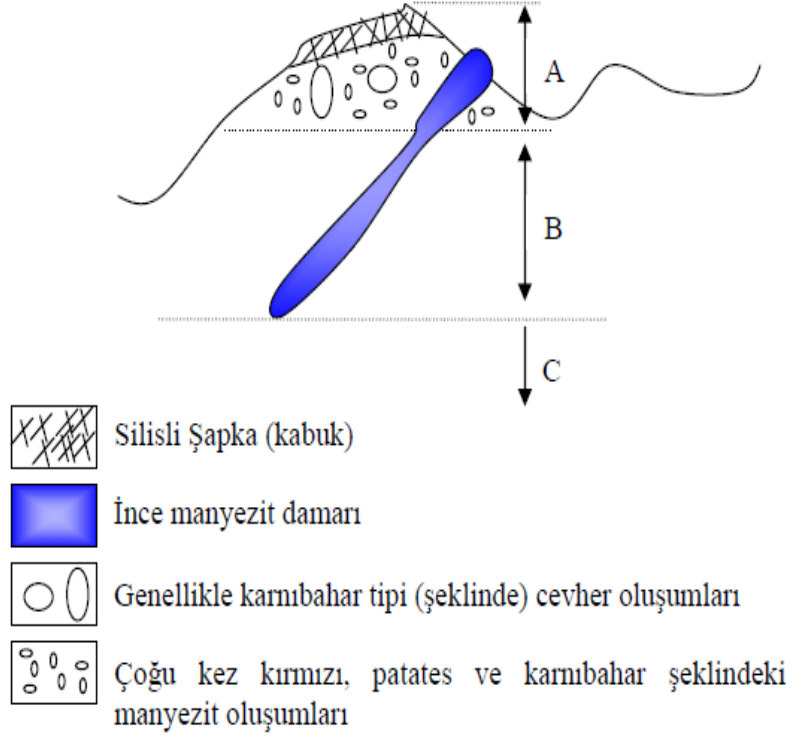
rezervler veren iri kristalli, düzensiz kütle ve ya mercek şekilli ve bol demir içeren manyezit yatakları genellikle Palezoik ve daha yaşlı kayalarla birlikte bulunmaktadır. Ayrıca bunların demir konsantrasyonları düşük, kalsiyum konsantrasyonları da çok yüksek miktardadır. Bu kayalar damar veya ağ şekilli olarak bulunurlar. Birkaç yüz metre derinlik ve birkaç kilometre uzunlukta yataklara rastlamak mümkündür. Hidrotermal kriptokristalin manyezit yataklarının grafitçe zengin kumlu şistlerle birliktelikleri dikkat çekmektedir. Hidrotermal manyezit yataklarının en tipik örneği, Yunanistan'ın Eurobia Adasında bulunmaktadır (Toprak 2006).

2.5.3. Yüzeysel sular ile oluşan masiv manyezit yatakları

CO₂'ce zengin yüzeysel sularının serpantinleri alterasyonu sonucu oluşurlar. Serpantinlerin içinde yüzeysel sularının hareketi sonucu oluşan yan kayaç etkileşimleri ile pH derecesi ve Mg konsantrasyonları yükselir. pH derecesi 11 civarına geldiğinde Mg brüsit veya sulu manyezit olarak çökelmeye başlar (Kuzvart 1984;Toprak 2006).

Cevher yapısal olarak incelendiğinde çatlak dolgusu olarak gelişmiş ağsal damarlar şeklinde olduğu görülmektedir. Yüzeysel sular serpantinlerin çatlakları boyunca hareket ederek bu çatlaklarda manyezit çökelimini sağlarlar. Yüzeyselden 15-20 m derinde başlayarak 40-50 m kalınlıktaki bir zonda manyezit ağsal damarlar şeklinde ortaya çıkar ve bu kısımların kalınlığı 30 cm'yi geçmez. %20 manyezit içeren damarlar işletilebilir özelliktedir (Kuzvart 1984; Toprak 2006).

Yüzeysel sular ile oluşan masiv manyezit yataklarında damar tipi manyezitler de bulunabilir. Manyezit zonu üzerinde opal, kalsedon veya kuvars bileşikleri içeren demir bileşiklerince zengin aynı zamanda yatağın erozyondan korunmasını sağlayan silisli bir şapka bulunur. Urallardaki Khalilova (Halilkızı) yatağı yüzeysel sularıyla oluşan masiv manyezit yatağının tipik bir örneğidir (Toprak 2006) (Şekil 2.2 ve Şekil 2.3).

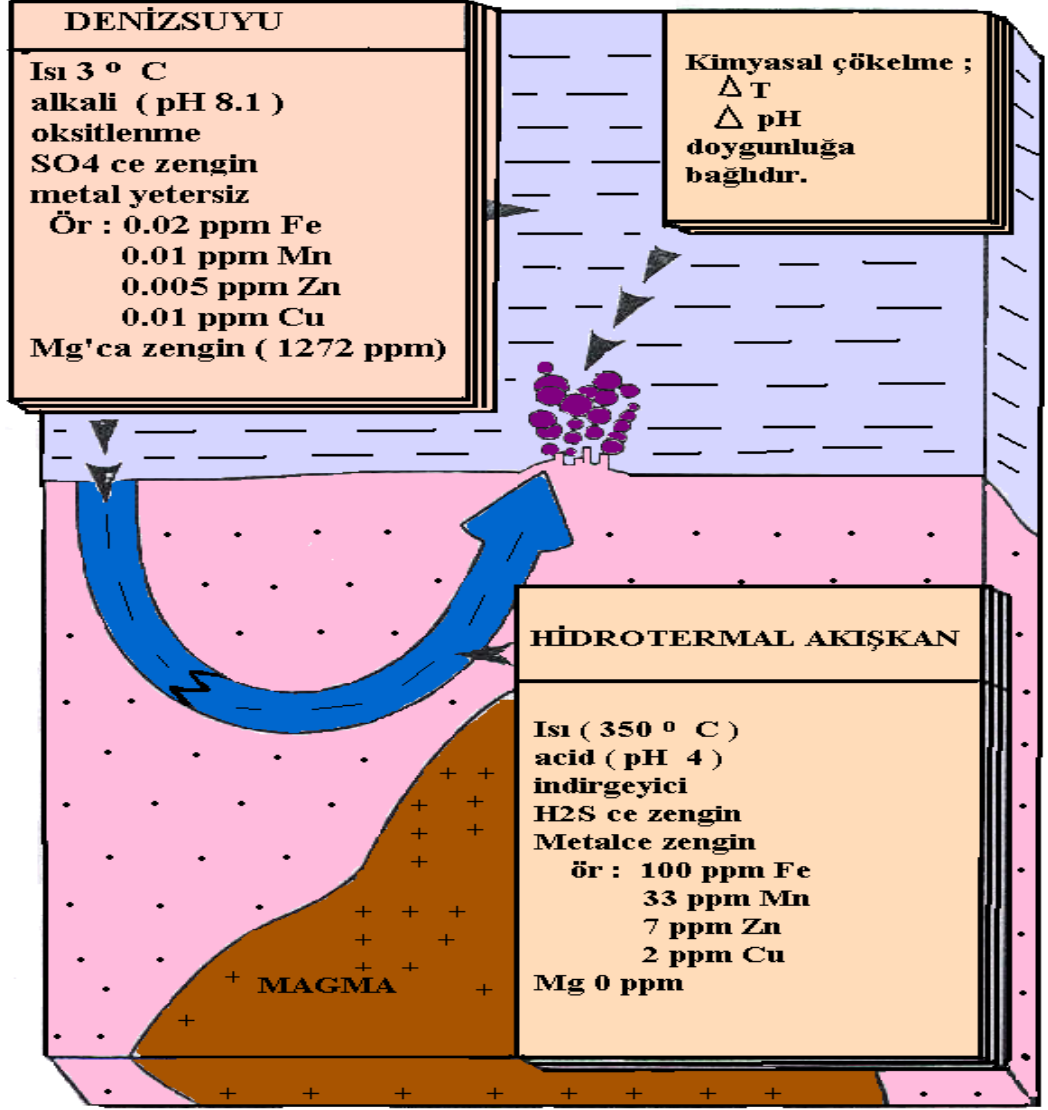


A: Şiddetli alterasyon zonu (genellikle koyu kırmızı görüntü verir / 30–50 m)

B: Alterasyon zonu (altera serpantinler)

C: Alterasyona uğramamış serpantinler (ana kütle)

Şekil 2.2. Yüzeysel sular ile oluşan masiv manyezit yatakları



Şekil 2.3. Hidrotermal alterasyon modeli (21°N Doğu Pasifik'te meydana gelen)

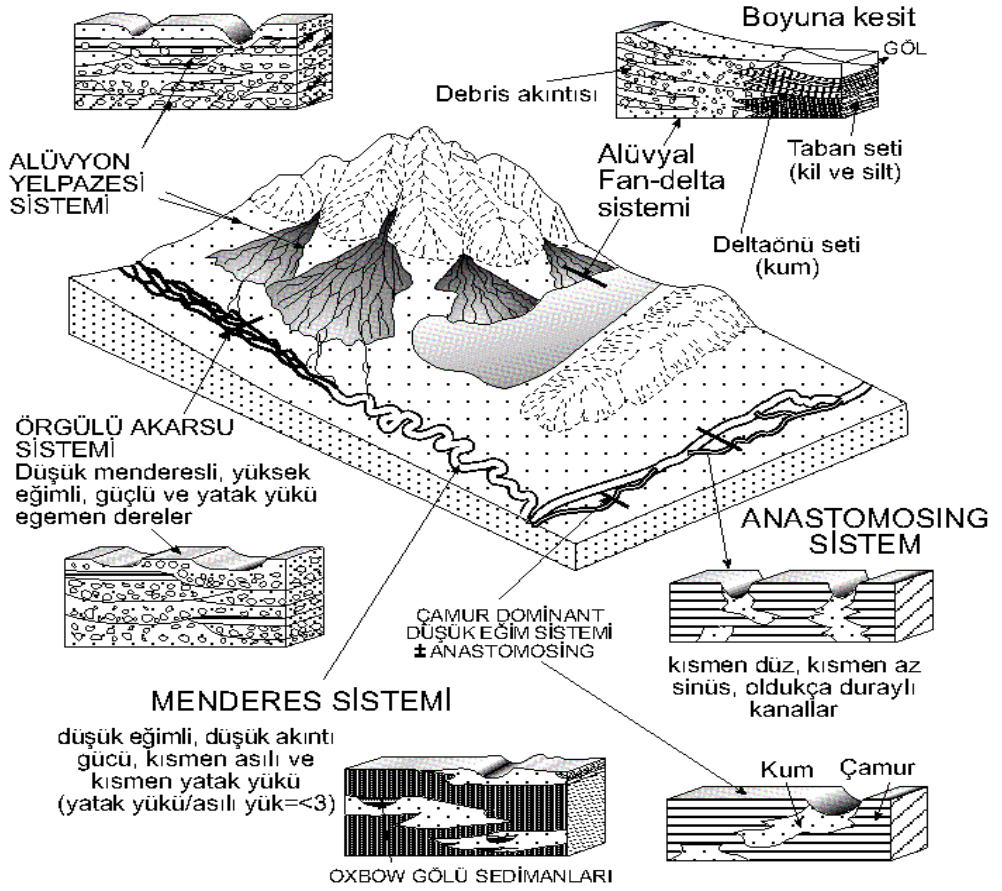
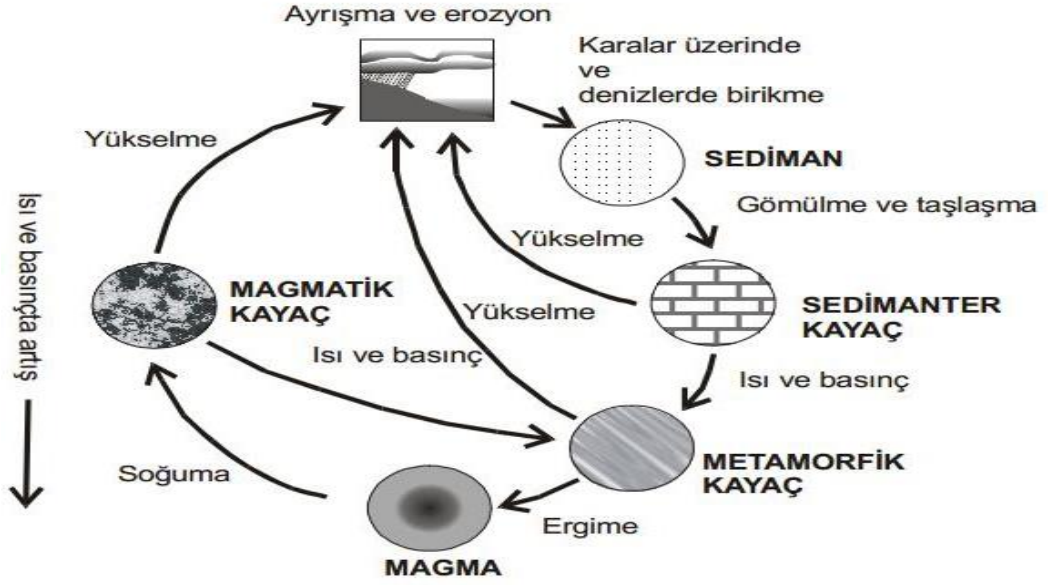
2.5.4. Sedimenter masiv manyezit yatakları

Sedimenter masiv manyezit yatakları manyezit çökelişi için çok özel şartlar gerektiren lagün veya benzer tuzlu su ortamlarında ve tatlı su göllerinde olmak üzere iki farklı ortamın ürünüdür. Tuzlu suda manyezit çökelişi ortamda H₂S, NH₃ veya organik materyalin bulunması, sıcaklığın yükselmesi, Ca⁺² konsantrasyonunun düşük (50 mg/L'den küçük) ve CO₂ basıncının yüksek (380 mg/L'nin üzerinde) olması ile MgSO₄ ve diğer tuzların yüksek oranda bulunması gibi şartlara bağlıdır. Bu bilgiye dayanarak

önce brusit ($Mg(OH)_2$) ve sulu magnezyum karbonatın çöktüğü daha sonra ise basıncın artmasıyla bunların manyezite dönüştüğü düşünülmektedir. Tuzlu su ortamlarında oluşan sedimenter manyezit yataklarının en önemli örneği İspanya'da, Madrid'in kuzey kesimindeki Asturreta yöresinde bulunmaktadır. Burada manyezit, çevre kayaları ile uyumlu olarak çökelmiş Namuriyen yaşlı dolomitlerin içinde yer almaktadır. Çört, aragonit, kuvars taneleri, kalsit, kalkopirit, demir oksit, barit, albit, malahit ve florit içerir. Yatak metamorfizma geçirdiğinden ilksel kriptokristalin manyezitler bazı bölgelerde kaba taneli özellik kazanmıştır (Evans 1993).

Tatlı su göllerinde de manyezit çökelişi benzer şartlarda oluşmaktadır. Tatlı sularda manyezitin kaynağı, ortama magmatik çözeltilerin katılması, ya da serpantin ve ultrabazik kayaların içinde dolaşan ve onların alterasyonu ile Mg iyonlarınca zenginleşen yüzey sularının ortama gelmesidir (Evans 1993).

Burdur'un Yeşilova bölgesinde yer alan Salda Gölü'nde aktüel manyezit çökelişi devam etmektedir. Gölün çevresinde gözle görülür bir şekilde ileri derecede altere olmuş serpantinler yüzeyleşmiştir. Bunların içinde mercek ve stokwork şeklinde manyezit oluşumları vardır. Salda gölü ve benzeri manyezit oluşumlarında göle taşınan manyezit önce manyezit çamuru şeklinde daha sonra ise sertleşerek küre, topak veya nodüller şeklinde kriptokristalin manyezite dönüşmektedir ve düşük demir içeriğine sahip olmasıyla dikkat çeker. Burada gerçekleşen çökeltme olayının bilim adamlarınca sianobakteri türü bakteriler tarafından gerçekleştirildiği düşünülmektedir (Braithwaite and Zedef 1996)



Şekil 2.4. Sedimenter oluşumları

2.6. Magnezyum Ürünlerinin ve Manyezitin Kullanım Alanları

Dünya geneline bakıldığında üretilen manyezitin %90'ından fazlası, kostik kalsine ve sinter manyezite dönüştürülerek, bazik refrakter endüstrisinde özellikle tuğla yapımında kullanılmaktadır. Geriye kalan %10 oranındaki ham manyezit ise magnezyum tuzları ve bazı ilaçların yapımı ile kağıt, şeker ve çimento sanayisinde kullanılmaktadır. Magnezyumlu ürünler ve kullanım alanları aşağıdaki verildiği gibidir (Kaya 1993; Kafas 2012).

2.7. Doğada Bulunan Magnezyum Oksit (Magnezya) Çeşitleri

Sinter manyezit

Manyezitin 1750°C'nin üzerindeki sıcaklıkta sinterleşmesi sonucu elde edilir. Dünyada sinter manyezitin %75'inden fazlası manyezit mineralinden üretilmektedir.

Üretilen sinter manyezitin %65-80'i refrakter sanayisinde kullanılır.

Bu manyezit tipinin en önemli tüketicisi demir ve çelik endüstrisidir

Tuğla metalürji sanayisinde fırın astarlarında kullanılan manyezit refrakterler yüksek ısıda bazik cürufa dönüşürler (Kaya 1993; Kafas 2012).

Kostik Kalsine Manyezit

900°C civarındaki sıcaklıkta kalsinasyon işlemiyle elde edilir. Geniş bir tüketim alanı vardır.

Sorel çimentosu ve oksisülfüt çimentosu

Kalsine manyezit magnezyum klorit eriğine karışarak çimento elde edilimi

Suni ipek ve suni gübre eldesi

Refrakter malzeme üretimi

Kimya endüstrisi (lastik, asit nötralizatörü vs.)

Metalik magnezyum

Kağıt endüstrisi (ince kağıt yapımı)

Su arıtma

Özel kostik kalsine manyezit

Dolgu malzemesi (eczacılıkta ilaç yapımı, boya vs)

Kauçuk

Elektrik izolasyonu

Gübre

Sülfür ve gaz temizleme

Çimento

Çökeltili magnezyum karbonat

Mürekkep

Seramik malzeme

İzolasyon ve cam

Kimya ve gübre sanayi

Magnezyum Hidroksit

Şeker rafinasyonu

Magnezyum oksit eldesi

İlaç endüstrisi

Magnezyum klorür

Çimento

Tekstil

Metalik magnezyum eldesi

Seramik malzemeler

Kimya

Kağıt

Magnezyum sülfat

Boya

İlaç

Patlayıcı madde

Metalik magnezyum

Uçak, makine, alet yapımı

Alüminyum ve magnezyum alaşımlarında (Kaya 1993; Yıldız ve Erdoğan 1995; Önal 2004; Topak 2006; Kafas 2012)

2.8. Manyezitin Kullanım Alanları

İri taneli manyezitler gübre endüstrisinde kullanılır, özellikle kok oluşturmeyen ince tozlarla pastörize tozsuzlaştırma işleminde,

İlaç endüstrisi ve tıpta,

Kağıt endüstrisinde

İnşaat endüstrisinde inşaat blokları izolasyonu, askı taban ve hafif yapı elemanı olarak,

Genel kimya endüstrisinde magnezyum bileşikleri üretimi için başlangıç malzemesi olarak,

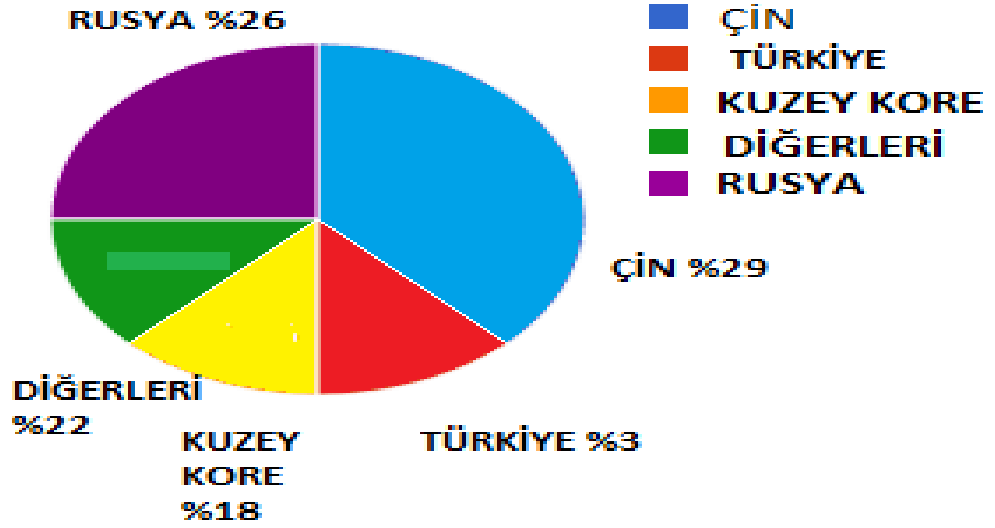
İnce dane şeklinde tarım endüstrisinde hayvan yemine katkı,
 Lastik ve plastik endüstrisinde, vulkanizör madde ve stabilizatör madde,
 Hızlı çalışan motorlar için otomatik yağlarında, etkin olarak asitlerin nötrleşmesinde katkı maddesi,
 Uranyum cevherlerinden uranyum oksit eldesinin bir basamağı olan karbonat devrelerinde absorbent ve katalizör olarak kullanılır (Yıldız ve Erdoğan 1995; Önal 2007).

Çizelge 2.2. Refrakter tüketiminin sektörel dağılımı (Yıldız ve Erdoğan 1995)

SEKTÖR	%
Demir-Çelik	69,1
Çimento	8,9
Bakır	0,4
Blister Bakır	1,64
Metalürji	1,2
Şişe-Cam	1,7
Kireç (Şeker)	0,9
Kireç	0,4
Döküm	0,9
Diğer	14,9

2.9. Dünya Manyezit Yatakları

Dünya genelinde en büyük manyezit rezervine sahip olan Çin, 750 milyon ton rezervle ilk sırayı alırken Türkiye 65 milyon ton rezervle bu pazarda önemli ülkeler arasındaki yerini almıştır (Önal 2007; Bal 2012) (Şekil 2.5).

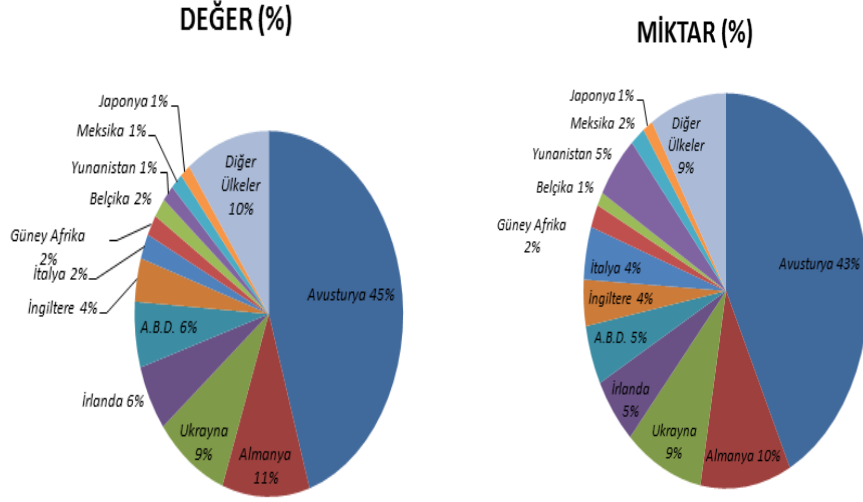


Şekil 2.5. Dünya manyezit rezervlerinin dağılımı (D.D.Carr, Industrial Minerals & Rocks 6th Ed., SME Littleton 1994.)

Dünyadaki en önemli manyezit üreticisi ülkeler için Kuzey Kore, Çin, Çek Cumhuriyeti, Yunanistan, İspanya, Brezilya, Bağımsız Devletler Topluluğu, Türkiye, Hindistan ve Güney Afrika Cumhuriyeti örnek olarak verilebilir. Dünya doğal manyezit üretimi Çizelge 2.3'de gösterilmiştir (Şekil 2.6).

Çizelge 2.3. Dünya Doğal Manyezit Rezervleri ve Üretimi (x1000 ton) (Önem 1996; Önal 2007)

ÜLKE	Rezerv		Üretim		
	Görünür	Potansiyel	1980	1991	2000
Çin	750 000	2 550 000	2 000	575	700
Rusya	650 000	730 000	4 000	460	250
Kuzey Kore	450 000	750 000	1 850	435	300
Türkiye	65 000	160 000	500	230	700
Brezilya	45 000	65 000	745	100	90
Hindistan	30 000	45 000	371	140	100
Yunanistan	30 000	30 000	1 167	250	190
Slovakya	20 000	30 000	2 201	160	250
Avusturya	15 000	20 000	1 315	350	60
Avustralya	15 000	20 000	-	-	190
İspanya	10 000	30 000	-	-	150
Amerika B.D.	10 000	15 000	250	300	120
Diğer Ülkeler	2 510 000	475 000	200	125	100
Toplam	2 510 000	4 920 000	13 424	3 380	3 100



Şekil 2.6. Dünya doğal manyezit rezervleri

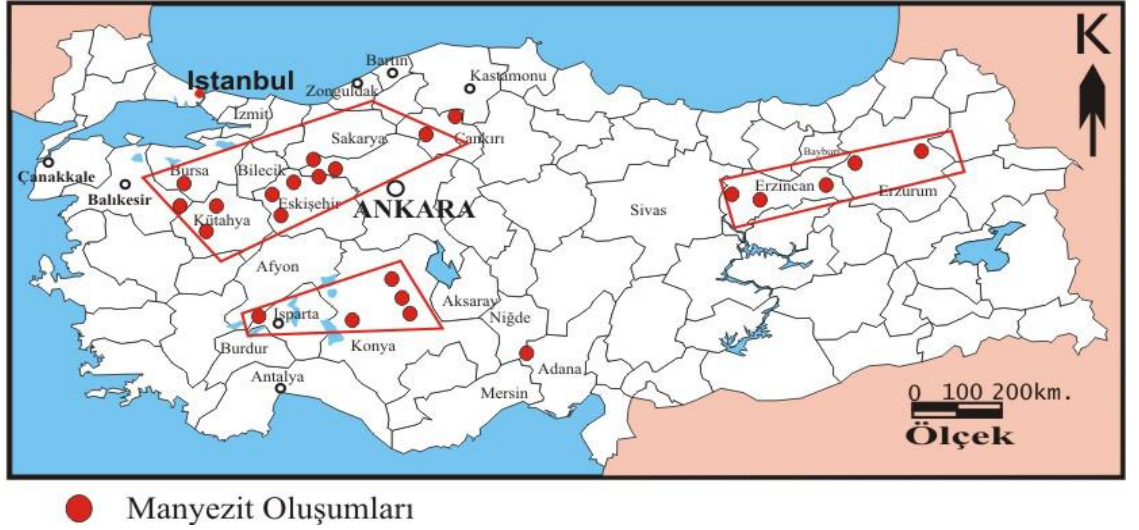
2.10. Türkiye Manyezit Yatakları

1/500.000'lik Türkiye jeolojik haritası incelendiğinde, Türkiye'nin yüz ölçümünün yaklaşık %8'den fazlasını yeşil renkli ultra bazik kayaların kapladığı görülmektedir. Krom ve manyezit yataklanmasında önemli olan bu yan kayalarda krom madenciliği yüzyıllardır yapılmasına rağmen, manyezit madenciliği 1944'ler gibi yakın bir geçmişte başlamıştır. Bunun nedeni ham manyezitin kroma göre daha ucuz olması ve 1970'lere kadar sahillere yakın yerlerde manyezite rastlanamamasıdır (MTA 1981).

Türkiye'de sedimentler ve serpantinlere bağlı manyezit oluşumları bulunurken hem kromit yatakları hem de jel manyezit oluşumları geniş yer tutar. İlk manyezit yatakları 1850'li yıllarda Konya Meram'da işletilmiştir. Ancak ilk ciddi boyutta üretim 1961'li yıllardan sonra Türkiye manyezit yataklarının yabancı şirketlerin ilgisini çekmesiyle başlamıştır. Bu nedenden dolayı Türkiye'de manyezit ve manyezit maden çalışmalarıyla ilgili bilgi oldukça kısıtlıdır (MTA 1981).

Türkiye'de sedimentlere bağlı manyezit yatakları, Denizli'nin Hırsır Dere-Çambaşı Köyü civarı ile Erzincan-Çayırılı'da yer almaktadır. Buradaki manyezit oluşumları, kilden konglomeraya kadar uzanan klastik tortul kayaları serisi içinde yerleşmişlerdir.

Serpantinlere bağlı kriptokristalin masiv manyezit yataklarının ise büyük bir bölümü Konya-Eskişehir-Kütahya üçgeninde bulunur (MTA 1981). Türkiye’de bulunan başlıca manyezit yatakları Dursunbey (Balıkesir), Kınık (Kütahya), Mustafa Kemalpaşa (Bursa), Mihalıççık (Eskişehir), Meram (Konya), Mudurnu (Bolu), Yunak (Konya), Refahiye (Erzincan), Kızlar Köyü (Datça-Muęla), Haruniye (Seyhan-Adana), Göcek (Fethiye-Muęla) ve Deęirmendere (Isparta) Manyezit yataklarıdır. Türkiye’deki manyezit rezervleri Çizelge 2.4’de gösterildiği gibidir (Yıldız ve Erdoğan 1995) (Şekil 2.7)



Şekil 2.7. Türkiye’deki manyezit rezervlerinin bölgelere göre dağılımı

Çizelge 2.4. Türkiye’deki manyezit rezervleri (Yıldız ve Erdoğan 1995).

YERİ	Rezerv x 10 ⁶ ton	Kalite (%MgO)
Eskişehir-Yukarı Kartal	460.313	47,63
Konya-Meram	23.200	46,47
Kütahya-Sobran-Türkmentepe	22.000	46,42
Eskişehir-Dutluca	12.000	46,80
Eskişehir-Ballık II	11.486	
Erzincan-Çayırılı-Çataksu-Aravans	8.745	44,46
Konya-Çayırbağ I	8.500	41,98-47,54
TOPLAM	546,244	

Ülkemizdeki en yüksek kaliteye sahip manyezit rezervinin Eskişehir-Kütahya sınırları içinde olduğu tespit edilmiştir. Bu bölgede kazanılabilir tüm manyezit rezervi 5-10 milyon ton civarında olup sahalar çoğunlukla KÜMAŞ VE MAŞ işletmelerine aittir. Eskişehir ve Kütahya illerindeki rezervler %1’in altında silis içerirken Meram bölgesinde cevherdeki silis oranı %6-8 arasındadır (MTA 1981).

Türkiye manyezitleri, jel manyezit tipi yatakların bütün özelliklerini taşımaktadır ve genellikle düşük olan Fe, Si, CaO oranları bölgeler arası değişkenlik gösterir (Takmak 2007).

2.11. Manyezit Üretim Teknolojisi ve Üretim Miktarı

Maden yatağında cevherin üretimi ile başlayan manyezit teknolojisi genellikle açık işletme yöntemiyle nadiren de kapalı işletme yöntemleriyle üretilip ardından bir takım zenginleştirme işlemlerine tabi tutulur. Cevher zenginleştirme işlemi, gang minerallerinden olan kristal manyezit de dolomit, biyotit, gröna, kuvars ve talkdan, jel manyezit de ise serpantin ve opalden ayrıştırılmasından ibarettir (MTA 1981).

Günümüzde hala kullanımı devam eden çok çeşitli manyezit zenginleştirme yöntemleri vardır. Bunların en bilinenleri el ile ayıklama, manyetik ayırma, ağır ortam, elektrostatik ayırma, flotasyon ve optik yöntemlerle zenginleştirmedir. Ayrıca hidrotasyon, gravite ve kalsinasyon gibi diğer zenginleştirme yöntemleri de kullanılabilir (MTA 1981).

Manyezit ile gang mineralleri arasındaki renk farkından yararlanılarak yapılan ayırma işlemi el ile ayıklama yöntemidir. Uygulamanın yapılabilmesi için tane boyutunun 25 mm'den daha büyük olması gerekmektedir. Ayrıca benzer özellikteki cevherlerde optik ayırıcılardan yararlanılarak ayırma yapmak da mümkündür (MTA 1981).

Ağır ortamla zenginleştirme işlemi manyezit ile ekonomik değere sahip olmayan gang mineralleri arasındaki yoğunluk farkından yararlanılarak yapılır. Ağır ortam oluşturmak amacıyla 6,7-6,9 g/cm³ yoğunluktaki atomize ferrosilikon kullanılırken, ağır ortam kabı olarak da koni tambur ve silikon kullanılır (MTA 1981).

.Manyetik ayırma işlemi, serpantinin manyetik özelliğinin manyezitten daha fazla olması nedeniyle ancak uygun tane iriliklerine sahip cevherler olduğu durumlarda mümkündür (MTA 1981).

Manyezit ile gang mineralleri arasında var olan az miktardaki dielektrik katsayısı farkı elektrostatik ayırma yapılabilmesine olanak sağlar. Ancak uygulamanın pahalı oluşu nadiren kullanılmasına neden olmaktadır (MTA 1981).

Flotasyon ile zenginleştirme yönteminde, silikatlar, karbonatlar ve demir oksit hidratlardan manyezitin ayrılmasında genellikle yağ asitleri ve sabunlar toplayıcı olarak kullanılırlar. Flotasyon işlemi hafif alkali ortamda yapılır. Su içerisinde erimiş halde bulunan kalsiyumu çöktürmek için kalgon, soda, sodyum silikat gibi maddeler kullanılırken, bastırma işleminde de gang maddenin cinsine göre sodyum sülfür, tannik

asit ve sodyum silikat gibi bastırıcılar kullanılır. Bu işlem sırasında yüzdürülen mineraller yüzmesi istenmeyen mineraller benzer kimyasal yapıda olduğundan bastırıcıların dikkatli bir şekilde seçilmesi ve kullanılacak miktar ayarlarının çok iyi yapılması gerekir (Yıldız ve Köse 2002).

Hidrotasyon yoluyla ayırma, kalsine manyezitin su ve su buharı ile ısıtıldıktan sonra bekletilip oluşan karışımın elekten geçirilerek kısmen temizlenmesi işlemidir (Yıldız ve Erdoğan 1995; Ayvazoğluyüksel 2011).

Kalsinasyon ve yerçekimi ile ayırma, manyezit ve silisyumlu bileşik içeren ham maddenin 600-900°C sıcaklıkta kalsine edilip daha sonra derişiminin artırılması esasına göre uygulanan bir yöntemdir. Bu işlem esnasında manyezit büyük oranda ayrışarak 1,3-1,9 g/cm³ görünür özgül ağırlık kazanır. Silisyumlu bileşik ise manyezitten farklı olarak bu işlem sırasında sadece toplam suyunu kaybederek 2,2-2,3 g/cm³ görünür özgül ağırlık kazanır. Böylece yerçekimi yöntemi ile ayırma gerçekleştirilir. Sulu ortamlarda yerçekimi ayırması kostik kalsine manyezitin su alarak görünür yoğunluğunun 1,9-2,1'e yükselmesine neden olduğundan pratikte uygulanabilir değildir (Yıldız ve Erdoğan 1995; Ayvazoğluyüksel 2011).

Dereceli kalsinasyon yönteminde manyezit, dolomit ve kalsitten daha düşük sıcaklık derecelerinde kalsine edilirken, ham madde ise manyezitin kalsine olduğu sıcaklıkta kalsine edilir. Bu işlemde manyezit sertliğini kaybeder ve daha sert olan dolomit, kalsit ve silikatlardan öğütülerek ayrılır (Ayvazoğluyüksel 2011).

Ham madde olarak manyezit, dünya piyasalarında kostik kalsine manyezit, ham parça manyezit, sinter manyezit, ergitilmiş manyezit ve refrakter sinter manyezit gibi ticari ürünler olarak arz edilmektedir (Kaya 1993; Takmak 2007).

Ülkemizde manyezit üretimi 1960'lı yıllarda başlamış olup, 1973 yılında 340 bin ton, 1997 yılında 2 milyon ton ve 1998 yılında 2,7 milyon ton gibi bir değere ulaşmıştır.

Günümüzde halen faaliyet gösteren manyezit şirketleri ve kapasiteleri Çizelge 2.5’de gösterilmiştir. (Önem 1997; Takmak 2007)

Çizelge 2.5. Türkiye’de manyezit üreten firmalar ve kapasiteleri

Firma	Maden	Tesisin Yeri	Kapasite(ton/yıl)
Kütahya Manyezit A.Ş.	Kütahya	Kütahya	144 000
Manyezit A.Ş.	Eskişehir	Eskişehir	60 000
Comag Continental Mad. San.ve Tic. A.Ş.	Tavşanlı-Bursa	Eskişehir	40 000
Konya Krom Manyezit Tuğla San. Türk A.Ş.	Konya	Konya	40 000
Toplam			288 000

Türkiye’de Kütahya’da KÜMAŞ işletmesi yılda 180 000 ton sinter manyezit, Eskişehir’de Manyezit A.S. yılda 80 000 ton sinter manyezit, Konya da Konya Krom Manyezit San. A.S. yılda 35 000 ton sinter manyezit ve Eskişehir, Kütahya Tavşanlı’da Comag San. A.S. yılda 40 000 ton kostik kalsine manyezit üretmekte ve ülke ekonomisine önemli katkılar sağlamaktadır (DPT 2001).

2.12. Kümaş Tesisinde Üretim

Kütahya manyezit işletmeleri A.Ş. (KÜMAŞ) 1972 yılında kurulmuş bir tesistir. 1976 yılında ise bu tesiste manyezit cevherinde sinter manyezit üretimi başlamıştır. İkinci döner fırınında da 1982 yılında üretime başlayan KÜMAŞ 1990 yılına kadar dünyanın en kaliteli manyezitini üreten tesis olmuştur. Daha sonraki yıllarda ise tuğla ve harç üretim tesislerini de kurarak doğal manyezitten bazik refrakter malzemeler üreten bir kuruluşa dönüşmüştür (DPT 2001; Kafas 2012).

Dünya genelinde demir-çelik, çimento, demir dışı metaller, cam sanayi fırınlarının gereksinimini karşılayan KÜMAŞ, yılda 180 000 ton üretim kapasitesiyle Türkiye'nin en büyük sinter manyezit üreticisi konumundadır. Ayrıca ülkemizdeki bazik tuğla ve harç üreten diğer kuruluşların da sinter manyezit gereksinimini bu kuruluş karşılamaktadır (DPT 2001; Kafas 2012).

KÜMAŞ işletmesi bünyesinde bulunan ocaklar, Eskişehir-Bilecik-Kütahya üçgeninde olup 65 milyon ton ham manyezit cevheri rezervine sahiptir. Bu cevherler ocaklardan ikisinde kurulu bulunan cevher zenginleştirme tesislerinde zenginleştirilerek kamyonlarla fabrikaya taşınmaktadır. Yılda yaklaşık olarak 500,000 ton ham cevher zenginleştirilerek, sinter manyezit tesislerine gönderilmektedir. Manyezit ham cevheri, kırma, eleme ve kalıcı manyetik ayırıcılarda ayırma işlemlerine tabii tutularak zenginleştirilir (DPT 2001; Kafas 2012).

Bu ocaklarda zenginleştirilerek fabrikaya getirilen ham cevher, ikinci bir zenginleştirme tesisinde tekrar işlenerek konsantre manyezit haline dönüştürülür. İkinci zenginleştirme işleminde kırma, yıkama, eleme ve kalıcı manyetik ayırıcılarda ayırma işlemiyle konsantre manyezit cevheri elde edilir. Döner fırınlardan çıkan baca gazlarının kullanıldığı kurutucuda cevher kurutulur (DPT 2001; Kafas 2012).

Konsantre cevher, her biri yılda 90,000 ton kapasiteli olan 2 adet döner fırında 1700°C-2000°C arasındaki sıcaklıkta pişirilerek sinter manyezit üretilmektedir (DPT 2001; Kafas 2012).

Tesislerde üretilen sinter manyezit, on beş ayrı kalite çeşidinde olup düşük demir oksit içeriği ve yüksek yoğunluğu ile bazik refrakter üretiminde dünyaca tanınan bir üne sahiptir. KÜMAŞ, ürettiği manyezitin bir kısmını 1977 yılından beri Rusya, Almanya, Romanya, İtalya, Ukrayna, İran, Hindistan, İran, Mısır gibi ülkelere ihraç etmektedir. Türkiye'nin yıllara göre sinter manyezit ihtiyacı Çizelge 2.6'da verilmiştir.

Çizelge 2.6. Türkiye Sinter Mag. İhracatı (Devlet İstatistik Enstitüsü İthalat İhracat Raporları 1998)

Ülke Adı	1995	1996	1997	1998
ABD	60			
Almanya	16773	6016	1938	500
Avusturya	91461	65858	102795	77482
Belçika			21	
Bulgaristan			523	
Fransa		81		
Gafrika - Namib	120			
Hindistan	492			41
Hırvatistan		2650		
Hollanda	6000	6042	18500	15500
İngiltere	1040	2250		8
İran		1568	5003	3000
İspanya		3000	4500	8500
İsrail		246	4	
İtalya	1576	1227	5120	11550
Kanada	140	200	200	
Kazakistan			1	218 kg
Makedonya	180		59	20
Mısır			2120	80
Romanya	2500	1020	5526	5887
Bulgaristan			523	
Fransa		81		
Gafrika - Namib	120			
Hindistan	492			41
Hırvatistan		2650		
Hollanda	6000	6042	18500	15500
İngiltere	1040	2250		8
İran		1568	5003	3000
İspanya		3000	4500	8500
İsrail		246	4	
İtalya	1576	1227	5120	11550
Kanada	140	200	200	
Kazakistan			1	218 kg
Makedonya	180		59	20
Mısır			2120	80
Romanya	2500	1020	5526	5887
S. Arabistan		40	20	
Sırbistan		550		
Slovakya		40	1020	

Çizelge 2.6. (devam)

Suriye				2
Trakya Ser. Bölgesi		2700		
Türkmenistan			352 kg	
Ukrayna		3000	9085	7216
Toplam	120342	96488	156800	130000
S. Arabistan		40	20	
Sırbistan		550		
Slovakya		40	1020	
Suriye				2
Trakya Ser. Bölgesi		2700		

KÜMAŞ, 1996 yıllarının sonuna doğru, ilk defa Türkiye’de yerli sinter dolomit tuğla üretimini de gerçekleştirmiştir. Üretilen sinter dolomit reçine ve zift bağlı dolomit tuğla üretiminde kullanılmaktadır (Kafas 2012).

KÜMAŞ işletmelerine ait Eskişehir-Kütahya bölgesinde yer alan Turan ocağı ve Orta ocak manyezit yataklarının temeli Paleozoik döneme uzanır. Bu bölge yerleşme yaşı Üst Kretase-Paleosen olduğu düşünülen serpantinleşmiş peridotitlerle örtülüdür (DPT 2001; Kafas 2012).

Turan ocak ve Orta ocak manyezit yataklarının içerik ve rezerv değerleri aşağıdaki gibidir.

Turan ocak ve Orta ocak yataklarında %46.43 MgO ve %0.49 SiO₂ içerikli yaklaşık 4.5 milyon ton manyezit bulunur.

Bu ocaklarda tenör içeriği %40.14 MgO, %0.5 Fe₂O₃ ve ateş kaymı %50’dir.

Rezerv bakımından Orta ocak: görünür muhtemel rezerv 810.030 ton

Turan ocak: görünür muhtemel rezerv 497.058 ton

Bunların dışında kalan alanda toplam 3.182.000 ton olmak üzere toplam 4.489.938 ton muhtemel rezerv vardır. Bu bölgedeki ocakların büyük çoğunluğu KÜMAŞ tarafından işletilmektedir (MTA 1981).

2.13. Manyezitin Fiyatlandırılmasını Etkileyen Faktörler

2.13.1. Kimyasal bileşim

Manyezitin yapısında bulunan %CaCO₃, %SiO₂ ve Fe₂O₃ oranları fiyatlandırmayı etkileyen en önemli faktörlerdir. Manyezit madeni refrakter malzeme üretiminde kullanılabilmesi için;

Jel manyezitte ortalama olarak: max %1 SiO₂, max %1,5 CaO ve max %0,5 Fe₂O₃

Kristalli manyezitte: max %3 SiO₂, max %2,0 CaO ve max %6,0 Fe₂O₃

Şartları aranmaktadır. Aranan değerler ham jel manyezit ve ham kristalli manyezit için birbirinden farklıdır. Jel manyezitlere konulan spesifikasyonlar, nitelik olarak gerçekleştirilmesi daha zor şartlar içermektedir. Ayrıca ham jel manyezitler, ham kristalli manyezitlere göre elde edilen ürünlerin daha kaliteli olması ve maliyetinin nispeten daha düşük olması nedeniyle daha iyi fiyatlandırılırlar (Çetin 2010; Kafas 2012).

İstenen bu rakamsal değerler cevher zenginleştirme tekniklerinin gelişmesiyle değişebilmektedir. Bu oranların artması halinde ise cevher kullanılamaz hale gelir. Cevher yapısındaki kirleticilerin olumsuz etkileri kısaca özetlenecek olursa;

Silisin (SiO₂) etkisi: CaO içeriği yumuşama noktasını düşürürken Al₂O₃ yumuşama noktasına çok az etki eder. Cevher yapısındaki silis miktarının artması ise benzer etki

yaparak, tuğlanın erime noktasının düşmesine sebep olur. Böylece sıcaklık değişimlerine karşı tuğlanın mukavemeti azalır.

Demir oksidin (Fe_2O_3) etkisi: manyezitin iyi bir şekilde sinterleşmesi için %4-8 oranında demir oksit içermesi gerekmektedir. Bu oranın %2-3'e düşmesi halinde tuğlanın ani sıcaklık değişimlerine ve ateşe mukavemeti artar. Oranın %10 civarına yükselmesi ise tuğlanın erime noktasının 2000°C 'ye düşmesine neden olur. Demir oranı azaldıkça manyezitin sinterleşmesi güçleşir (Çetin 2010).

Kalsiyum oksidin (CaO) etkisi: Manyezit cevherinin içerdiği kalsiyum oksidin, bu cevherin refrakter tuğla üretiminde kullanılabilmesi için serbest halde tuğlaya geçmemesi gerekir. Bu durum kalsiyum oksit etkisine karşı tuğlanın mukavemetini azaltır (Çetin 2010).

2.13.2. CaO/SiO_2 Faktörü

CaO/SiO_2 oranının refrakterin davranışı üzerinde önemli bir etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Yani CaO ve SiO_2 oranlarında değişiklik olmasıyla oluşan bileşiğin cinside değişmektedir. Bu da refrakterin niteliğini etkiler. Genellikle CaO/SiO_2 oranının 2 dolaylarında tutulması istenir. Buna sebep olarak uygun orandaki cevher bileşiğinin 2130°C gibi yüksek ergime sıcaklığına sahip olması gösterilmektedir. Ayrıca bu oran cevherde ısıya dayanıklılığı azaltan bor mineralinin etkisini de azaltmaktadır. Bu nedenle CaO/SiO_2 oranı fiyatlandırmada en önemli kriterlerden biri olarak tanımlanır. Ayrıca bu oran varlığında oluşan Ca_2SiO_4 bileşiği de bağlayıcılık görevi yapmaktadır (Çetin 2010; Kafas 2012).

2.13.3. Dökme özgül ağırlık

Refrakter malzemenin fiziksel dayanıklılığı için dökme özgül ağırlık önemli bir faktördür. Fiyatlandırma sırasında bu değer $3,39 \text{ g/cm}^3$ 'ün üzerinde olması istenen bir durumdur (Çetin 2010; Kafas 2012).

2.13.4. Kristalin boyutu

Cevherdeki büyük kristal tane boyu MgO'nun cürufa karşı reaktivitesini azaltırken aşınma derecesini arttırmaktadır. Bu nedenle refrakter endüstrisinde kullanılan sinter manyezitte kristallerin mümkün olduğunca büyük fakat düzensiz bir dağılım içinde bulunması istenir. Bu durum fiyatlandırma yapılırken önem arz eder (Çetin 2010; Kafas 2012).

2.13.5. Magnezyum oksit (MgO) oranı

Refrakter malzeme endüstrisinde kullanılan sinter manyezitin ergime sıcaklığının 2800°C üstünde olması nedeniyle kimyasal yapı olarak MgO oranı sinter manyezitin yapısında bulunan SiO₂, Cao, Fe₂O₃ ve Al₂O₃ oranına bağlı olarak %92 ile %96 arasında değişir (Çetin 2010; Kafas 2012).

2.13.6. Bor oranı

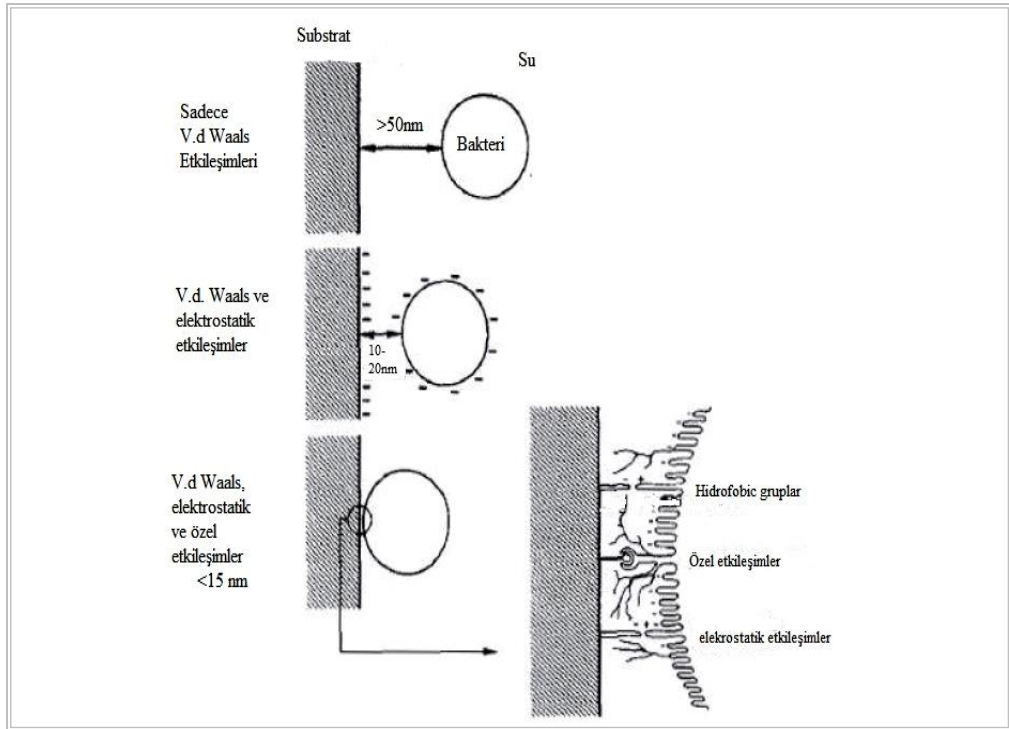
Deniz suyundan üretilen sinter manyezitte bor içeriği önemli bir problem teşkil eder. Doğal jel manyezit için bu geçerli değildir. Refrakter malzeme üretimi için istenen bor oranı %0,1 kabul edilir. Yasal uygulamada bu oranın altında veya üstündeki değerler için prim ve ceza uygulaması vardır (Çetin 2010; Kafas 2012).

2.14. Geleceğe Dönük Alternatif Bir Yaklaşım Olarak Biyoteknolojik Zenginleştirme Yöntemi ve Doğal Biyolojik Süreçler

Kayaçların üst yüzeylerinde biyofilm oluşturarak gelişen mikroorganizmalar çözünmeyi sağlarlar. Bakteriler fizikokimyasal nonspesifik etkileşimle ya da daha özel etkileşimlerle kayalara tutunurlar. En bilinen yüzey bileşeni olan adhesinler spesifik tutunmalarda etkilidirler. Nonspesifik tutunmada ise bakteri-mineral ve bakteri-çözelti ara yüzeyinin özellikleri etkilidir. Bu özellikler hücre yüzeyinin hidrofobiklik özelliği

ve elektrokinetik potansiyeline bağlıdır. Mikroorganizma kaynaklı mineral yüzey etkileşimi biyokütle üretimi amacıyla gerekli besinlerin eldesi için çözünme sürecinin katalizlenmesiyle doğrudan gerçekleşir. Ayrıca mikroorganizmalar tarafından salgılanan bazı metabolitlerin çözünmeyi teşvik etmesiyle de dolaylı çözünme gerçekleşir. Bu metabolitlerin pH'ı düşüren ligantları ve asit metabolitlerinin bulunduğu çözeltiyi modifiye eden katyonları içerdiği bilinmektedir (Lüttge and Conrad 2004; Sulu-Gambari 2011).

Mikroorganizmalar vasıtasıyla gerçekleştirilen bozunma işlemi üç ana basamağa ayrılır. Bu basamaklardan ilki bakterilerin yüzeyi tanınması ve bu yüzeye bağlanması, ikincisi kolonizasyon yani yüzeye tutunan mikroorganizmaların mineralleri kullanarak koloni oluşturması, sonuncusu ise biyofilm oluşturarak mineral yüzeyinin çözünmesidir (Lüttge and Conrad 2004; Sulu-Gambari 2011) (Şekil 2.8)



Şekil 2.8. Bakterilerin katı yüzeylere yapışma basamakları (Lüttge and Conrad 2004; Sulu-Gambari 2011).

Mikrobiyal biyofilmler, komminütlerinin ekosistem içinde buldukları yüzeye etkileşimleri sonucu oluşan kompleks ve dinamik yapılardır. Bu yapılar planktonik benzerlerinden ekstrasellüler polimer maddeleri ve matrikslerinin varlığıyla ayrılırlar. Ekstrasellüler polimer maddeler (EPS) biyofilmlerin ana bileşenidir (De Beer and Stoodley 2006). EPS'ler biyofilmlerin fiziksel ve fizyolojik özelliklerini belirleyen, yapının oluşumuna katkıda bulunan, bir yüzeye tutunma ve bu yüzeyden ayrılma, mekanik dayanıklılık ve antibiyotik dirençliliğini etkileyen yapılardır (Barker *et al.* 1997; De Beer and Stoodley 2006).

Biyofilm oluşumu substratın morfolojisi, yüzey yükü, hidrofobitesi, ara yüzey karakteristikleri ve solüsyon kimyası gibi birçok fiziksel ve çevresel şarta bağlıdır (Liermann *et al.* 2000).

Bu ilkeler çerçevesinde çoğu mikroorganizma biyoteknolojik zenginleştirme çalışmalarında kullanılmıştır ve çözünme araştırmalarının birçoğunda mikroorganizma seçimi yapışacağı yüzeyin ve mineralin tipine göre gerçekleştirilmiştir. Mikroorganizmalar salgıladıkları metabolitlerle mineralin veya mineralin bulunduğu yüzeyin kimyasını değiştirerek çözünmeyi hızlandırırlar (Barker *et al.* 1998). Yeryüzü katmanlarında ve yüzeyinde en fazla bulunan mineraller silikatlar olduğu için bu durum biyolojik çözünme çalışmalarında da en çok araştırılan minerallerin silikatlar olmasını kaçınılmaz kılmıştır. Dünya literatürlerine göre bu alanda silikatlar üzerine yapılan çalışmaları karbonat çözünmesi çalışmaları izlemektedir. (Barker *et al.* 1998; Vandevivere *et al.* 1994).

2.15. Biyoliç

Tabiatta var olan belli mikroorganizmalar kullanılarak doğal yöntemlerle mineral kaynaklardan metallerin çözünme prosesine biyoliç denir (Brand 2001; Kocadağıstan 2007). Biyoliç yöntemi doğada kolayca bulunabilen su, hava ve mikroorganizmalar kullanılarak sülfürlü cevherlerden veya bunların konsantrelerinden metallerin uzaklaştırılması işlemidir (Gilbertson 2000). Ayrıca mineral konsantreleri ve düşük

tenörlü cevherlerden metal ekstraksiyonu için basit ve bir o kadar da etkili bir yöntemdir (Bosecker 1997; Billiton 2000; Nemati and Harison 2000; Sand *et al.* 2001; Kocadağıstan 2007). Biyoliç işlemleri normal basınç altında, 5-90°C sıcaklık aralığında mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilir (Akçıl ve Çiftçi 2003).

Biyoliç prosesinin; her kalitedeki cevher ve atık malzemeye uygulanabilir oluşu, daha az sermaye gerektirmesi, doğada var olan su, hava ve mikroorganizma gibi bileşikleri kullanması, CO₂ ve SO₂ emisyonu oluşturmaması ve böylece çevre dostu oluşu, atmosfer basıncında ve ortam sıcaklığında basit ve ekonomik bir şekilde işletilebilmesi gibi birçok avantajları vardır (Lundgren *et al.* 1986; Brombacher *et al.* 1997; Billiton 2000; Sertkaya 2007).

Dünya literatürlerinde biyoliç mekanizmasında etkili olan birçok mikroorganizmanın varlığı tespit edilmiştir. Bu mikroorganizmalar genellikle prokaryotik, zorunlu kemolitotrof ve aerobiktirler. Biyoliç prosesinde en çok kullanılan mikroorganizmalara *Aspergillus*, *Thiobacillus*, *Sulfobacillus*, *Leptospirillum* türleri örnek olarak verilebilir (Holt *et al.* 1994; Bosecker 1997; Das *et al.* 1999; Norris *et al.* 2000; Schuster 2002; Magnuson *et al.* 2003).

2.16. Biyomineralizasyon

Mikroorganizmaların buldukları çevredeki metaller ve minerallerle girdikleri fiziksel ve kimyasal etkileşimler sonucu biyomineralizasyon oluşur. Bu etkileşimler mikroorganizmaların hayatta kalmaları, büyümeleri ve çeşitli aktivitelerini sürdürebilmeleri için temel gereksinimlerini karşılarlar. Ayrıca birçok mineral türü temelde, mikroorganizmalarla etkileşime girme yetenekleri bakımından biyojeniktir. Bu tür biyominerallerin oluşumu diatomlar ve foraminiferler gibi gruplara hücresel yapı sağladığından hem jeolojik hem de endüstriyel açıdan büyük önem teşkil ederler (Gadd and Raven 2010).

Biyomineralizasyon, fosfatlar, karbonatlar, oksitler ve silikatlar gibi minerallerle ve bu mineralleri içeren ekonomik değeri olan madenlerle ilgili bir jeomikrobiyolojik oluşumdur (Gadd and Raven 2010).

2.17. Maden Zenginleştirmede Kullanılabilecek Mikroorganizmaların Tanılanması ve Moleküler Karakterizasyonuna Yönelik Yaklaşımlar

Mikroorganizma izolasyonu odaklı diğer tüm biyoteknoloji uygulamalarında olduğu gibi maden zenginleştirme araştırmalarında da mikroorganizmaların tanılanması ve moleküler karakterizasyonun yapılması aşamaları başarılı uygulamalar geliştirebilmenin en temel unsurlarını oluşturur. Bu alanda eksiksiz bir biyoteknolojik sürecin tasarlanması ancak bu mikroorganizmaların en iyi şekilde tanınması ve ilgili optimizasyonların hedef mikroorganizma ile cevher arasındaki ilişki uyumunu en üst düzeye çıkarmasıyla mümkün olmaktadır.

Maden zenginleştirmede kullanılabilecek mikroorganizmaların tanılanması ve moleküler karakterizasyonuna yönelik yaklaşımların en başında farklı kaynaklardan izole edilen mikroorganizmaların benzerlerinden kabaca ayırt edilmesini ve mikroorganizmaların kimlikleri hakkında öncü bilgilerin elde edilmesini sağlayan klasik yöntemler gelmektedir. Bu yöntemler genellikle mikroorganizmaların şekil ve boyut açısından hücre morfolojilerinin incelenmesi, koloni morfolojilerinin incelenmesi, Gram özellikleri, endospor oluşturma yetenekleri, optimum büyüme sıcaklıklarının, pH aralıklarının ve gereksinim duyulan oksijen miktarlarının belirlenmesi gibi testleri kapsamaktadır. Özellikle funguslar ile gerçekleştirilen çalışmalara hücre, misel ve hif yapılarının incelenmesini, eşeyli-eşeysiz üreme yapılarının gözlemlenmesini ve sınıflandırılmasını da kapsayan benzer testler ilave edilmektedir.

Klasik testleri destekleyici nitelikteki biyokimyasal testlerin kullanılmasının ise maden zenginleştirmede kullanılabilecek mikroorganizmaların, özellikle de bakterilerin tanılanmasına yönelik en önemli ikinci adımı oluşturmaktadır. Konuyla ilgili literatürlerde özellikle bu amaçla mikroorganizmaların katalaz, oksidaz, amilaz gibi

enzimleri üretebilme yeteneklerinin araştırılması için yapılan çeşitli aktivite testleri ve nitrat ya da nitrit redüksiyon testlerinin yapılmasının gerekliliğine dikkat çekilmektedir.

Maden zenginleştirmede kullanılacak mikroorganizmaların tanılanmasında klasik ve biyokimyasal yöntemlerin bulgularıyla birlikte nihai sonucu verebilecek yöntemler ise özellikle DNA izolasyonu çalışmalarının, PCR uygulamalarının ve sekans analizlerinin de dahil olduğu moleküler karakterizasyon başlığı altında toplanmaktadır. Bu alanda kullanılan temel tekniklere genomik parmak izi analizleri (Randomly Amplified Polimorphic Detection=RAPD, Restriction Fragment Length Polymorphism=RFLP, Repetitive Extragenic Palindromic=REP-PCR, Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus=ERIC-PCR, Ribozomal DNA=rDNA-PCR, BOX-PCR, Spesifik PCR vb.), mikroorganizmaların yağ asiti profillerinin belirlenmesine dayalı fenotipik yöntemler (Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi=MIDI), çeşitli serolojik testler (Aglütinasyon, Immunofluorescence, Dot Immunobinding Assay, Immuno Blot, Radioimmunoassay ve Enzim-Linked Immunosorbent Assay=ELISA) ve kantitatif DNA hibridizasyonu örnek olarak verilebilir (Eerola 1988; Zhang and Geider 1997; Mosivand *et al.* 2009).

Yine bu konuyla ilgili güncel literatür kaynaklarında, prokaryotik mikroorganizmalar olan bakterilerin tanılanması için özellikle 16S rRNA/rDNA bölgelerinin, ökaryotik mikroorganizmalar olan fungusların tanılanmasında ise 18S rRNA/rDNA bölgelerinin universal primerler kullanılarak çoğaltılması ve elde edilen PCR ürününün sekans analizinin yapılarak değerlendirilmesine dayanan moleküler yaklaşımların oldukça yaygın bir biçimde kullanıldığı görülmektedir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Manyezit Madeni Örneklerinin Alınması

Bu çalışmada, Kütahya sınırları içerisindeki Turan ocağı ve Orta ocak Manyezit Maden Ocağı'ndan örnekler (topraklı, topraksız, büyük, küçük maden örnekleri) alınmış ve steril tüpler içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Bakteri izolasyon çalışması yapılmaya kadar buzdolabında (+4°C) muhafaza edilmiştir.

3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar

Çalışma esnasında aşağıdaki alet ve cihazlar kullanılmıştır:

İnkübatör (Binder BD53, GERMANY)

Otoklav (HMC Hirayama Hiclava HV-50L, JAPAN)

Mikroskop (Boeco BM 180, GERMANY)

Steril Kabin (Esco AC2-4E1, SINGAPORE)

Çalkalayıcı (Zhicheng ZHWY-200B, CHINA)

Magnetik Karıştırıcı (Daihan Scientific MSH 20A, KOREA)

pH Metre (InoLab pH730 wtw Series, GERMANY)

Derin Dondurucu (Nuaire -86 Ultralow Freezer, NU6613W37, U. S. A.)

Buzdolabı (Beko BK9470, TÜRKİYE)

Su Banyosu (Memmert WNB14, GERMANY)

Mikrodalga Fırın (Beko MD1505, TÜRKİYE)

Saf Su Cihazı (GFL 2004, GERMANY)

Hassas Terazı (Mettler Toledo AL204, CHINA)

Dikey Tüp Karıştırıcı (GFL 3025, GERMANY)

Buz Makinesi (Scotsman AC45, ITALY)

Santrifüj (Hettich Mikro 22R, GERMANY)

Vorteks (Heidolph Reax Top, GERMANY)

Mikrobiyal Tanılama Sistemi (MIDI, Inc., Newark, GERMANY)
 PCR (Corbett Research CG1-96, AUSTRALIA)
 Elektroforez Tankı (Yatay) (OWL B2, U.S.A.)
 Elektroforez Akım Sağlayıcı (OWL OSP300-2Q, U.S.A.)
 Jel Görüntüleme Sistemi (DNR BioImaging Systems MiniBis Pro, ISRAEL)

3.1.2. Kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı

Araştırma süresince kullanılan çözeltilerin ve besiyerlerinin hazırlanış şekilleri aşağıdaki gibidir:

%0,85'lik NaCl çözeltisi: 8,5 mg NaCl 1 L saf suda çözülerek otoklavda steril edildi (Bozoğlu 2014).

Nutrient broth (NB): 13 g nutrient broth içeriği (Oxoid) 1 L saf su içerisine eklendi. Besiyeri otoklavda steril edildi (Harley and Prescott 2002; Orhan 2013).

Trypticase soy broth (TSB): 30 g trypticase soy agar karışımı (Oxoid) 1 L saf su içerisine ilave edildi. Besiyeri otoklavda steril edildi (Bozoğlu 2014).

Potato Dextrose Agar (PDA): 39 g potato dextrose agar karışımı (Oxoid) 1 L saf su içerisine ilave edildi. Besiyeri otoklavda steril edildi.

Nutrient agar (NA): 28 g nutrient agar karışımı (Oxoid) 1 L saf su içerisine ilave edildi. Besiyeri otoklavda steril edildi. 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakıldı (Harley and Prescott 2002; Orhan 2013)

Trypticase soy agar (TSA): 40 g trypticase soy agar karışımı (Oxoid) 1 L saf su içerisine ilave edildi. Besiyeri otoklavda steril edildi. 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakıldı (Bozoğlu 2014).

Yeast Extract Calcium Carbonate agar (YDC- agar): 5 g maya ekstrakt, 10 g glikoz, 6 g CaCO₃ ve 10 g agar karışımı 500 ml saf su içerisinde çözülerek, besiyeri otoklavda steril edildi. 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere döküldü ve katılaşmaya bırakıldı (Lelliott and Stead 1987; Yanmış 2014).

Magnesium Carbonate agar: 5 g maya ekstrakt, 10 g glikoz, 6 g MgCO₃ ve 10 g agar karışımı 500 ml saf su içerisinde çözülerek, besiyeri otoklavda steril edildi. 45-50°C'ye

kadar soğutulduktan sonra steril petrilere döküldü ve katılaşmaya bırakıldı. Bu besiyeri YDC-agardan modifiye edilmiştir (Lelliott and Stead 1987; Yanmış 2014).

Nutrient strach agar (NAS): 23 g nutrient agar (Difco) ve 10 g %1'lik nişasta 1 L saf su içerisine konularak otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi. Sterilizasyon sonrasında 45-50°C'ye kadar soğutulan besiyeri steril petrilere dökülerek ve katılaşması sağlandı (Bal 2012).

Nutrient broth + agar (yarı katı nutrient agar): 13 g nutrient broth'a (Oxoid) 6 g agar (Difco) aktılarak 1 L saf su içerisine eklendi. Besiyeri otoklavda steril edildi. 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril deney tüplerine alınarak katılaşmaya bırakıldı (Harley and Prescott 2002; Orhan 2013)

LB Agar: 35 g LB agar (Sigma) tartılarak 1 L saf su içerisinde çözüldü. pH'sı 7,4'e ayarlandıktan sonra otoklavlanarak steril edildi. 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere döküldü ve katılaşmaya bırakıldı (Bozoğlu 2014).

LB Brouth: 20 g LB broth (Sigma) tartılarak 1 L saf su içerisinde çözüldü. pH'sı 7,4'e ayarlandıktan sonra otoklavlanarak steril edildi. Sıvı besiyeri oda ısısında bekletildi (Bozoğlu 2014).

Stok Besiyeri: 0,65 g nutrient broth karışımına 36 ml gliserol eklendikten sonra son hacim saf su ile 100ml'ye tamamlandı. Magnetik karıştırıcıda karıştırılan besiyeri, otoklavda steril edildi. Aseptik olarak steril 2 ml'lik ependorf tüplerine 1,2 ml konularak hazırlandı (Bozoğlu 2014).

%3'lük KOH çözeltisi: 3 g KOH 100 ml steril saf su içerisinde çözülerek hazırlandı (Bozoğlu 2014).

Kristal violet: 2 g kristal violet, 20 ml %95'lik etil alkolde çözüldü ve son hacim steril saf su ile 100 ml'ye tamamlandı. Amber şişe içinde buzdolabında muhafaza edildi (Harley and Prescott 2002; Bozoğlu 2014).

Lugol solüsyonu: 1 g iyot ve 0,5 g KI tartıldı, toplam hacim steril saf su ile 100 ml'ye tamamlandı. Amber şişe içinde buzdolabında muhafaza edildi (Harley and Prescott 2002; Bozoğlu 2014).

Safranin: 1 g safranin, 10 ml %95'lik etil alkolde çözüldü ve son hacim steril saf su ile 100 ml'ye tamamlandı. Amber şişe içinde buzdolabında muhafaza edildi (Harley and Prescott 2002; Bozoğlu 2014).

Malaşit yeşili: 5 g malaşit yeşili, 100 ml steril saf su içinde çözülerek hazırlandı ve amber şişe içerisinde buzdolabında muhafaza edildi (Harley and Prescott 2002; Bozoğlu 2014).

%5'lik H₂O₂ çözeltisi: 17 ml %30'luk H₂O₂'in hacmi steril saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı (Harley and Prescott 2002; Bozoğlu 2014).

STE (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH: 8) çözeltisi: 1,21 g Tris, 1,75 g NaCl ve 3,72 g EDTA saf su içerisinde çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 8 olana kadar titre edildi. Toplam hacim 200 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavda steril edildi (Harley and Prescott 2002; Bozoğlu 2014).

Liziz Buffer: 1,36 g Tris-HCl, 0,422 g EDTA 910 ml saf suda çözüldükten sonra pH'sı 8'e ayarlanır. pH ayarlaması yapıldıktan sonra üzerine 0,664 g NaCl eklenir ve hacim 1000 ml'ye tamamlanır ve otoklavda steril edilir. Otoklavdan çıkartıldıktan sonra 250 ml %10'luk SDS ve 22,7 ml Triton X 100 eklenir.

Promega Nuklei Lysis solüsyonu: Hazır kit kullanılmıştır (Sigma).

Promega Protein Precipitation Solüsyonu: Hazır kit kullanılmıştır (Sigma).

Promega Rehidrasyon Solüsyonu: Hazır kit kullanılmıştır (Sigma).

TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH: 8) tamponu: 0,3 g Tris-HCl ve 0,093 g EDTA saf su içerisinde çözüldü ve pH 8'e ayarlandı. Son hacim 250 ml'ye tamamlanarak otoklavda steril edildi (Orhan 2014).

5 M NaCl çözeltisi: 29,22 g NaCl'ün 100 ml saf su içerisinde çözülmesiyle hazırlanarak otoklavda steril edildi (Harley and Prescott 2002; Bozoğlu 2014).

1XTE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH: 8) çözeltisi: 0,24 g Tris ve 0,074 g EDTA saf su içerisinde çözüldü ve pH'sı 8 e ayarlandı. Son hacim 200 ml'ye tamamlanarak otoklavda steril edildi (Harley and Prescott 2002; Bozoğlu 2014).

%10 luk SDS çözeltisi: 10 g SDS'nin 100 ml saf su içerisinde çözünmesiyle hazırlandı. Çözelti otoklavda steril edildi ve ağzı iyice kapatılarak, oda sıcaklığında muhafaza edildi (Harley and Prescott 2002; Bozoğlu 2014).

Dimetil sülfoksit (DMSO): %100'lük DMSO (Sigma) 2ml'lik eppendorf tüplere aktararak, kullanılmaya kadar -20°C'de muhafaza edildi (Harley and Prescott 2002; Bozoğlu 2014).

%10 CTAB (Hexadecyl trimetil-ammonium bromide)-0,7 M NaCl çözeltisi: 80 ml saf su içerisinde önce 4,09 g NaCl çözüldü. NaCl tamamen çözüldükten sonra karışıma 10 g CTAB ilave edilerek çözünmesi sağlandı. Toplam hacim 100 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavda steril edilerek, oda sıcaklığında muhafaza edildi (Harley and Prescott 2002; Bozoğlu 2014).

Fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) çözeltisi: 25 ml fenol, 24 ml kloroform ve 1 ml izoamilalkol karıştırılarak hazırlandı. -20°C'de muhafaza edildi (Harley and Prescott 2002; Bozoğlu 2014).

Kloroform: izoamilalkol (24:1) çözeltisi: 24 ml kloroform ve 1 ml izoamilalkol karıştırılarak hazırlandı. -20°C'de muhafaza edildi (Harley and Prescott 2002; Bozoğlu 2014).

%70'lik Etil alkol: 70 ml saf etil alkolün hacmi steril distile su ile 100 ml ye tamamlandı. -20°C'de muhafaza edildi (Harley and Prescott 2002; Bozoğlu 2014).

Proteinaz K: 1 ml steril distile su içerisinde 20 mg proteinaz K olacak şekilde hazırlandı. -20°C'de muhafaza edildi (Harley and Prescott 2002; Bozoğlu 2014).

Bovine serum albumin: 1 ml steril distile su içerisinde 20 mg bovine serum albumin olacak şekilde hazırlandı. -20°C'de muhafaza edildi (Harley and Prescott 2002; Bozoğlu 2014).

5XTBE Tamponu (pH: 8): 54 g Tris, 27,5 g borik asit, 20 ml 0,5 M EDTA 500 ml steril distile su içerisinde çözüldükten sonra karışımın pH'sı 8'e ayarlandı ve toplam hacim steril distile su ile 1 L'ye tamamlandı (Harley and Prescott 2002; Bozoğlu 2014).

5XTAE Tamponu (pH: 8): 24,2 g Tris, 5,71 ml glacial asetik asit, 10ml 0,5 M EDTA, 500 ml steril distile su içerisinde homojenize edildikten sonra karışımın pH'sı 8 e ayarlandı ve toplam hacim steril distile su ile 1 L'ye tamamlandı (Harley and Prescott 2002; Bozoğlu 2014).

0,5XTBE Tamponu: 100 ml 5xTBE'nin hacmi steril distile su ile 1 L'ye tamamlanarak hazırlandı (Harley and Prescott 2002; Bozoğlu 2014).

0,5XTAE Tamponu: 100 ml 5xTAE'nin hacmi steril distile su ile 1 L'ye tamamlanarak hazırlandı (Harley and Prescott 2002; Bozoğlu 2014).

Ethidium bromür çözeltisi: 100 ml distile su içerisinde 1 g ethidium bromür (10 mg/ml) magnetik karıştırıcı kullanılarak iyice çözüldü ve amber şişe içinde, oda sıcaklığında muhafaza edildi (Harley and Prescott 2002; Bozoğlu 2014).

6X yükleme tamponu: 100 ml için %100'lük gliserolden 40 ml alınıp, 0,1 g bromfenol blue ile karıştırıldı ve hacmi 1x TBE ile 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti otoklavda steril edildikten sonra +4°C de muhafaza edildi (Harley and Prescott 2002; Bozoğlu 2014).

Primer çalışma konsantrasyonu: Ticari olarak liyofilize halde alınan primerleri (nmol)/0,1 (100 µM/ml) çözmek için katalog bilgileri dahilinde gerekli olan 1XTE buffer miktarı belirlenmiş ve 100 µM/ml'lik stok hazırlanmıştır. Buradan da $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ formülü kullanılarak, 5 µM/ml lik primer çalışma solüsyonu hazırlanmış ve PCR çalışmasında kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir (Barış 2009).

3.2. Yöntem

3.2.1. Manyezit madeni mikroflorasından bakterilerin izolasyonu ve muhafazası

Uygun ortamlardan alınan örnekler, 1 ml veya 1 g şeklinde hazırlanarak, 9 ml steril %0,9'lük fizyolojik su içerisinde yaklaşık 1-2 saat çalkalanarak homojenize edilmiş, bir seri dilüsyon (10^{-4} 'e kadarlık dilüsyon serisi) hazırlanmıştır. Bu dilüsyonların her birinden iki paralel olmak üzere, flora mikroorganizmaların izolasyonu için, TSA ve NA besiyerlerine yayma ekim yapılarak, 32°C'de bir hafta süreyle etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi içerisindeki 1, 3, 5 ve 7. günlerinde, petri plaklarında gözlemlenen farklı kolonilerin saf kültürleri elde edilmiştir. Her bakterinin 24-48 saatlik saf kültüründen, bir öze dolusu alınarak içerisinde %18 gliserol ve nutrient broth bulunan ependorf tüplere 500'er µl aktarılmış ve karışım vortekslenmiştir. Elde edilen bu stok kültürler kodlanmış (NSH1-NSH60) ve daha sonraki karakterizasyon işlemlerinde kullanılıncaya kadar -86°C'de saklanmıştır.

3.2.2. Bakteri İzolatlarının CaCO₃ üzerine çözücü özelliklerinin araştırılması

Elde edilen saf izolatların CaCO₃'ı çözmeye etkili olup olmadıkları araştırılmıştır. Her bir bakteri izolatu YDC-agar besiyerine (Jabeen *et al.* 2012) ekilerek iki hafta süresince inkübasyona bırakılmış ve besiyerinde şeffaflaşan zon oluşumu gözlemlenmiştir.

3.2.3. Bakteri İzolatlarının MgCO₃ üzerine çözücü özelliklerinin araştırılması

Elde edilen saf izolatların MgCO₃'ı çözmeye etkili olup olmadıkları araştırılmıştır. Her bir bakteri izolatu MgCO₃ içeren katı besiyerine ekilerek iki hafta süresince inkübasyona bırakılmış ve besiyerinde zon oluşumu gözlemlenmiştir

3.2.4. Bakteri İzolatların bazı morfolojik özelliklerinin belirlenmesi

3.2.4.a. Hücre morfolojisi

Saflaştırılan bakteriler çizgi ekimle NA besiyerine ekilmiş, 30°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 24-48 saatlik bakteri kültürlerinden öze ile alınan hücreler, lam üzerine ilave edilen bir damla sdH₂O içerisine aktararak lam yüzeyine homojen bir şekilde iyice yayılmış, havada kuruması için bir süre bekletilmiştir (Smear hazırlanmıştır). Aynı preparat kuruduktan sonra lamın alt yüzü alevden geçirilmek suretiyle bakteriler tespit edilmiştir. Preparat kristal viyole ile basit boyama yapılarak (1-2 dk) bir süre bekletilmiştir. Süre sonunda hücre yapıları (yuvarlak, çubuk veya spiral) mikroskop altında bakılarak kaydedilmiştir (Harley and Prescott 2002; Bozoğlu 2014).

3.2.4.b. Hücre boyutlarının belirlenmesi

Nutrient agar besiyerine ekilen bakteri kültürlerinden inkübasyon süresi sonrasında hazırlanan preparatlar basit boyama işlemi yapıldıktan sonra mikroskop altında

immersiyon objektifinde gözlemlenmiş ve izolatların hücre boyutları oküler mikrometre yardımı ile hesaplanmıştır (Barış 2008; Özkan 2009).

3.2.4.c. Gram reaksiyon testi

Bu test ile bakteri hücre duvarlarındaki farklılığın belirlenmesi gerçekleştirilmekte ve bu amaç ile 2 farklı yöntem kullanılmaktadır. Bu çalışmada izolatların Gram özelliklerini belirlemek amacı ile her iki yöntem de kullanılmıştır (Harley and Prescott; Özkan 2009).

Bu yöntemlerden birincisi ve yaygın olarak kullanılanı; temiz bir lam üzerinde, genç bakteri kültüründen hazırlanan smear, kristal violet ile 1 dakika boyanır. Bu boya hücreye nüfus etmesiyle hem Gram (+) hem de Gram (-) bakteriler mor renkli boyanır. Sürenin sonunda fazla boya hafif su akımı ile uzaklaştırılır. Preparatın üzerine lügol eklenir ve 1 dakika bekletilir. Lügol bu aşamada mordan olarak kullanılır. Lügol uygulanan preparat %96'lık etil alkol ile dikkatlice yıkanır. Alkol ile yıkama sonrası Gram (+) bakteriler peptidoglikan tabakalarının kalın olması nedeniyle kristal violet-lügol kompleksini bırakmaz ve mor renkli kalırken, Gram (-) bakterilerin dış membranları bozulur ve ince peptidoglikan tabakaları boyayı tutamadığı için rensizleşir. Yıkama işlemi sonrasında saf sudan geçirilen preparat safranin ile 20 saniye boyanır. Boyama süresi sonunda hafif su akımı ile yıkanan preparat kurutularak, immersiyon objektifinde inceleme yapılır. Mor renk Gram (+), pembe-kırmızı renk Gram (-) olarak değerlendirilir (Harley and Prescott 2002; Özkan 2009; Acar 2009).

Bu metodlardan ikincisi ise; Gram (-) bakterilerin %3 KOH ile muamelesi sonucu, hücre duvarının parçalanması ile sitoplazma ve nükleer materyalin açığa çıkması nedeniyle bir viskoz yapının oluşması esasına dayanır. Lam üzerine damlatılan %3'lük potasyum hidroksit solüsyonu üzerine NA'da geliştirilen 24-48 saatlik bakteri kültüründen alınan bir öze dolusu bakteri KOH solüsyonu ile 5-10 saniye karıştırıldıktan sonra öze yukarıya doğru kaldırılır. Karışımda sakız gibi bir uzamanın

olması KOH pozitif, olmaması ise KOH negatif olarak değerlendirilmiştir (Farrab and Rebolı 2006; Saygılı vd 2006).

3.2.4.d. Endospor varlığının ve hücre içindeki yerinin belirlenmesi

Endospor varlığını belirlemek için test edilecek olan izolatlar, NA besiyerine ekilmiş, endospor oluşumuna neden olan stres şartlarında (sıcak-soğuk, yaşlanma, kuruma) bekletilmiştir. Bu kültürlerden incelemek için smear hazırlanmış ve hazırlanan smear kaynayan su banyosu üzerine yerleştirilmiştir. Preparatın üzeri malaşit yeşili ile tamamen boyanmış, üzerine kurutma kağıdı koyulmuştur. Kurutma kağıdının sürekli olarak ıslak kalması sağlanarak 5-7 dakika malaşit yeşili ile boyama devam ettirilmiştir. Süre sonunda preparatın üzerindeki kurutma kağıdı kaldırılıp preparat hafif su akımı ile yıkanarak fazla boya uzaklaştırılmıştır. Preparat safranin ile 20-30 sn. kadar boyanmıştır. Bu karşıt boya uygulamasından sonra preparat hafif su akımı ile tekrar yıkanıp kurutulmuş ve immersiyon objektifinde endospor durumları incelenmiştir (Harley and Prescott 2002; Adıgüzel 2006).

3.2.4.e. Hareketlilik testi

İzolatlar NB + %0,6 agar içeren tüplere iğne öze yardımıyla ekilerek bir gün inkübe edilmiştir. Tüplerde oluşan ekim çizgisine göre gelişim gözlemlenerek hareketlilik durumu incelenmiştir (Arda 2000; Temiz 2000; Barış 2008).

3.2.4.f. Kültür özelliklerinin belirlenmesi

Bakteri izolatlarının kültürel özelliklerini incelemek için bunların katı ve sıvı ortamlardaki saf kültürleri kullanılmıştır.

Katı kültür özelliklerinin belirlenmesi için izolatlar geliştikleri katı besiyerlerine 3-4 faz çizgi ekim şeklinde ekilmiş, inkübasyona bırakılarak koloni meydana getirmeleri

beklenmiştir. Oluşan koloniler, mikroskopla incelenerek üstten görünüşleri, yüksekliği, kenar şekilleri ve rengi tespit edilmiştir (Temiz 2000; Barış 2008; Özkan 2009).

Bakteriler sıvı besiyerlerinde ise üstte pelikül, dipte tortu, veya ipliksi bir üreme gösterebilmektedir. Sıvı kültür özelliklerinin belirlenmesinde izolatlar nutrient broth içeren sıvı besiyerlerine inoküle edilmiş ve 24 saat boyunca gelişmeleri sağlanarak sıvı besiyerlerinde kültür özellikleri tespit edilmiştir (Arda 2000; Barış 2008).

3.2.5. Bakteri İzolatların bazı fizyolojik özelliklerinin belirlenmesi

3.2.5.a. Bakteri İzolatların tuz toleranslarının belirlenmesi

Bakteri izolatlarının tuz toleranslarının belirlenmesinde %10, 15 ve 20 NaCl içeren nutrient broth besiyerleri kullanılmıştır. İzolatlar bu besi ortamına inoküle edilmiş ve 28°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 48 saat inkübasyon süresi sonunda spektrofotometrede OD₆₀₀ de yapılan ölçümlerle izolatların tuz toleransları belirlenmiştir (Ventosa *et al.* 1982).

3.2.5.b. Bakteri İzolatların gelişme sıcaklıklarının belirlenmesi

Bakteri izolatlarının büyüme sıcaklıklarının belirlenmesinde nutrient broth besiyerleri kullanılmıştır. İzolatlar bu besiyerlerine inoküle edilmiş ve farklı sıcaklıklarda inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat inkübasyon süresi sonunda spektrofotometrede OD₆₀₀'de yapılan ölçümler sonucunda izolatların maksimum, minimum ve optimum büyüme sıcaklıkları belirlenmiştir (Harley and Prescott 2002; Barış 2008).

3.2.5.c. Bakteri İzolatlarının gelişebildikleri pH aralıklarının belirlenmesi

İzolatların gelişebildikleri pH aralığının belirlenmesinde; farklı pH değerlerine (4; 5; 6; 7; 8; 9) sahip nutrient broth besiyerleri kullanılmıştır. İzolatlar NB besiyerlerine inoküle

edilmiş, inkübasyon sonrasında spektrofotometrede (OD_{600} 'de) yapılan ölçümler sonucunda izolatların büyüebildikleri maksimum ve minimum pH aralıkları tespit edilmiştir (Dülger 1997).

3.2.6. Bakteri İzolatların bazı biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi.

3.2.6.a. Katalaz testi

Elde edilen bakteri izolatlarının katalaz enzimine sahip olup olmadıkları bu test ile belirlenmiştir. Bu enzim elektron transfer zincirinin sonunda açığa çıkan hidrojen peroksit (H_2O_2)'i parçalayıp H_2O ve O_2 gazına dönüştür ve O_2 gazının oluşumu kabarcıklar şeklinde gözlenebilir. Aerobik solunum yapan veya fakültatif olan mikroorganizmalarda bu enzim vardır. Bundan dolayı NA'da geliştirilen 24-48 saatlik bakteri kültüründen bir öze dolusu alınarak lam üzerine konulmuş ve üzerine bir damla %5'lik H_2O_2 damlatılmıştır. Kabarcık oluşumu katalaz pozitif; oluşmaması ise katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Arda 2000; Harley and Prescott 2002).

3.2.6.b. Amilaz testi

Bu test, bakterilerin nişasta molekülünü parçalayarak amilaz enzimini içerip içermediklerini tespit etmek için gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bakteriler NAS besiyerine nokta ve/veya çizgi ekim yöntemi ile inoküle edilmiştir. 2-7 günlük inkübasyon süresinin sonunda petrideki bakteri kolonisinin etrafında görülen renk değişimi (daha açık renk) amilaz pozitif olarak, renk değişiminin olmaması ise amilaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Harley and Prescott 2002; Adıgüzel 2006).

3.2.7. Bakteri İzolatların bazı hidrolitik özelliklerinin belirlenmesi

3.2.7.a. Jelatin hidrolizi

Bu test yardımı ile mikroorganizmaların bir protein türü olan jelatini büyümek için tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanma yeteneklerini görmekteyiz. Nutrient agarda geliştirilen 24-48 saatlik bakteri kültürlerinden steril iğne öze ile tek bir koloni alınarak, 5mL jelatin agar besi ortamı içeren tüplere ekim yapılarak 28°C’de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. 5 günlük inkübasyondan sonra tüplerde meydana gelen şeffaflaşma jelatinaz enziminin bir göstergesi olduğundan pozitif, herhangi bir değişimin olmaması ise mikroorganizmanın jelatinaz enzimine sahip olmadığını gösterdiğinden negatif sonuç olarak değerlendirmiştir (Gerhardt *et al* 1994).

3.2.8. Moleküler Testler

3.2.8.a. Tanılanacak bakterilerin standart besiyerinde (TSA) geliştirilmesi

Stoğa alınmış olan kültürlerden steril platin bir öze TSA katı besi yerine 4 fazlı çizgi ekim yapılmış, petriyerler 30°C’ye ayarlı inkübatörde 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.8.b. Bakteri İzolatlarının bazı genetiksel özelliklerinin belirlenmesi

1. Bakteri hücrelerinden genomik DNA’ların izolasyonu

Araştırmada kullanılacak olan bakteri izolatlarından DNA ekstraksiyonu aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

DNA’sı izole edilecek olan bakteriler NA besiyerine 3 faz halinde ekilerek petriyerler 28-32°C’ye ayarlı inkübatörde 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

Steril edilmiş, ağzı kapaklı 1,5 ml'lik ependorflara 1000 µl STE (hücre duvarını parçalayarak hücre içeriğinin serbest hale gelmesini sağlar) tamponu konularak içerisine 2-3 öze dolusu bakteri kültürü ilave edilmiştir.

Tüpler 2500 rpm'de vortekslenerek homojenize olmaları sağlanmıştır.

Vortekslenen tüpler 10 000 rpm'de 10 dak süreyle santrifüjlendikten sonra üst faz mikropipetle alınarak atılmış ve peletin üzerine tekrar 1000 µl STE tamponu eklenerek, 10 dk 10 000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Bu işlem üst faz berrak olana kadar tekrar edilmiştir.

Santrifüj sonrası, oluşan üst faz atılarak peletin üzerine 500 µl STE tamponu ilave edildikten sonra mikropipetle dikkatlice alıp vermek (pipetaj) suretiyle tamponun peletle iyice karışması sağlanmıştır.

Tüpler 75°C'ye ayarlı su banyosunda 30 dk süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 15. dakikasında tüpler alınarak 4-5 kez alt üst edilerek tekrar inkübasyona bırakılmıştır.

Su banyosundan çıkartılan tüplere 50 µl %10'luk SDS (proteinler arasındaki disülfid bağlarını parçalar) ve 7 µl proteinaz K (proteinleri parçalar) eklenmiş ve 40°C'ye ayarlı su banyosunda 1 saat süreyle inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrası tüplere ortamdaki tuz konsantrasyonu 0,75-0,8 M olacak şekilde 5M NaCl ve 0,1 hacim %10'luk CTAB/0,7 M NaCl (DNA'yı polisakkaritlerden ve ortamdaki diğer bileşiklerden arındırır) eklenmiştir.

Tüpler 65°C'ye ayarlı su banyosunda 15 dk inkübe edilmiştir.

Su banyosundan alınan tüplere eşit hacimde 25:24:1 fenol:kloroform:izoamilalkol (genellikle, nükleik asitlerden proteinlerin uzaklaştırılmasında kullanılır. Kloroform proteinleri denatüre ederek, sıvı ve organik fazların ayrışmasını sağlar. İzoamilalkol ise ekstraksiyon esnasında meydana gelebilecek köpürmeyi engeller) ilave edilerek 15 dk oda sıcaklığında çalkalayıcı karıştırılmıştır.

Tüpler 16 000 rpm'de 15 dak santrifüjlendikten sonra oluşan üst faz yeni steril ependorf tüplere aktarılmıştır. Her bir tüpe 0,1 hacim %10 CTAB/0.7 M NaCl (ortamda bulunabilecek polisakkarit kalıntılarını elemine etmede kullanılır) eklenmiştir.

65°C'ye ayarlı su banyosunda tüpler 15 dk bekletilmiştir.

Tüplere eşit hacimde 24:1 kloroform:izoamilalkol eklenmiş ve tüpler 15 dk oda sıcaklığında, çalkalayıcı çalkalanmıştır.

Tüpler tekrar 16 000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiş, santrifüj sonrası oluşan üst faz yine yeni steril bir ependorfa alınmıştır.

Tüpler üzerine 0,6 hacim izopropanol (DNA'yı bağlayarak, iplikçikler halinde çökmesini sağlar) eklenmiştir.

Tüpler -20°C'de 1 gece boyunca bekletilmiştir.

Buzdolabından çıkartılan tüpler 15 000 rpm de 15 dk santrifüjlenmiştir.

Üzerine -20°C'de bekletilen %70 lik etanolden (DNA'yı yıkamak amacıyla kullanılır) 500-600 µl eklenmiş ve 15 000 rpm de 15 dk süreyle santrifüjlendikten sonra süpernatant yavaş ve dikkatlice dökülmüştür.

Peletin üzerine yeniden %70 lik etanolden 500-600 µl eklenerek, 15 000 rpm de 15 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant dikkatlice dökülerek tüpler ağzı açık bir şekilde etil alkolün uçması, DNA'nın kuruyarak şeffaf bir görünüm alması amacıyla 2-3 saat süreyle oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Tamamen kuruduktan sonra, DNA'lar 50-70 µl TE içinde oda sıcaklığında 30 dk bekletilerek, iyice çözünmesi sağlanmış ve üzerlerine 2-3 µl RNase ilave edilmiştir.

DNA'lar %0,6'lık agaroz jelinde yürütülmüş ve jelde tek parça bant veren örnekler 4°C'ye kaldırılarak sonraki çalışmalar için hazır hale getirilmiştir (Bozoğlu 2014).

2. Bakteri DNA konsantrasyonlarının ölçülmesi ve çalışma solüsyonlarının hazırlanması

DNA miktarı, direkt olarak 260 nm'deki absorbans ölçümüyle belirlenirken, genetik materyalin temizliği yani protein kirliliği taşıyıp taşımadığı ise 280 nm'de okunan absorbans değeriyle tespit edilir. Kuvarts küvet içerisine 998 µl TE çözeltisi konularak 260 nm'ye ayarlı spektrofotometrede absorbansı ölçülmüş ve elde edilen değer kör olarak kaydedilmiştir. Ardından küvete 2 µl DNA ilave edilerek karışımın homojen olması sağlandıktan sonra 260 nm'de absorbansı yeniden ölçülmüştür. Okunan bu değerden köre ait değer çıkarılarak DNA'nın absorbans değeri bulunmuştur. Yapılan işlemlerin aynısı 280 nm için de tekrarlanarak, A_{260} ve A_{280} değerlerine bakılarak $A_{260} / A_{280} = 1-1,7$ olan örnekler çalışma solüsyonu hazırlamak için kullanılmıştır.

3. DNA örneğinin ve DNA çalışma solüsyonunun konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$)

DNA Konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$)= A_{260} x Seyreltme Faktörü (500) x 50 (DNA için sabit değer) formülü kullanılarak stok solüsyonun DNA konsantrasyonu belirlenmiştir.

DNA çalışma solüsyonunun konsantrasyonu ise; İstenen Konsantrasyon ($100\text{ng}/\mu\text{l}$) x İstenen Hacim ($200\ \mu\text{l}$) / Stok DNA Konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$) formülü ile DNA çalışma solüsyonu hazırlanmış ve bu hesaplamadan elde edilen değer stok DNA çözeltisinden alınacak miktarı vermiştir. Bu miktar TE çözeltisi ile $200\ \mu\text{l}$ 'ye tamamlanarak $100\ \text{ng}/\mu\text{l}$ konsantrasyondaki DNA çalışma solüsyonu hazırlanmış ve DNA tüpleri – 86°C 'de sonraki çalışmalarda kullanılincaya kadar saklanmıştır (Adıgüzel 2006).

4. Bakteri izolatlarının 16S rRNA bölgesinin PCR ile amplifikasyonu

Test izolatlarından saflaştırılmış olan genomik DNA'lardan bakteri sistematığı açısından önemli olan 16S rRNA bölgesi evrensel primerler (forward ve reverse primerler) kullanılarak *in vitro* koşullar altında PCR yardımı ile çoğaltılmıştır (Orhan 2013).

5. Reaksiyonun (Master mix'in) hazırlanması

PCR'ı yapılacak her bir örnek için $3\ \mu\text{l}$ 10 x PCR tamponu ($100\ \text{mM}$ Tris – HCl, $500\ \text{mM}$ KCl, $15\ \text{mM}$ MgCl_2 , %0.01 jelatin pH: 8.3), $0.6\ \mu\text{l}$ dNTP (deoksिनुकлеотидтрифосфатлар: dATP, dGTP, dCTP, dTTP – $10\ \text{mM}$), $3\ \mu\text{l}$ 27F (forward 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3'), $3\ \mu\text{l}$ 1492R (reverse 5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -3'), $1.2\ \mu\text{l}$ DMSO, $0.6\ \mu\text{l}$ MgCl_2 ($50\ \mu\text{M}$), $0.3\ \mu\text{M}$ / ml taq DNA polimeraz ve $15.3\ \mu\text{l}$ sdH_2O ile $27\ \mu\text{l}$ 'lik reaksiyon karışımı hazırlanmış ve karışıma son olarak $3\ \mu\text{l}$ template DNA ($100\ \text{ng}/\mu\text{l}$) eklenerek son hacim $30\ \mu\text{l}$ 'ye tamamlanmıştır. Master mix ve template DNA içeren ependorf tüplerin üzerine buharlaşmayı engellemek amacıyla $15\ \mu\text{l}$ mineral yağ ilave edilmiştir.

PCR programı

PCR için hazırlanan örnekler, 95°C'de 2 dakika denatürasyon, bunu takiben 36 döngü olacak şekilde 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 54°C'de 1 dakika bağlanma ve 72°C'de 2 dakika uzama basamakları ve son olarak 72°C'de 5 dakika uzama basamağından oluşacak şekilde programlanan PCR termal döngü cihazına yerleştirildi. Seçilen programda hedef bölgelerin çoğaltılması yapıldı.

PCR için hazırlanan örnekler, 95°C'de 2dk denatürasyon, bunu takiben 36 döngü olacak şekilde 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 53°C'de 1 dakika bağlanma ve 72°C'de 2 dakika uzama basamakları ve son olarak 72°C'de 5 dakika uzama basamağından oluşacak şekilde programlanan PCR termal döngü (termocycler) cihazına yerleştirilmiştir. Seçilen programda hedef bölgelerin amplifikasyonu yapılmıştır.

PCR Ürünlerinin Analizi

Kesilen PCR ürünleri QIAxcel Advanced analiz sistemiyle değerlendirilmiştir.

6. 16S rRNA gen bölgesinin sekans analizi

16S rRNA PCR yöntemi ile çoğaltılan 16S rRNA gen bölgesinin baz dizilerinin analizi, Hollanda'da bulunan Macrogen firmasına gönderilerek yapılmıştır. Elde edilen 16S rRNA dizileri Gen Bankasında (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) var olan diğer bakteriyal dizilerle karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucu aralarındaki benzerlik oranları tespit edilmiş ve gen bankası kabul numaraları alınmıştır (Acar 2009).

3.2.9. Manyezit madeni mikroflorasından küf izolasyonu ve muhafazası

Uygun ortamlardan alınan örnekler, 1 ml veya 1 g şeklinde hazırlanarak, 9 ml steril %0,9'lük fizyolojik su içerisinde yaklaşık 1-2 saat çalkalanarak homojenize edilmiş, bir

seri dilüsyon (10⁻⁴'e kadarlık dilüsyon serisi) hazırlanmıştır. Bu dilüsyonların her birinden iki paralel olmak üzere, flora mikroorganizmaların izolasyonu için, PDA ve RBA besiyerlerine nokta ekim yapılarak, 32°C'de bir hafta süreyle etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi içerisindeki 1, 3, 5 ve 7. günlerinde, petri plaklarında gözlemlenen farklı kolonilerin saf kültürleri elde edilmiştir. Her fungusun 24-48 saatlik saf kültüründen, alınarak PDA besiyerine aktarılmış. Elde edilen bu stok kültürler kodlanmış (NSH1-NSH60) ve daha sonraki karakterizasyon işlemlerinde kullanılmaya kadar oda ısısında saklanmıştır.

3.2.9.a Stok kültürlerin alınması

Stok kültürleri alınmadan önce hazırlanmış olan stok solüsyonlarına Potato Dextrose Agar besiyerinde canlandırılmış olan örneklerden yaklaşık 2 lup alınarak steril koşullarda stok solüsyonlarının her birine aktarılmıştır. Vorteks yardımıyla organizmalar solüsyon içerisinde homojen bir şekilde dağıtılmıştır. Bu işlemin ardından hazırlanan stok kültürler -87°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.9.b Küf hücresinden genomik DNA'ların izolasyonu

Çalışmamızın bu aşamasında *Saccharomyces cerevisiae*'nin DNA izolasyonu için Barış (2009)'dan uyarlanan protokol uygulanmıştır. DNA izolasyon protokol aşamaları aşağıda verildiği gibidir.

- 1- MBMC'de geliştirilen genç kültürler 10 dakika +4°C'de 18.000 rpm'de santifürjlenir.
- 2- Eppendorf tüpü içerisindeki pelet üzerine 0,3 g glass bead eklenir.
- 3- 200 µl Liziz Buffer eklenir ve maksimum hızda en az 2 dakika vortekslenir.
- 4- 200 µl Fenol: Kloroform:İzoamil alkol (25:24:1) eklenerek 5-10 kez alt-üst edilerek iyice karıştırılır.
- 5- 200 µl TE eklenir ve tekrar maksimum hızda en az 2 dakika vortekslenir.

- 6- +4°C'de 10 dakika 16.000 rpm'de santifürüjlenir.
- 7- Santifürüjleme işleminin ardından 400 µl'lik süpernatant kısmı yeni bir 2 ml'lik steril ependorf tüpüne aktarılır.
- 8- 1000 µl'lik %99,5 saf alkol ependorf tüplerine eklendikten sonra tüpler birkaç kez alt-üst edilir.
- 9- Yeniden +4°C'de 10 dakika 16.000 rpm'de santifürüj işlemi yapılır.
- 10- Santifürüj işleminden sonra pellet kısmı kalacak şekilde sıvı kısmı eppendorf tüplerinden uzaklaştırılarak 5 dakika kurutma kağıdı üzerinde süzme işlemi yapılır.
- 11- Pelletlerin üzerine 300 µl'lik Nuclei Lysis Solüsyonu (Promega) eklenerek 1-2 kez alt-üst edilir.
- 12- Pelletlerin üzerine 100 µl'lik Protein Precipitation solüsyonu (Promega) eklenerek 1-2 kez alt-üst edilir ve daha sonra 1-2 dakika vortekslenir.
- 13- Örnekler 5 dakika -20°C'de veya buz üzerinde bekletilir ve +4°C'de 16.000 rpm'de 6 dakika santifürüjlenir.
- 14- Santifürüj işleminden sonra süpernatant kısmından 350 µl alınır ve yeni bir steril ependorf tüpüne aktarılır.
- 15- 300 µl'lik -20°C'de bekletilen izopropanol eklenir ve 5-10 kez alt-üst edilir.
- 16- Süpernatant kısım ependorf tüplerini sallamadan dikkatli bir şekilde boşaltıldıktan sonra pelet kısmına zarar vermeden kurutma kağıdının üzerinde 1 dakika bekletilir.
- 17- 300 µl'lik %70 'lik ethanol (-20°C'de) eklenerek + 4°C'de 16.000 rpm'de 6 dakika santifürüj edilir.
- 18- Santifürüjden çıkartılan örneklerin pelet kısmındaki etanol uçması için 37°C'lik etüvde 90 dakika veya 40°C'lik etüvde 60 dakika tüplerin ağzı açık kalacak şekilde bekletilir.
- 19- Etanolün uçmasının ardından 50 µl'lik DNA Rehidrasyon solüsyonu (Promega) ependorf tüplerine eklenir.
- 20- 1,5 µl'lik RNAase (Promega) eklenir ve ardından 15 dakika 37°C'de inkübe edilir.
- 21- İnkübe edilen örnekler 65°C'lik etüve konularak 1 saat bekletilir. Etüvden çıkartıldıktan sonra DNA'lar +4°C'de saklanır.

3.2.9.c Küf Genomik DNA'sı için jel elektroforezi ve görüntüleme

1 gr agaroz üzerine 100 ml 1XTBE tamponu ilave edilir. Karışım mikrodalga fırında iyice çözününceye kadar kaynatılır. 50°C'ye kadar soğutulan agarose jele 0,6 µl etidium bromür eklenerek, içerisine tarak yerleştirilmiş olan elektroforez jel küvetine dökülür. 15-20 dakika beklenerek jelin donması sağlanır. Donan jelden taraklar dikkatlice çıkarılır ve içerisinde 0,5XTBE tamponu bulunan elektroforez tankının içine yerleştirilir. Jeldeki ilk çukura, DNA markırından [50-100-200-300-400-500-750-1000-1400-1500-2000-3000-4000-6000-8000-10000] (Sigma D7058) 8 µl yüklenir. Diğer çukurlara ise her bir örnek için 2 µl 6X yükleme tamponu, 8 µl genomik DNA ürünü karıştırılarak yüklenir. Elektroforez jel düzeneği 90 volta ayarlanarak örnekler 60 dakika yürütülür. Yürütme işleminden sonra jel, jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenir ve bilgisayar ortamında (DNR BioImaging Systems Software) analiz edilir (Alaylar 2014).

ITS PCR Protokolü

Reaksiyonun hazırlanması

PCR'ı yapılacak her bir örnek için 25 µl'lik reaksiyon hazırlanır. Bir örnek için hazırlanan reaksiyon; 17,75 µl su, 2,5 µl Expand High Fidelity Buffer (10x concentrated, without MgCl₂), 1 µl DMSO, 1,5 µl MgCl₂ solüsyonu (25 mM), 0,25 µl F (ITS 1) primer, 0,25 µl R (ITS 4) primer, 0,5 µl dNTP (deoksिनुकлеотидтрифосфатlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP) ve izole edilmiş DNA ilave edilir (Alaylar 2014).

ITS PCR programı

Hazırlanan örnekler, 3 dakika 94°C'de denetürasyon, bunu takiben 40 döngü olacak şekilde 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 61,5°C'de 1 dakika bağlanma (bu basamak her bir primerin Tm sıcaklığına uygun olacak şekilde optimize edilmelidir) ve 72°C'de 1,5 dakika uzama basamakları ve son olarak 72°C'de 7 dakika uzama basamağının ardından

oluşacak şekilde programlanan PCR cihazına yerleştirilir. Seçilen programda hedef bölgelerin çoğaltılması yapılır (Alaylar 2014).

PCR Ürünlerinin Analizi

Elde edilen PCR ürünleri QIAxcel Advanced analiz sistemiyle değerlendirilmiştir.

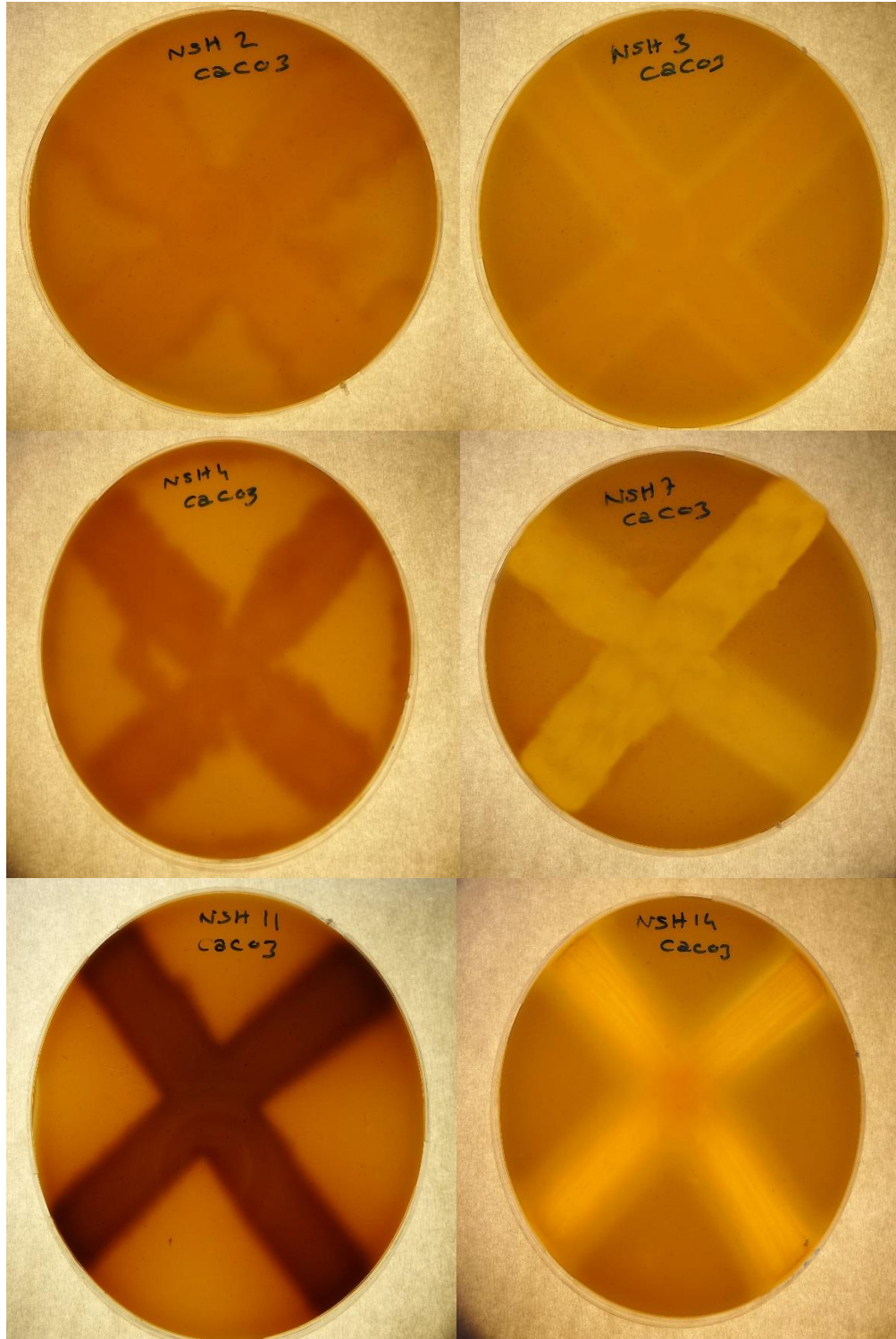
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Bakteri İzolasyonu Sonuçları

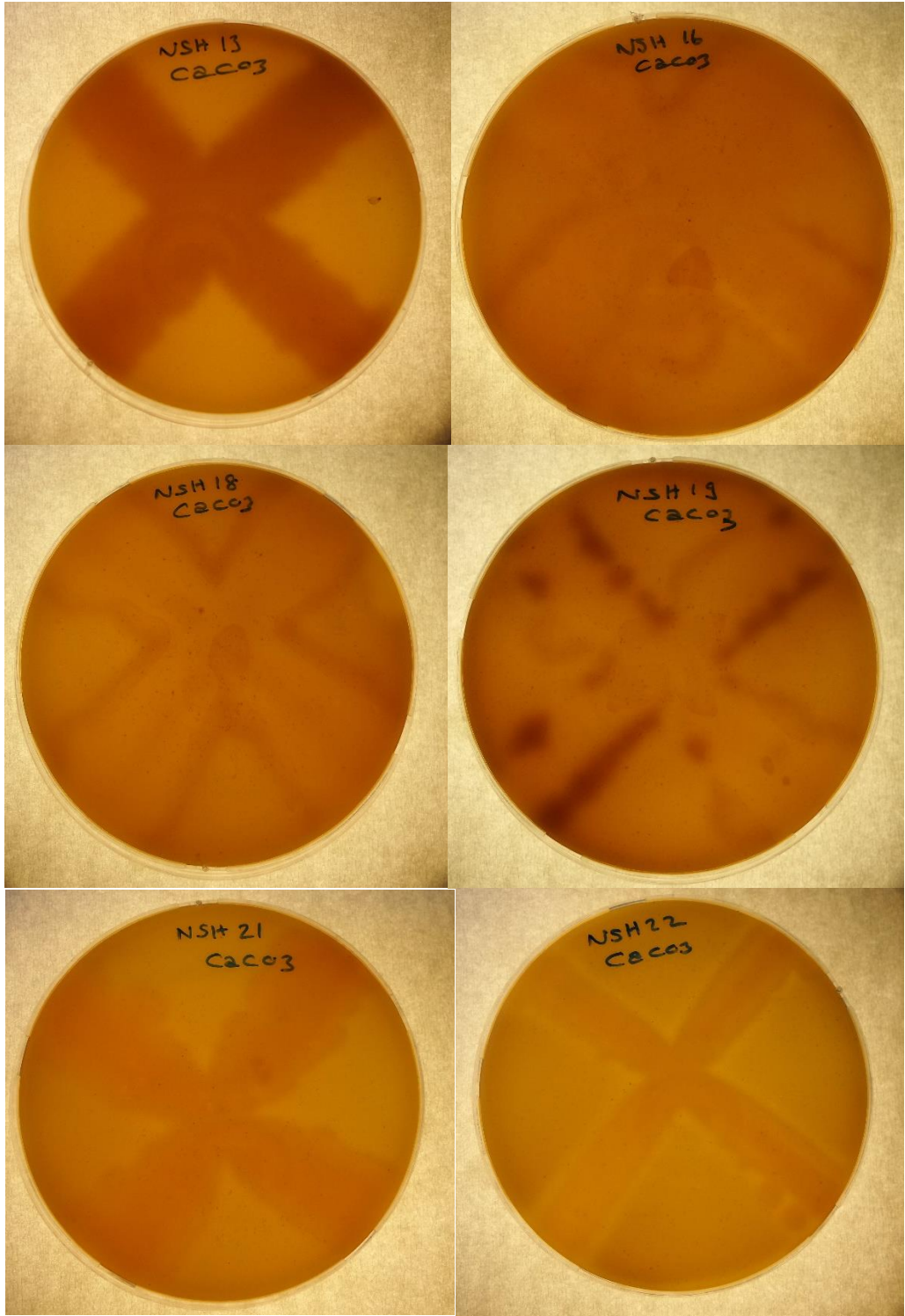
Bu çalışmada Kütahya ili sınırları içerisinde yer alan Turanocağı ve Ortaocak manyezit madenlerinden alınan örnekler, genel besiyerlerine karışık kültürler olarak ekilmiştir. Genel besiyerlerinde gelişen bakteriyal kolonilerden farklı olduğu tespit edilen toplam 60 adet bakteri izole edilmiş ve “NSH” şeklinde kodlanmış. Bu bakteriler arasından da morfolojik olarak birbirlerinden farklı olan 35 adet bakteri izolatu seçilmiş ve çalışmaya bu izolatlarla devam edilmiştir.

4.2. İzole Edilen Bakterilerin CaCO₃ Üzerine Çözücü Özelliklerinin Sonuçları

Besiyerlerinde gelişen bakteriyal kolonilerden izole edilen 60 bakterinin her biri, YDC-agar besiyerine çizgi ekim yöntemiyle ekilmiş ve *in vitro* olarak CaCO₃'ı çözme potansiyelleri araştırılmıştır. Petri plakları, kurumayı engellemek amacıyla parafilm ile kaplanmış ve 2 hafta süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda YDC besiyerinde 6'si kuvvetli (3, 7, 14, 21, 22, 25) 14'i normal (1, 2, 4, 6, 10, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 23, 24) derecede zon oluşturan 20 adet bakteri izolatu belirlenmiştir. Zon oluşumunu gösteren görüntüler Şekil 4.1'de verilmiştir.



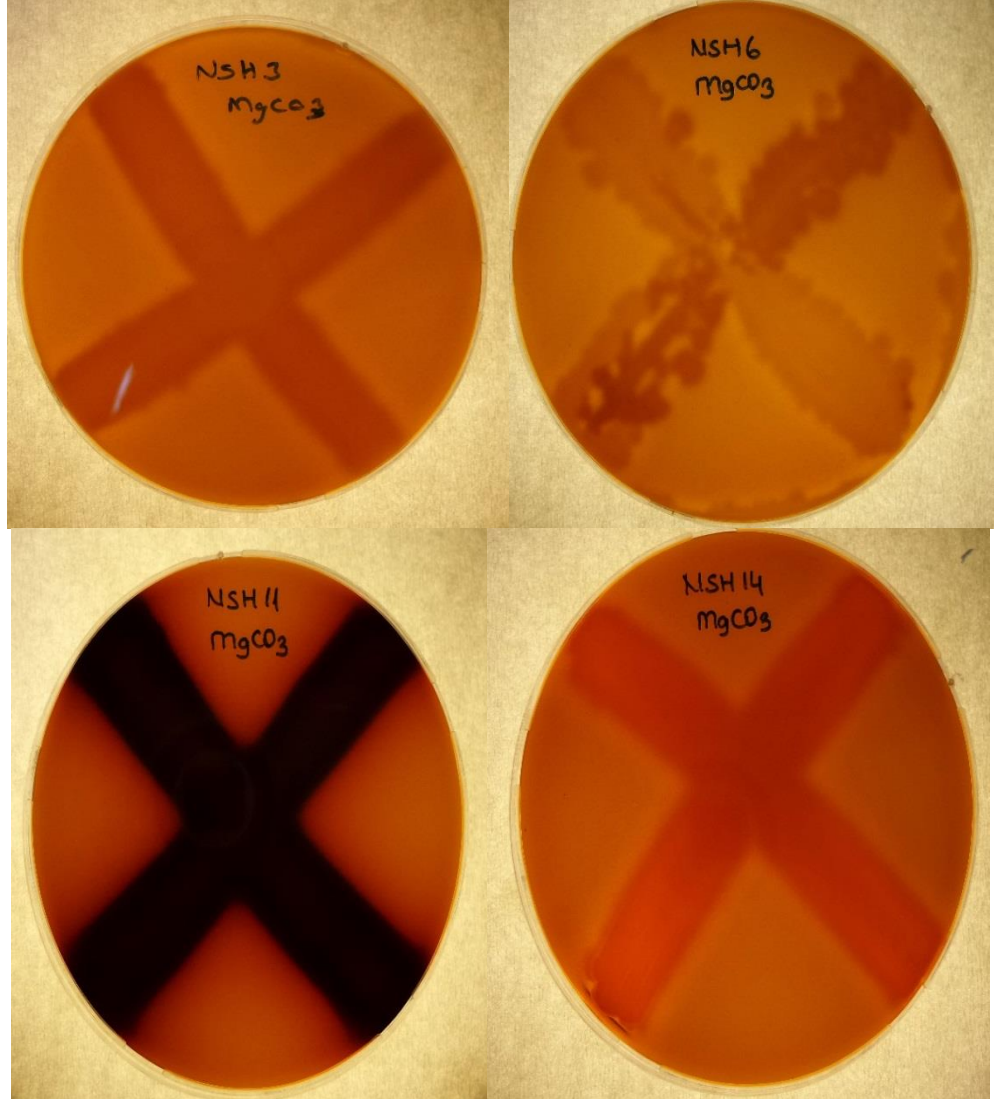
Şekil 4.1. YDC-agar besiyerinde zon oluşturan 12 izolatın fotoğrafları



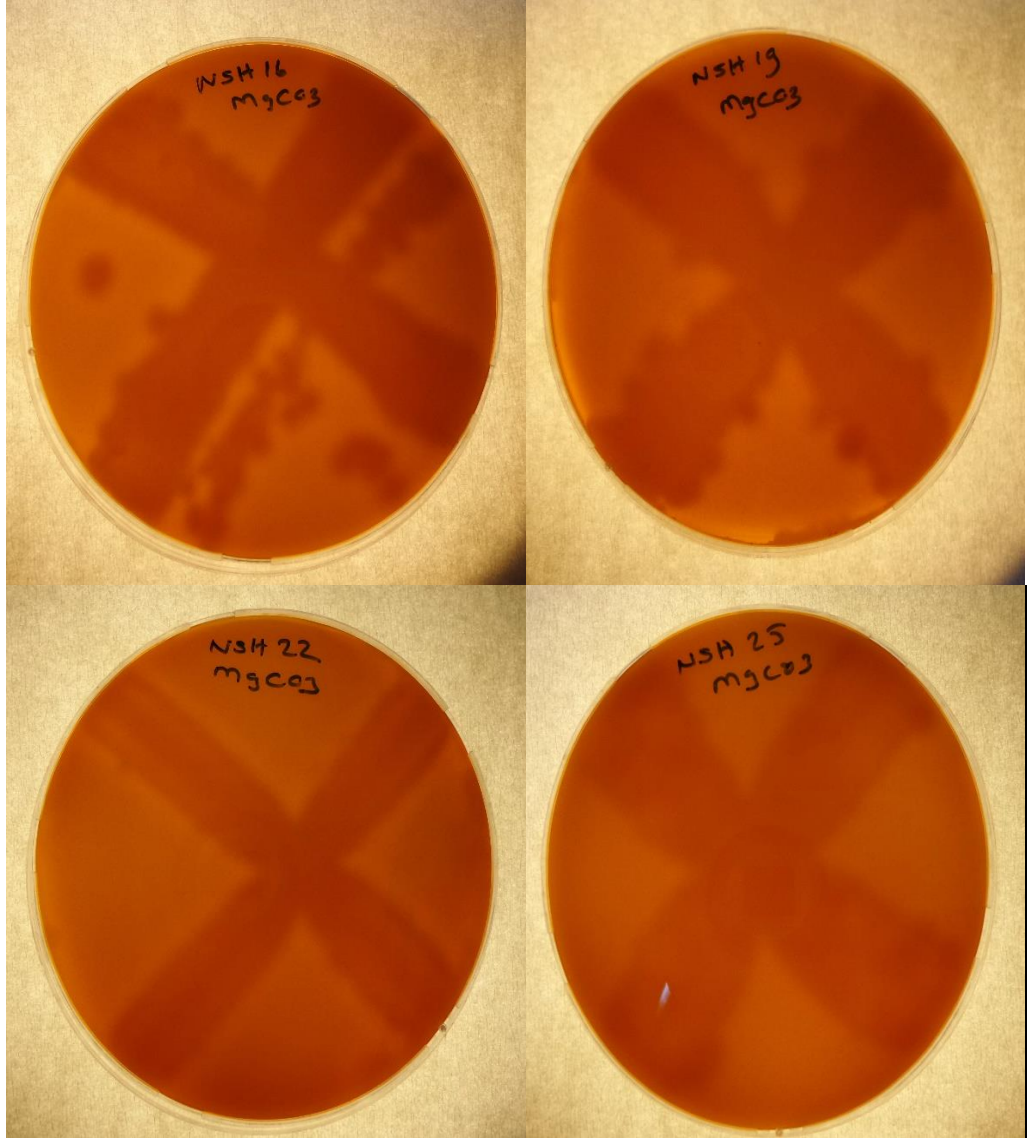
Şekil 4.1. (devam)

4.3. Bakteri İzolatlarının MgCO₃ Üzerine Çözücü Özelliklerinin Sonuçları

CaCO₃'ü çözebilen 20 izolatın her biri, YDC besiyerinden modifiye edilen MgCO₃ agar besiyerine çizgi ekim yöntemi ile ekilmiş ve izolatların *in vitro* olarak MgCO₃'ü çözme potansiyelleri araştırılmıştır. Petri plakları, kurumayı engellemek amacıyla parafilm ile kaplanmış ve 1 hafta süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Yapılan incelemeler sonucunda CaCO₃'ü çözme yeteneği olan 20 bakteriden 10'unun (3, 6, 7, 10, 14, 16, 18, 19, 22, 25)MgCO₃'ü çözme özelliğinin olduğu görülmüştür. Zon oluşumunu gösteren görüntüler Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. MgCO₃ agar besiyerinde zon oluşturan 8 izolatın fotoğrafları



Şekil 4.2. (devam)

4.4. Bakteri İzolatlarının Fizyolojik Test Sonuçları

Araştırılan izolatların tuz toleransları ve pH aralıkları Çizelge 4.3'de verilmiştir. Tüm izolatların %10 NaCl'de gelişirken, artan tuz konsantrasyonuyla birlikte izolatların sayısında azaldığı belirlenmiştir. Çalışmamızda araştırılan izolatların pH aralıklarının değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. İzolatların fizyolojik test sonuçları

Tuz Aralıkları (%NaCl)				pH aralıkları			
İzolat kodu	5	10	15	5	7	9	11
NSH 1	+	+	-	+	+	-	-
NSH 2	+	-	-	+	+	-	-
NSH 3	+	-	-	-	+	-	-
NSH 4	+	-	-	+	+	-	-
NSH 6	+	-	-	-	+	+	-
NSH 7	+	-	-	+	+	-	-
NSH 10	+	-	-	+	+	-	-
NSH 12	+	+	-	+	+	+	-
NSH 13	+	-	-	+	+	-	-
NSH 14	+	-	-	-	+	+	
NSH 15	+	-	-	+	+	-	-
NSH 16	+	+	+	+	+	-	-
NSH 18	+	-	-	+	+	-	-
NSH 19	+	-	-	+	+	-	-
NSH 20.	+	-	-	-	+	+	-
NSH 21	+	-	-	+	+	-	-
NSH 22	+	+	+	+	+	-	-
NSH 23	+	-	-	+	+	-	-
NSH 24	+	-	-	+	+	-	-
NSH 25	+	-	-	+	+	-	-

4.5. Bakteri İzolatlarının Morfolojik Test Sonuçları

CaCO₃'ü çözdüğü belirlenen bakterilerin bazı morfolojik (hücre şekli, boyutları, Gram özelliği, endospor durumları, hareketlilik, katı ve sıvı kültürleri) özellikleri belirlenerek sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. İzolatların morfolojik test sonuçları

İzolat kodu	Gram	Endospor	Hareketlilik	Morfoloji	Boyut
NSH 1	+	Terminal	+	Basil	1
NSH 2	-	Terminal	+	Basil	3-4
NSH 3	+	Terminal	+	Basil	4-5
NSH 4	+	Sentral	-	Basil	1-2
NSH 6	+	Sentral	+	Basil	1-2
NSH 7	+	Sentral	+	Basil	3
NSH 10	+	Sentral	-	Basil	3-4
NSH 12	-	Terminal	+	Basil	3-4
NSH 13	+	Sentral	+	Basil	1-2
NSH 14	-	Terminal	-	Basil	1-2
NSH 15	+	-	+	Basil	3-4
NSH 16	+	Sentral	-	Basil	2-3
NSH 18	+	Sentral	-	Basil	5-6
NSH 19	+	Terminal	+	Basil	5-6
NSH 20	+	Terminal	-	Basil	5-6
NSH 21	+	Terminal	-	Basil	7-8
NSH 22	+	Sentral	+	Coc	1-2
NSH 23	+	Sentral	-	Basil	2-3
NSH 24	+	Sentral	-	Basil	3-4
NSH 25	+	Sentral	+	Basil	4-5

4.6. Bakteri İzolatlarının Kültür Özelliklerinin Belirlenmesi

Mağaralardan izole edilen kristal oluşturabilen bakterilerin kültürel özelliklerini incelemeye, bunların katı (nutrient agar ve gliserinli nutrient agar) ve sıvı (nutrient broth) ortamlardaki saf kültürleri kullanılmış ve her bir izolatın olgun koloni oluşturduğu sürede sonuçlar alınmıştır. İzolatların kültür özellikleri ile ilgili sonuçları Çizelge 4.3’de detayları ile verilmiştir.

Çizelge 4.3. İzolatların kültür özellikleri

İzolat Kodu	Koloni	Renk	Kıvam
NSH 1	Düzenli	Açık sarı	Krem
NSH 2	Düzenli	Krem	Krem
NSH 3	Düzenli	Krem-Şeffaf	Krem
NSH 4	Düzensiz	Krem	Sümüksü
NSH 6	Düzenli-Besiyere yapışık	Kırık Beyaz	Sümüksü
NSH 7	Düzenli	Beyaz	Cıvık Krem
NSH 10	Düzenli-Besiyere yapışık	Kırık Beyaz	Krem
NSH 12	Düzenli	Krem- Mat	Tereyağı
NSH 13	Düzenli	Sarı-Şeffaf	Sümüksü
NSH 14	Düzenli	Sarı-Turuncu	Krem
NSH 15	Düzenli	Mat Sarı	Tereyağı
NSH 16	Düzenli	Mat Sarı	Krem
NSH 18	Düzenli	Beyaz	Cıvık Krem
NSH 19	Düzenli-Besiyere yapışık	Koyu Sarı	Sert
NSH 20	Düzenli	Açık sarı	Sümüksü
NSH 21	Düzenli	Mat Sarı	Krem
NSH 22	Düzenli	Krem-Şeffaf	Krem
NSH 23	Düzenli	Mat Krem	Koyu Krem
NSH 24	Düzensiz	Sarı-Şeffaf	Sümüksü
NSH 25	Düzenli	Mat Krem	Krem

4.7. Bakteri İzolatlarının Biyokimyasal Test Sonuçları

CaCO₃'ü çözdüğü belirlenen izolatların biyokimyasal test (katalaz, amilaz, oksidaz) sonuçları Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. İzolatların biyokimyasal test sonuçları

İzolat kodu	Oksidaz	Katalaz
NSH 1	-	+
NSH 2	-	+
NSH 3	-	+
NSH 4	-	++
NSH 6	-	+
NSH 7	-	+
NSH 10	-	++
NSH 12	-	+
NSH 13	+	++
NSH 14	-	++
NSH 15	-	++
NSH 16	-	+
NSH 18	-	+
NSH 19	-	++
NSH 20	+	++
NSH 21	-	++
NSH 22	-	+
NSH 23	+	+
NSH 24	+	++
NSH 25	-	++

4.8. Bakteri İzolatların Hidroliz Test Sonuçları

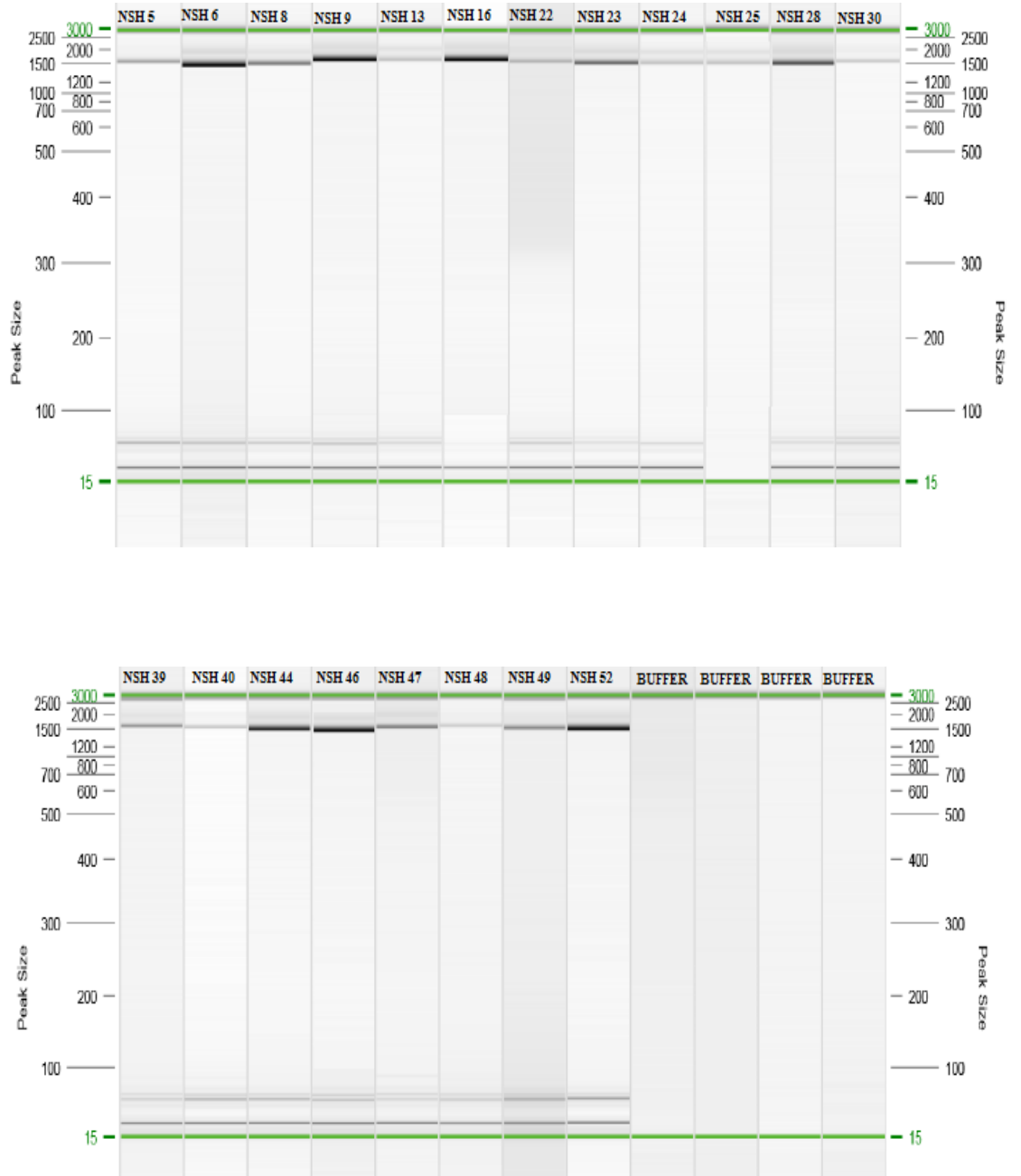
Seçilen izolatların hidroliz test (Kazein, nişasta, jelatin) sonuçları Çizelge 4.5’de verilmiştir.

Çizelge 4.5. İzolatların hidroliz test sonuçları

İzolat kodu	Kazein	Jelatin
NSH 1	-	-
NSH 2	-	+
NSH 3	-	-
NSH 4	-	+
NSH 6	+	-
NSH 7	-	-
NSH 10	+	+
NSH 12	-	+
NSH 13	-	-
NSH 14	+	-
NSH 15	-	-
NSH 16	-	-
NSH 18	+	-
NSH 19	-	-
NSH 20	-	+
NSH 21	+	-
NSH 22	-	-
NSH 23	+	-
NSH 24	-	-
NSH 25	-	+

4.9. 16S rRNA PCR Amplifikasyon Sonuçları

Test edilen bakteri izolatlarının 16S rRNA PCR amplifikasyon sonuçları değerlendirilmiş ve yapılan analiz sonuçlarına göre tüm izolatların ortalama 1450 bp uzunluğunda tek bant verdiği belirlenerek Şekil 4.3’de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Bakteri izolatlarının 16S rRNA PCR elektroforez sonuçları

4.10. Bakteri İzolatların 16S rRNA Gen Bölgelerinin Baz Dizileri

CaCO₃'ü çözebilen 20 bakteri izolatlarının 16S rDNA genlerinin baz dizileri belirlenmiş ve diziler Gen bankasında var olan 16S rDNA gen dizileri ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmalar sonucunda elde edilen tanı sonucu, yüzdesi, Genbank numarası ve nükleotid sayısı Çizelge 4.6'da, 16S rDNA geninin baz sırası **EK 1-21**'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Bakteri izolatlarının gen bank numaraları ve nükleotit sayıları

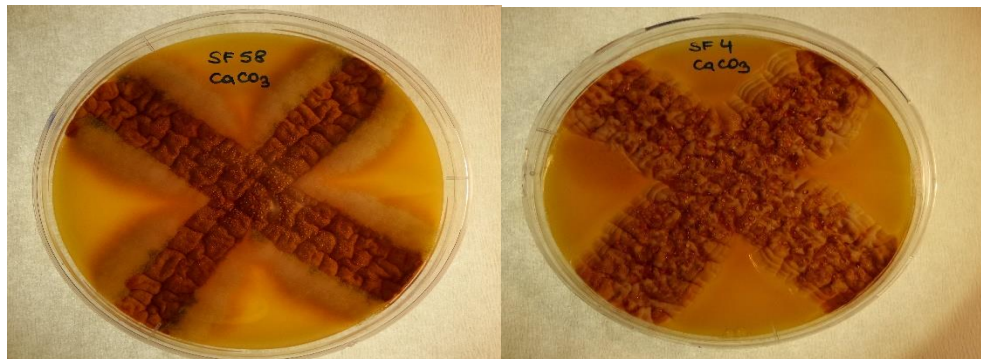
İzolat Kodu	Gen Bank Numarası	Nükleotit Sayısı*	Benzerlik Oranı**	En Yakın Filogenetik
NSH 1	KR010959	1258	%100	<i>Arthrobacter</i> sp.
NSH 2	KR010960	1248	%100	<i>Bacillus</i> sp.
NSH 3	KR922319	1257	%100	<i>Bacillus</i> sp.
NSH 4	KR010961	1180	%99	<i>Bacillus atrophaeus</i>
NSH 6	KR922320	1184	%100	<i>Bacillus drentensis</i>
NSH 7	KR922321	1264	%100	<i>Paenibacillus</i> sp.
NSH 10	KR010962	1246	%100	<i>Paenibacillus</i> sp.
NSH 12	KR010963	1274	%100	<i>Bacillus thuringiensis</i>
NSH 13	KR010964	1270	%100	<i>Bacillus atrophaeus</i>
NSH 14	KR922322	1257	%100	<i>Microbacterium schleiferi</i>
NSH 15	KR010965	1291	%100	<i>Bacillus</i> sp.
NSH 16	KR922323	1253	%100	<i>Bacillus idriensis</i>

Çizelge 4.6. (devam)

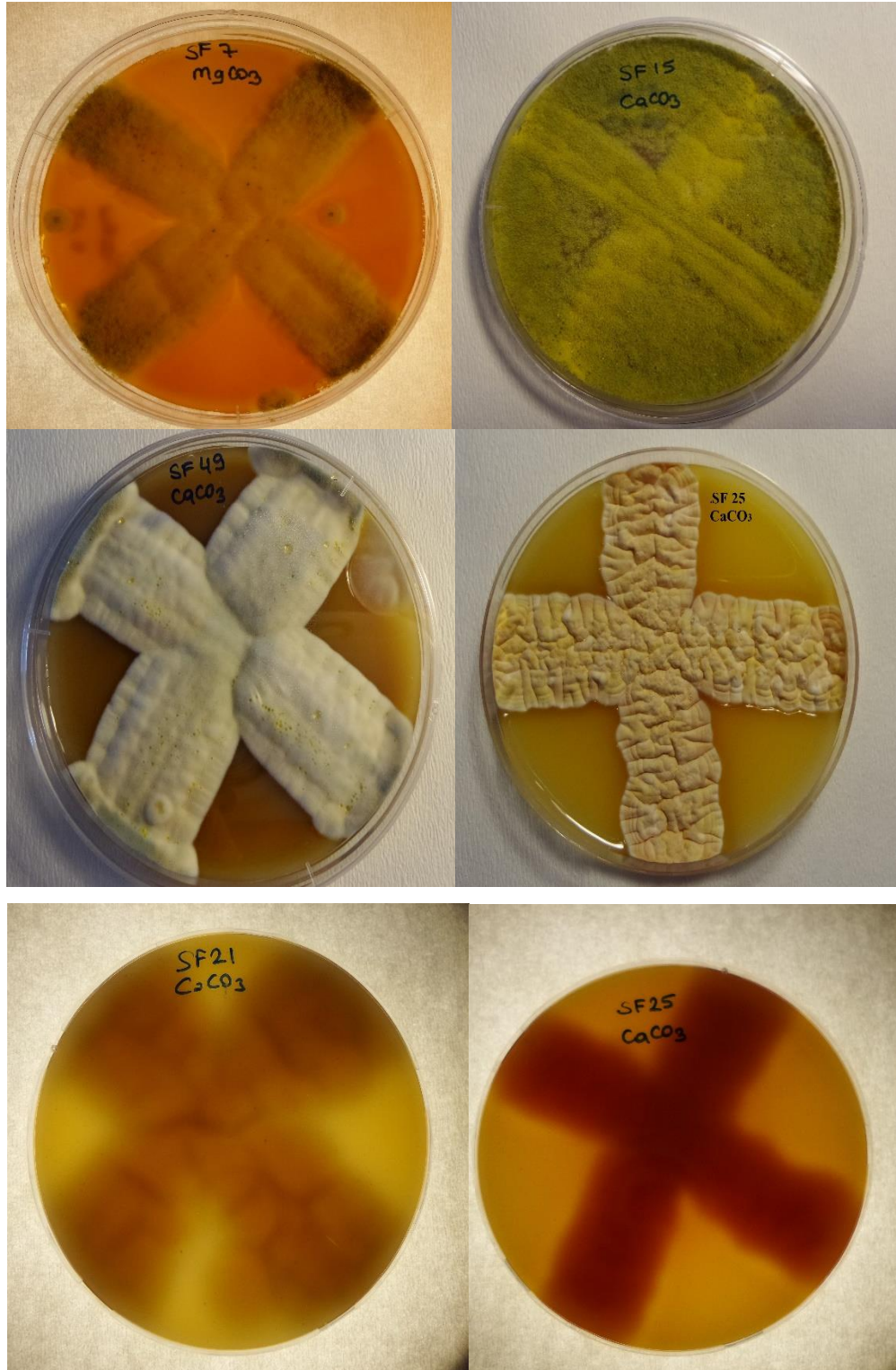
NSH 18	KR922324	901	%95	<i>Bacillus circulans</i>
NSH 19	KR010966	1239	%100	<i>Streptomyces</i> sp.
NSH 20	KR922325	1275	%100	<i>Bacillus simplex</i>
NSH 21	KR010967	1191	%100	<i>Bacillus simplex</i>
NSH 22	KR922326	1272	%100	<i>Terribacillus aidingensis</i>
NSH 23	KR922327	1255	%100	<i>Bacillus endophyticus</i>
NSH 24	KR010968	1298	%100	<i>Bacillus atrophaeus</i>
NSH 25	KR922328	1255	%100	<i>Bacillus simplex</i>

4.11. Küf İzolatlarının CaCO_3 Üzerine Çözücü Özelliklerinin Sonuçları

Besiyerlerinde gelişen SF kodlu birbirinden farklı olduğu düşünülen 40 fungal izolatdan her biri, YDC-agar besiyerine çizgi ekim yöntemiyle ekilmiş ve *in vitro* olarak CaCO_3 'ü çözme potansiyelleri araştırılmıştır. Petri plakları, kurumayı engellemek amacıyla parafilm ile kaplanmış ve 2 hafta süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda YDC besiyerinde zon oluşturan 14 adet fungal izolat belirlenmiştir. Zon oluşumunu gösteren görüntüler Şekil 4.4'de verilmiştir.



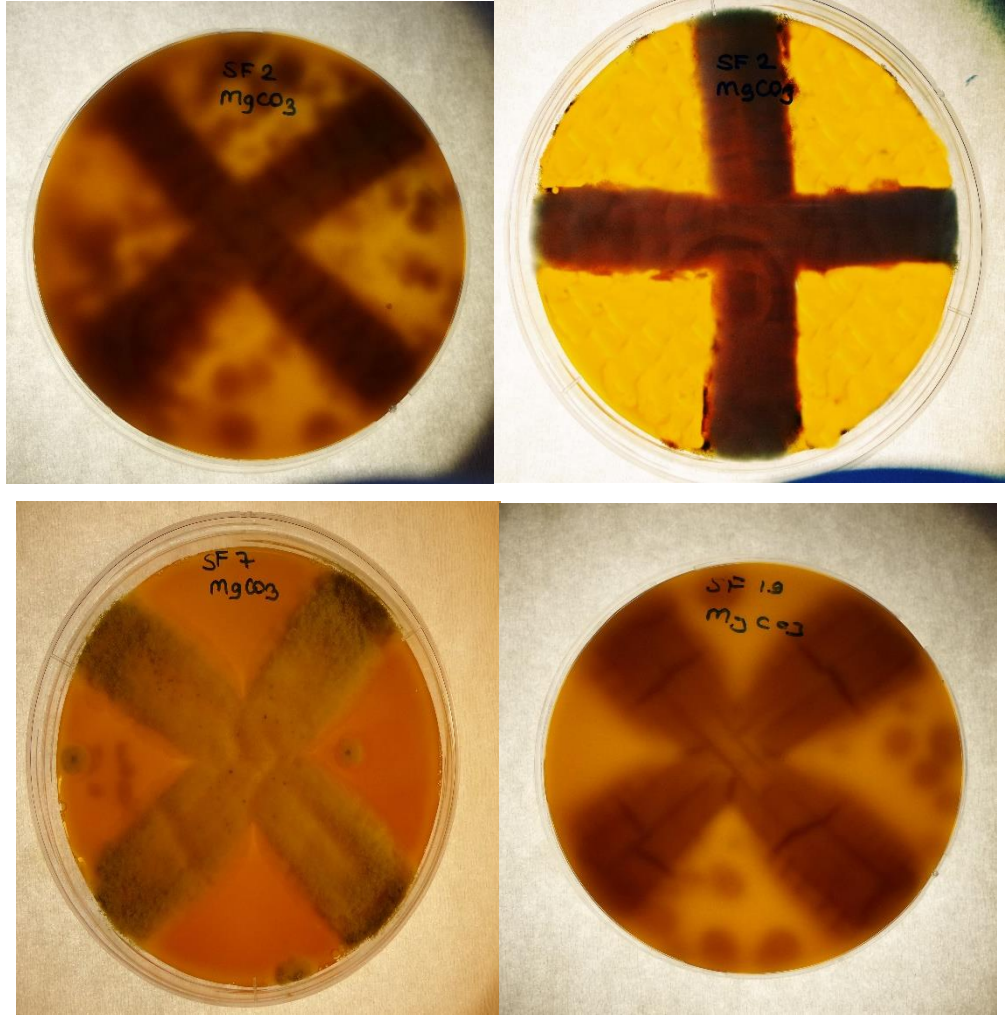
Şekil 4.4. YDC-agar besiyerinde zon oluşturan küf izolatının fotoğrafları



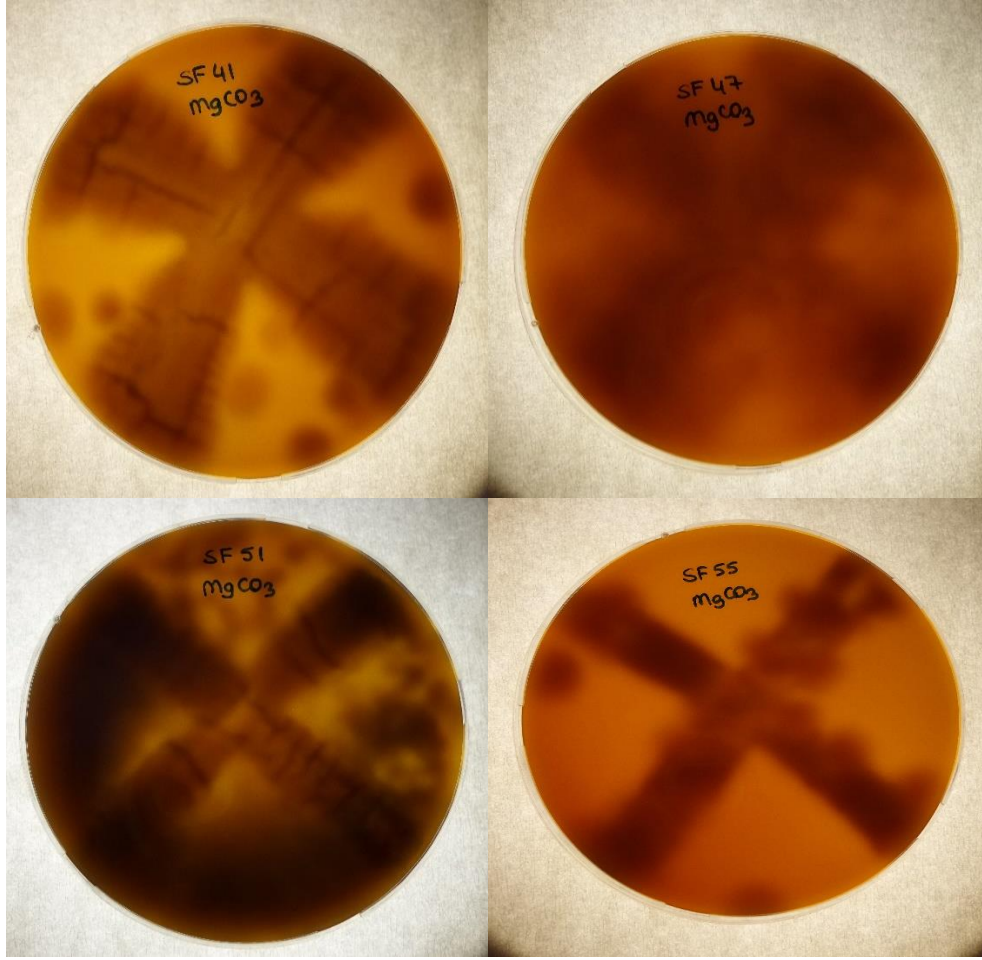
Şekil 4.4. (devam)

4.12. Kf İzolatlarının MgCO₃ Üzerine Çözücü Özelliklerinin Sonuçları

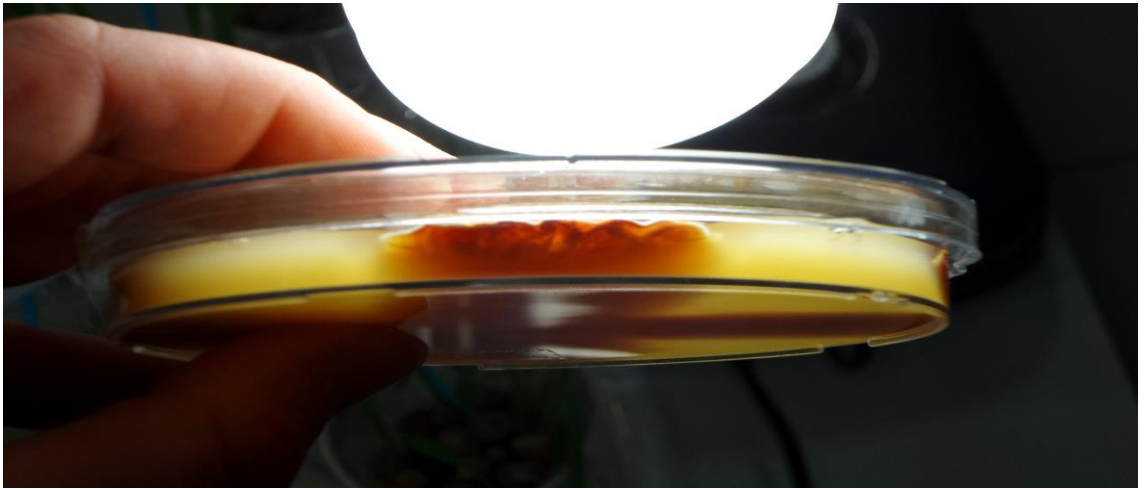
CaCO₃'ı çözebilen 14 fungal izolatın her biri, YDC besiyerinden modifiye edilen MgCO₃ agar besiyerine çizgi ekim yöntemi ile ekilmiş ve izolatların *in vitro* olarak MgCO₃'ı çözme potansiyelleri araştırılmıştır. Petri plakları, kurumayı engellemek amacıyla parafilm ile kaplanmış ve 1 hafta süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Yapılan incelemeler sonucunda CaCO₃'ı çözme yeteneği olan 14 fungal izolattan 11'inin (4, 7, 14, 16, 19, 27, 28, 30, 45, 47, 55) MgCO₃'ı çözme özelliğinin olduğu görülmüştür. Zon oluşumunu gösteren görüntüler Şekil 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.5. MgCO₃ -agar besiyerinde zon oluşturan kf izolatının fotoğrafları



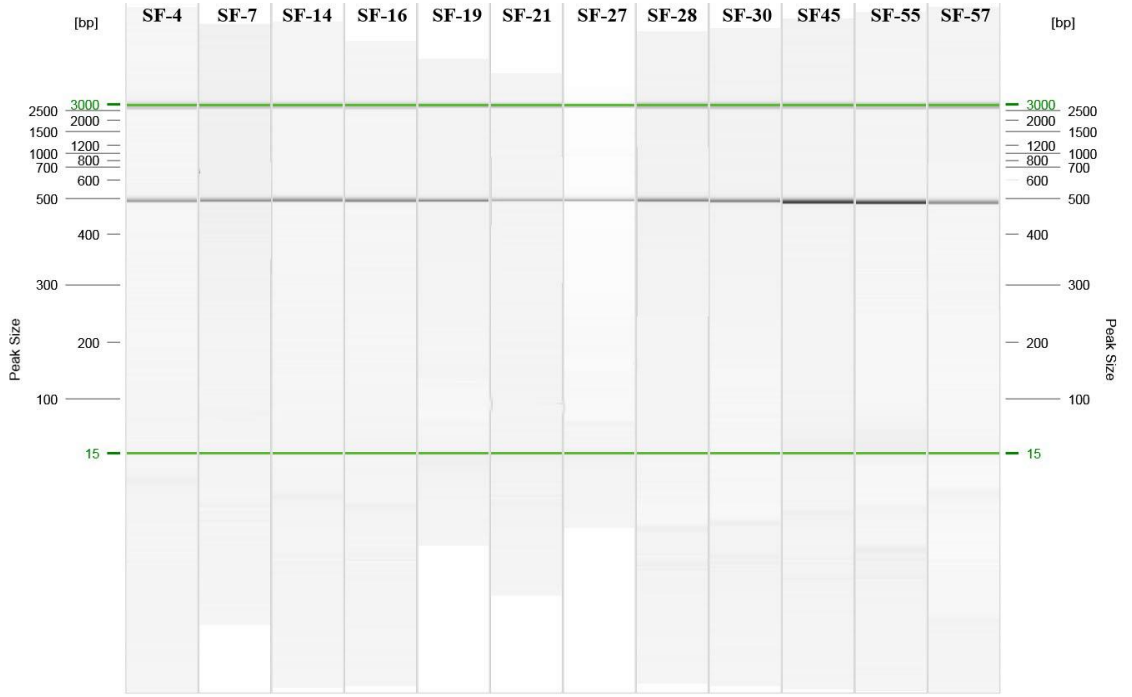
Şekil 4.5. (devam)



Şekil 4.6. Küf izolatlarının YDC-agar besiyerinde CaCO_3 çözünürlüğünü gösteren fotoğraf

4.13. ITS PCR Amplifikasyon Sonuçları

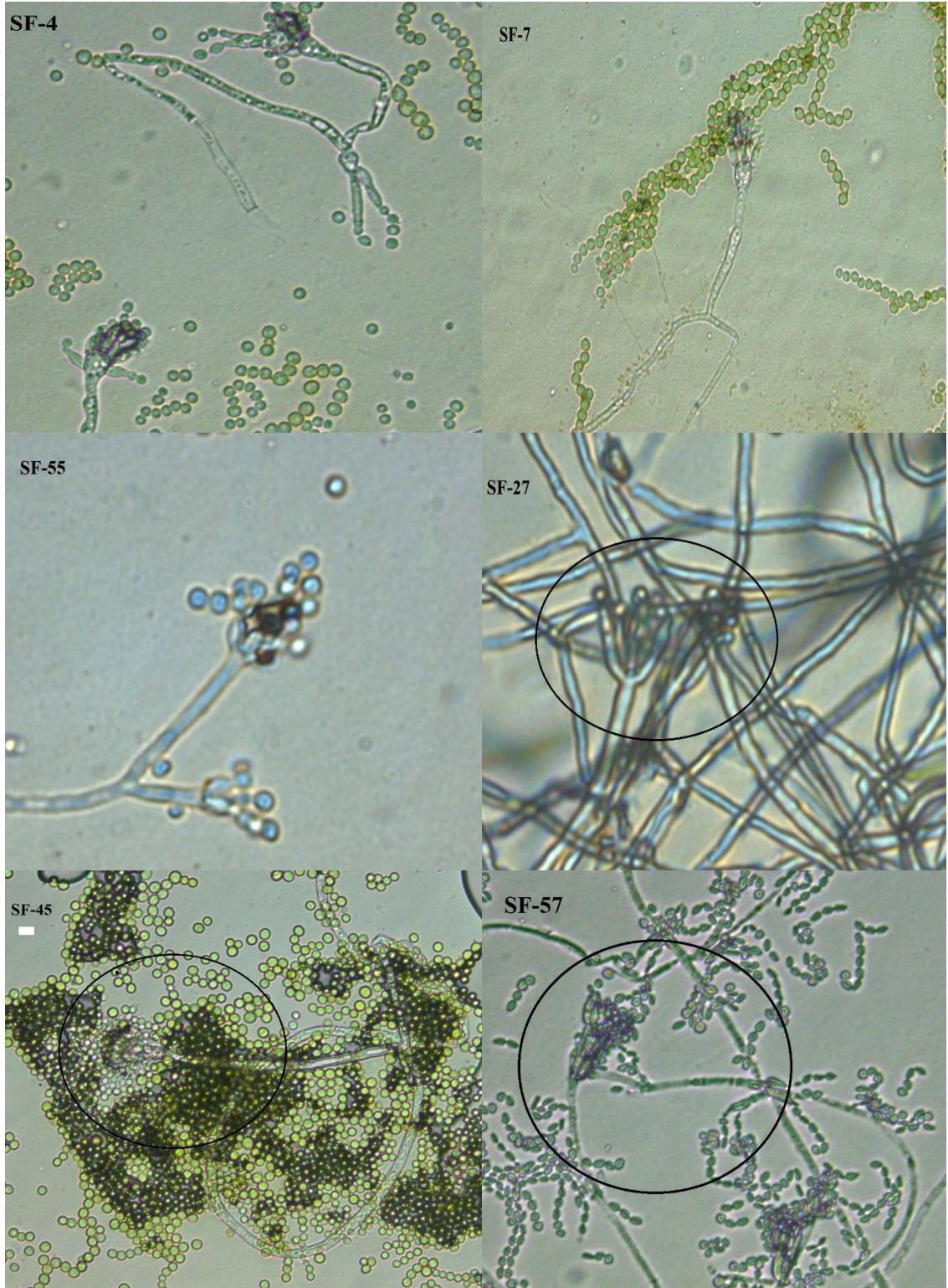
Test edilen küf izolatlarının ITS PCR amplifikasyon sonuçları değerlendirilmiş ve yapılan analiz sonuçlarına göre tüm izolatların ortalama 500bp uzunluğunda tek bant verdiği belirlenerek Şekil 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Küf izolatlarının ITS PCR elektroforez sonuçları

4.14. Küf İzolatlarının Mikroskobik İncelemeleri

Küflerin sınıflandırılmasında temel olarak eşeyli sporlar ve bunlarla ilgili organeller dikkate alınmaktadır. Bu nedenle mikroskobik incelemeler yapılmış ve ITS sonuçlarıyla benzerlik gösterdiği Şekil 4.8’de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Bazı küf izolatlarının mikroskop görüntüleri

4.15. Fungal İzolatların 18S rDNA Gen Bölgelerinin Baz Dizileri

CaCO₃'ü çözebilen 14 fungal izolatın 18S rDNA genlerinin baz dizileri belirlenmiş ve diziler Gen bankasında var olan 18S rDNA gen dizileri ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmalar sonucunda elde edilen tanı sonucu, yüzdesi, Genbank numarası ve nükleotid sayısı Çizelge 4.7'de, 18S rDNA geninin baz sırası **EK 22-35**'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Fungal izolatların gen bank numaraları ve nükleotit sayıları

İzolat Kodu	Gen Bank Numarası	Nükleotit Sayısı*	Benzerlik Oranı**	En Yakın Filogenetik
SF 4	KR905609	753	%98	<i>Penicillium</i> sp.
SF 7	KR905610	814	%97	<i>Penicillium</i> sp.
SF 14	KR905611	852	%99	<i>Aspergillus flavus</i>
SF 16	KR905612	934	%94	<i>Aspergillus alliaceus</i>
SF 19	KR905613	915	%97	<i>Aspergillus alliaceus</i>
SF 21	KR905614	935	%99	<i>Aspergillus alliaceus</i>
SF 27	KR905615	963	%95	<i>Penicillium chrysogenum</i>
SF 28	KR905616	893	%100	<i>Penicillium</i> sp.
SF 30	KR905617	859	%99	<i>Fusarium tricinctum</i>
SF 45	KR905618	907	%98	<i>Aspergillus flavus</i>
SF 46	KR905619	900	%98	<i>Aspergillus nomius</i>
SF 47	KR905620	910	%100	<i>Fusarium tricinctum</i>
SF 55	KR905621	885	%99	<i>Penicillium</i> sp.
SF 57	KR905622	966	%100	<i>Aspergillus leporis</i>

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Türkiye maden kaynakları yönünden zengin bir coğrafyada yer alması ile gelişen dünya ekonomilerinde önemli bir yere sahiptir. Bu açıdan ülkemiz sahip olduğu değerli kaynaklarından biri olan 160 milyon ton manyezit rezerviyle Çin, Kuzey Kore, Rusya, Brezilya ve Avusturya gibi ülkelerin ardından dünya çapındaki önemli manyezit üreticileri arasında yer alır. Kıyas yapıldığında dünya toplam manyezit rezervinin %4,12'sinin Türkiye'de olduğu açıkça görülmektedir.

Endüstriyel açıdan bakıldığında manyezit bir magnezyum karbonat minerali olarak tanımlanır ve bu madenin yapısında bulunan magnezyum minerali ekonomik açıdan önemli bir hammadde olarak dikkat çeker. Endüstride magnezyumun hammadde olarak kullanılabilmesi için olabildiğince saf olarak elde edilmesi gerekmektedir. Bunun için yapısında bulunan gang minerallerinin uzaklaştırılmasına yönelik yapılan zenginleştirme çalışmaları ekonomik açıdan büyük önem teşkil eder.

Manyezitin zenginleştirilmesine yönelik yapılması öngörülen çalışmalar özellikle, cevherin yapısında bulunan CaCO_3 , Fe_2O_3 ve SiO_2 gibi kirletici nitelik taşıyan gang bileşiklerin ortamdan uzaklaştırılmasını hedeflemektedir (Liu et al. 2003; Sever 2006). Gerek dünya gerekse ülkemiz literatürlerine ve endüstriyel uygulamalara bakıldığında tüm madenlerin zenginleştirilmesinde olduğu gibi manyezit zenginleştirilmesinde de birçok fiziksel ve kimyasal yöntemin yaygın bir şekilde kullanılmakta olduğu açıkça görülmektedir. Bu yöntemlerin en çok kullanılanlarına el ile ayıklama, manyetik ayırma, ağır ortam, elektrostatik ayırma, flotasyon, optik yöntemlerle zenginleştirme, hidrotasyon, gravite ve kalsinasyon gibi zenginleştirme uygulamaları örnek olarak verilebilir (MTA 1981).

Tüm bu uygulama çeşitliliğine rağmen, manyezit zenginleştirmede kullanılan konvansiyonel yöntemlerin yüksek maliyet, uygulama zorluğu, uzun süre gereksinimleri ve çevreye olan zararları gibi önemli dezavantajlarının bulunması bilim insanlarını

maden zenginleştirmede kullanılabilir yeni yöntemler aramaya sevk etmiştir. Bu bağlamda yakın gelecekte manyezit işleme ve zenginleştirme teknolojilerinin geliştirilebilmesi için öne sürülen en umut verici yaklaşım biyoteknolojik uygulamaların manyezit zenginleştirme çalışmalarına uyarlanmasıdır.

Maden zenginleştirmede biyoteknolojik yaklaşımların başarıyla kullanılmasına çoğunlukla biyoliç uygulamalarında rastlanır. Doğada kolayca bulunabilen su, hava ve mikroorganizmaların kullanılmasıyla sülfürlü cevherlerden veya bunların konsantrelerinden metallerin uzaklaştırılması işlemi olarak tanımlanan biyoliç yöntemi günümüze kadar çeşitli madenlerin zenginleştirilmesi için yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Gilbertson 2000). Bununla birlikte bu yöntem yapısında tamponlayıcı bir bileşen olan CaCO_3 bulunduran manyezit madenlerinin zenginleştirilmesi için kullanılamamaktadır (Pathak *et al.* 2009; Chan *et al.* 2009; Schippers *et al.* 2010).

Mikroorganizmaların buldukları çevredeki metaller ve minerallerle girdikleri fiziksel ve kimyasal etkileşimler sonucu ortaya çıkan biyomineralizasyon, manyezitte olduğu gibi biyoliç temelli uygulamaların kullanılmadığı durumlarda maden zenginleştirme çalışmaları için alternatif bir yol sunar. Bu amaçla yapılan güncel çalışmalarda madenlerin doğal floralarının maden zenginleştirmede kullanılabilir biyomineralizasyon tekniklerinin geliştirilebilmesi için gerekli olan aktif mikroorganizmaların elde edilebilmesine yönelik öneme vurgu yapılmaktadır. (Madigan and Martinko 2010). Bu bağlamda aktif mikroorganizmaların madenin doğal florasından elde edilebilmesi konsepti temelde birçok mineralin doğal olarak biyojenik olması ve mikroorganizmaların bu minerallerle etkileşime girerek çeşitli hayatsal faaliyetlerini sürdürebilmeleri ilkelerine dayanmaktadır.

Gerçekten de literatür verilerine bakıldığında farklı maden zenginleştirme çalışmalarında kullanılmak üzere asıl kaynaktan izole edilen mikroorganizmaların kullanıldığı görülmektedir (Liu *et al.* 2008; Pathak *et al.* 2009; Chan *et al.* 2009; Schippers *et al.* 2010). Mikroorganizmaların farklı ekstrem koşullarda yaşayabilmeleri

ve buldukları ortamlardaki maddeleri kullanabilme yetenekleri zenginleştirme çalışmalarında doğal floranın kullanılmasının önemini arttırmaktadır. Yine bu alandaki literatürlere bakıldığında farklı kaynaklardan izole edilen mikroorganizmaların da zenginleştirme çalışmalarında kullanılabileceği fakat farklı kaynaktan izole edilen mikroorganizmaların madenin kendinden izole edilen mikroorganizmalara göre ortama daha geç adaptasyon sağladıkları ve etkilerinin bu nedenle daha düşük olduğu gözlemlenmiştir (Sever 2006).

Tüm bu veriler ışığında, manyezit madeninin kendi florasından izole edilen mikroorganizmaların, manyezitin yapısında bulunan önemli kirleticilerden kalsiyum ve magnezyumu çözme yeteneğine sahip olabileceği öngörülebilir. Bununla birlikte hem ülkemiz hem de dünya literatürlerinde manyezit zenginleştirme teknolojilerinin geliştirilmesi için benzer yaklaşımların sayısının oldukça az olması, literatürdeki ve teknolojiye bu eksikliğin doldurulması ihtiyacını doğurmaktadır.

Bu ihtiyacın giderilmesine katkı sağlamak amacıyla yapılan çalışmamız ile Kütahya-Eskişehir sınırları içerisinde yer alan KÜMAŞ işletmelerine ait Turaocağı ve Ortaocak manyezit maden ocaklarından cevher örnekleri alınmış ve bu örneklerden mikroorganizmalar izole edilmiştir. Elde edilen toplam 60 bakteri ve 40 fungus izolatının her birinin CaCO_3 'ün biyolojik çözünmesindeki etkileri özel hazırlanan besiyerlerine ekilerek araştırılmıştır. Yapılan ekimler sonucunda toplamda 20 bakteri ve 15 fungus izolatının CaCO_3 'ü etkin bir biçimde çözdüğü gözlemlenmiştir. Aktiviteleri gözlenen bu mikrobiyal izolatların tanılama çalışmaları çeşitli klasik ve moleküler tekniklerle yapılmıştır.

CaCO_3 'ün uzaklaştırılmasında rol oynayan 21 bakteri izolatları ilk olarak sıvı ve katı besiyerlere inoküle edilerek geliştirilmiş ve oluşan genç kültürlerin boyamalar yapılarak morfolojik özellikleri ortaya konmuştur. Elde edilen veriler sonucunda yalnızca NSH 22 kodlu bakteri izolatının hücre şeklinin kok, diğer 21 bakteri izolatının ise çubuk şeklinde olduğu tespit edilmiştir. Bu izolatlardan NSH 14 dışında hepsinin endospor

oluşturabildikleri ve NSH 4, NSH 10, NSH 14, NSH 16, NSH 18, NSH 20, NSH 21, NSH 23, NSH 25 dışındakilerin hareketli oldukları gözlemlenmiştir.

Bakteri izolatlarının fizyolojik özelliklerinden sıcaklık ve pH istekleri belirlenmiştir. Bu amaçla 10°C'den başlayıp 50°C'ye kadar devam eden çeşitli sıcaklıklar kullanılmıştır. Örneklerin tamamı 10°C'de çok az gelişim gösterirken 50°C'de gelişimin tamamen durduğu gözlemlenmiştir. Genel olarak ise bakteri izolatlarının 27-32°C aralığında çok iyi geliştikleri tespit edilmiştir. pH aralığının belirlenmesine yönelik yapılan çalışmada ise izolatlar 5-11 pH aralığındaki besiyerlerine inoküle edilmiş ve inkübasyon süresi sonunda pH ölçümleri alınmıştır. Ölçümler sonucunda NSH 3, NSH 6, NSH 14 ve NSH 20 izolatlarının pH 5 alt limit değerinde gelişebildiği ve NSH 6, NSH 12, NSH 14, NSH 20 izolatlarının pH 9 üst limit değerinde gelişebildikleri gözlemlenmiştir. Ayrıca tüm örneklerin pH 7'de çok iyi gelişim gösterirken pH 11'de canlılık faaliyetlerini sürdüremedikleri tespit edilmiştir.

Elde edilen izolatların bazı biyokimyasal özelliklerine bakıldığında ise; NSH 2, NSH 12 ve NSH 14 kodlu izolatların Gram negatif, diğerlerinin ise Gram pozitif; tüm izolatların katalaz pozitif; NSH 13, NSH 20, NSH 24 ve NSH 25 kodlu izolatların oksidaz pozitif, diğerlerinin ise oksidaz negatif olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda, bakteri izolatlarının tanı ve karakterizasyonu amacıyla uygulanacak olan konvensiyonel testlerin identifikasyonda tek başına yeterli olmamasından dolayı (Barış 2008), bu testlere ek olarak moleküler yöntemlerden 16S rRNA dizi analiz yöntemi de kullanılmıştır. Bu amaçla izolatların 16S rRNA bölgeleri PCR yardımıyla çoğaltılmış ve sekans analizleri yaptırılmıştır. Analiz sonucunda; izole edilen bakterilerden 3' ünün *Bacillus* sp, 2'sinin *Arthrobacter* sp, 3'ünün *Bacillus atrophaeus*, 1'inin *Bacillus drentensis*, 2'sinin *Paenibacillus* sp. 1'inin *Bacillus thuringiensis*, 1'inin *Microbacterium schleiferi*, 1'inin *Bacillus circulans*, 1'inin *Streptomyces* sp. 1'inin *Terribacillus aitingensis*, 3'ünün *Bacillus simplex*, 1'inin *Bacillus endophyticus*, 1'inin *Bacillus idriensis* olduğu tespit edildi (Sezgin 2007; Madigan and Martinko 2010).

Bu aşamaya kadar yapılan tüm konvensiyonel test sonuçlarının verileri ile moleküler tanı çalışmalarından elde edilen sonuçlar kıyaslanmış ve elde edilen tanı bilgilerinin birbirini destekleyerek literatür verileriyle uygunluk gösterdiği ortaya konulmuştur (Wieser and Busse 2000; Brettar *et al.* 2002; Frühling *et al.* 2002; Rodrigues *et al.* 2006; Louboudy *et al.* 2007; Cai *et al.* 2008; Chamkha *et al.* 2011; Görmez 2011).

alışmamızın bir diğer mikrobiyal unsuru olan fungus izolatlarının tanı ve karakterizasyonunda da benzer şekilde konvansiyonel tanı yöntemleri ve moleküler yöntemlerden 18S rRNA dizi analiz yöntemi kullanılmıştır. Bu analizler sonucunda elde edilen veriler de benzer şekilde birbirini desteklemiş ve literatür bilgileri ile uygunluk göstermiştir (Hasenekoğlu 1991). Yapılan bu çalışmalar sonucunda fungal izolatlardan 3'ünün *Aspergillus alliaceus*, 1'inin *Penicillium chrysogenum*, 4'ünün *Penicillium* sp. 2'sinin *Fusarium tricinctum*, 2'sinin *Aspergillus flavus*, 1'inin *Aspergillus leporis* ve 1'inin *Aspergillus nomius* olduğu belirlendi.

Bu tez kapsamında elde edilen bulgular incelendiğinde, izole edilen mikroorganizmaların endüstriyel uygulama alanlarında manyezit zenginleştirme çalışmaları için oldukça büyük öneme sahip olduğu açıkça görülmektedir. Yine bu mikroorganizmaların tanınması ve Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü – Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji Araştırma Laboratuvarı bünyesinde stok kültürlerinin saklanması ile ulusal nitelikli bir kültür koleksiyonunun oluşturulması, yapılan araştırmanın özgün değerini ortaya koymaktadır. Literatürde benzer çalışma sayısının az olması ve çalışma konusunun biyomineralizasyonda kullanılabilecek doğal bakteri izolatlarına ilaveten fungal izolatları da içerecek şekilde kurgulanması bu araştırmanın bilimsel önemini ortaya koymaktadır. Bu bağlamda çalışmamızdan elde edilen mevcut veriler ışığında gelecekte yapılabilecek yeni çalışmalarla, manyezit cevherinin yapısındaki kirletici kalsiyum karbonatlı bileşiklerin uzaklaştırılabileceği ve bu sayede hem konvansiyonel zenginleştirme metotlarının kullanımı sonucu açığa çıkan çevre kirliliğinin azaltılabileceği hem de bu yöntemlerin dezavantajlarının sebep olduğu ekonomik zararın önüne geçilebileceği öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abalı, Y., Çopur M., Yavuz M., 2006. Determination of the optimum conditions for dissolution of magnesite with H₂SO₄ solutions. *Indian Journal of Chemical Technology*, 13, pp, 391-397.
- Acar, S., 2009. Hasanabdal Köyü Termal Tesislerinden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Adıgüzel, A., 2006. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Akçıl A, Çiftçi H, 2003. Küre Bakır Cevherinin Bakteriyel Liçi, *Madencilik*, 42(4), 15-25.
- Alaylar, B., 2014. Sukroz ve Glukoz Varlığında *Saccharomyces Cerevisiae*'da İlgili Gen Bölgelerinde Meydana Gelen Epigenetiksel Değişimlerin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Arda, M., 2000. Temel mikrobiyoloji. *Medisan Yayın Serisi*, 46: 548.
- Ayvazoğluyüksel, G., 2011. Atık Elektro filtre Manyezit Tozlarının Çözünme Davranışının Optimizasyonu ve Geri Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Bal, T., 2012. Aşkale (Erzurum) Manyezit Ocaklarından Cevher Zenginleştirme Potansiyeli Bulunan Bakterilerin İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Barış, Ö., 2008. Erzurum İlindeki Mağaralarda Damlataşı Oluşumunda Etkili Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Tanısı. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Barker, W. W., Welch, S. A., and Banfield, J. F., 1997. Biogeochemical weathering of silicate minerals. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 35 (1), 391-428.
- Barker, W. W., Welch, S. A., Chu, S., and Banfield, J., 1998. Experimental observations of the effects of bacteria on aluminosilicate weathering. *American Mineralogist*, 83, 1551-1563.
- Bayrak, B., Laçın, O., Hanifi, Saraç H., 2010. Kinetic study on the leaching of calcined magnesite in gluconic acid solutions. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 16, 479-484.
- Billiton, A., 2000. Recent bioleaching developments: creating value through innovation. *Biotechnology in Mining* 1-11.
- Borand, N., M., 2012. Açık Ve Kapalı Maden İşletmeciliğinde Çevresel Etki. Madencilikte Özel Konular II Ders Projesi. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Bosecker, K., 1997. Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 20 (3-4), 591-604.
- Bozoglu, C., 2014. Ağrı Diyadin Kaplıcasından İzole Edilen Termofilik *Brevibacillus sp.* (Z1) Bakterisinden Lakkaz Enziminin Saflaştırılıp, Karakterize Edilmesi ve

- Endüstride Kullanılabilirliğinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Brand, H., 2001. In *British Mycological Society Symposium Series*.383-423.
- Brierley, C. and Briggs, A., 2002. Selection and sizing of biooxidation equipment and circuits. Mineral processing plant design, practice and control. Society of Mining Engineers, Littleton, Colo 1540-1568.
- Brierley, C. L., 1982. Microbiological mining. Scientific American, 247 44-53.
- Brierley, J. and Brierley, C., 2001. Present and future commercial applications of biohydrometallurgy. Hydrometallurgy, 59 (2), 233-239.
- Brombacher, C., Bachofen, R. and Brandl, H., 1997. Biohydrometallurgical processing of solids: a patent review. Applied microbiology and biotechnology, 48 (5), 577-587.
- Busscher, H. J. and Weerkamp, A. H., 1987. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. FEMS Microbiology letters, 46 (2), 165-173.
- Carretero, M. I. and Pozo, M., 2010. Clay and non-clay minerals in the pharmaceutical and cosmetic industries Part II. Active ingredients. Applied Clay Science, 47, 171-181.
- Chen, S. Y. and Lin, J. G., 2001. Bioleaching of heavy metals from sediment: significance of pH. Chemosphere, 44 (5), 1093-1102.
- Chou, L., Garrels, R.M., Wollast, R., 1989. Comparative study of the kinetics and mechanism of dissolution of carbonate minerals. Chemical Geology, 78(3-4), 269-282.
- Çakır, D., 2007. Asidik Ortamda Manyezit Artığından Magnezyumun Özütlenmesi. Osmangazi Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı Eskisehir.
- Çetin, U., 2010. ASMAŞ Manyezit İşletmesi Triyaj Ara Ürünü ve -20 mm Atıklarının Değerlendirilmesi. Osman Gazi Üniversitesi, Maden Mühendisliği, Eskişehir.
- Das, T. and Ayyappan, S., 1999. Factors affecting bioleaching kinetics of sulfide ores using acidophilic micro-organisms. BioMetals, 12 (1), 1-10.
- De Beer, D. and Stoodley, P., 2006. The prokaryotes, Springer, 904-937.
- Demir, F. and Dönmez, B., 2008. Optimization of the dissolution of magnesite in citric acid solutions. Int. J. Miner. Process. 87, 60-64.
- Dönmez B., Demir F. ve Laçın O., 2009. Endüstri Mühendisliği ve Kimya, 2009 Dergisi 15(6), 865-869.
- DPT, 2007. Dokuzuncu Kalkınma Planı Madencilik Özel İhtisas Komisyonu Raporu (2007-2013), Ankara.
- DPT, 2001. Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı Madencilik Özel İhtisas Komisyonu Endüstriyel Hammaddeler Alt Komisyonu Kimya Sanayii Hammaddeleri çalışma Grubu raporu. DPT, Ankara.
- Dülger, S., 1997. Ayder kaplıcasından Termofilik Bakteri İzolasyonu ve Teşhisi. Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Eerola, E. and Olli-Pekka Lehtonen, O.,P., 1988. Optimal Data Processing Procedure for Automatic Bacterial Identification by Gas-Liquid Chromatography of Cellular Fatty Acids. Journal Of Clinical Microbiology, 26(9), 1745-1753.
- Erdoğan, N. ve Yıldız, R., 1995. Manyezit ve Bazit Refrakter Malzeme Teknolojisi. Kümaş, Kütahya.

- Erşahan, H., Ekmekyapar, A. and Sevim, F., 1994. Flash calcination of a magnesite ore in a free-fall reactor and leaching of magnesia. *International Journal of Mineral Processing*, 42 (1), 121-136.
- Evans, A. M., 1993. *Ore geology and industrial minerals*; Third edition, Blachwell Sci. Publ., London, 389 s.
- Farrab, W.E. and Reboli, A.C., 2006. The Genus *Bacillus*—Medical. Dworkin, M.(Editor-in-Chief), *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria*. Third Edition. Springer Science, 609–630, New York, USA.
- Friedrich, H. E. and Mordike, B. L., 2006. *Magnesium technology: metallurgy, design data, automotive applications*. Springer.
- Gadd, G. M. and Raven, J. A., 2010. Geomicrobiology of eukaryotic microorganisms. *Geomicrobiology journal*, 27 (6-7), 491-519.
- Gerhardt, P., R.G.E. Murray, W.A. Wood and N.R. Krieg. 1994. "Methods for General and Molecular Bacteriology." ASM Press, Washington, D.C. ISBN 1-55581-048-9 P 518.
- Gilbertson, B., 2000. Creating value through innovation: biotechnology in mining. *Mineral Processing and Extractive Metallurgy*, 109 (2), 61-67.
- Harley, J.P. and Prescott, L.M., 2002. *Laboratory Exercises in Microbiology*, Fifth Edition New York: The McGraw–Hill Companies, 466p.
- Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J. and Williams, S., 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. William & Wilkins. Baltimore, MD.
- Jabeen, R., Iftikhar, T and Huma Batool, H., 2012. Isolation, Characterization, Preservation And Pathogenicity Test Of *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* Causing Blb Disease In Rice, *Pak. J. Bot*, 44(1), 261-265.
- Kafas, İ., 2012. Sulu Çözeltiden Bakırın Kalsine Manyezit Atığı Üzerine Adsorpsiyonu. Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.
- Kaya, M., 1993. "Magnezit ve Bazik Refrakter Teknolojisi", Anadolu Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Yayın No:57, Eskişehir.
- Kocadağistan, M., 2007. Çayeliyöresi Bakır Cevherlerinin Biyoliçi Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Bilimleri Anabilim Dalı, Erzurum.
- Kocaefe, M., 1982. Manyezit envanteri. Ankara, MTA Yayınları.
- Kuzvart, M., 1984. *Industrial minerals and rocks*; Elsevier, London, 445.
- Laçın, O., Dönmez, B. and Demir, F., 2005. Dissolution kinetics of natural magnesite in acetic acid solutions. *International Journal of Mineral Processing*, 75 (1), 91-99.
- Lelliott, R. A. and Stead, D. E., 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. Blackwell Scientific Publications.
- Liermann, L. J., Kalinowski, B. E., Brantley, S. L. and Ferry, J. G., 2000. Role of bacterial siderophores in dissolution of hornblende. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64 (4), 587-602.
- Liu, H. L., Chiu, C.W. and Cheng, Y.C., 2003. The Effects of Metabolites From the Indigenous *Acidithiobacillus thiooxidans* and Temperature on the Bioleaching of Cadmium From Soil. *Wiley Periodicals, Inc.*, 638-645.
- Lower, S. K., 2005. Directed natural forces of affinity between a bacterium and mineral. *American Journal of Science*, 305 (6-8), 752-765.

- Lower, S. K., Hochella, M. F. and Beveridge, T. J., 2001. Bacterial recognition of mineral surfaces: nanoscale interactions between *Shewanella* and α -FeOOH. *Science*, 292 (5520), 1360-1363.
- Lower, S. K., Tadanier, C. J. and Hochella, M. F., 2000. Measuring interfacial and adhesion forces between bacteria and mineral surfaces with biological force microscopy. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64 (18), 3133-3139.
- Lundgren, D.G., Vakova-Valchanova, M., Reed, R., 1986. Chemical Reactions Important in Bioleaching and Bioaccumulation, *Biotechnology and Bioengineering Symp.*, 16: 7-21.
- Lüttge A., Conrad G. P., 2004. Direct Observation of Microbial Inhibition of Calcite Dissolution. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (3), 1627-1632.
- Magnuson, J. K. and Lasure, L. L. 2004. *Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine*, Springer, 307-340.
- Mesci, K. A., Sevim F., 2006. Dissolution of magnesia in aqueous carbon dioxide by ultrasound. *International Journal of Mineral Processing*, 79(2), 83-88.
- MMO, 2002, "Madencilik Sektörü 2002", Maden Mühendisleri Odası Yayınları, Ankara.
- MMO, 2004, "Madencilik Ürünleri İstatistikleri", Maden Mühendisleri Odası Yayınları, Ankara.
- Mosivand, M., Rahimian, H. and Shams-Bakhsh, M., 2009. Phenotypic and genotypic relatedness among *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains isolates from strains isolates from sugarcane, stone fruits and wheat. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 45 (1), 75-85.
- MTA, 1981. Türkiye manyezit envanteri. MTA, Yayl., No: 186, 258 s.
- Nemati, M. and Harrison, S., 2000. A comparative study on thermophilic and mesophilic biooxidation of ferrous iron. *Minerals Engineering*, 13 (1), 19-24.
- Norris, P. R., Clark, D. A., Owen, J. P. and Waterhouse, S., 1996. Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus* sp. nov. and other moderately thermophilic mineral-sulphide-oxidizing bacteria. *Microbiology*, 142 (4), 775-783.
- Orhan, F., 2013. Doğu Anadolu Bölgesindeki Tuzlu Topraklardan İzole Edilen Tuza Dayanıklı Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Önal, G., 2004. "Ülke Kalkınmasında Madenciliğin Önemi", Park Grup Çalışma Raporu. Ankara.
- Önal, G., 2007. Meram-Çayırbağı (Konya) Ve Sarıkavak (Mersin) Manyezit Yataklarının Jeokimyasal İncelemesi Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Önem, Y., 1996. Sanayi madenleri: Tanımlar, doğada bulunuşları, Dünya ve Türkiye rezervleri, yıllık üretimleri, ihraç ve ithal miktarları. Kozan Ofset, Ankara, 368.
- Özkan, H., 2009. Erzurum Çevresinde Biyolojik Bozulmaya Neden Olan Heterotrofik Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Tanısı. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Özkök, M. A., 2005. Stratejik Hammaddeler Ve Türkiye. Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Gebze.

- Perry, T. D., Duckworth, I. V., McNamara, O. W., Martin, C. J., Mitchell, S. T. R., 2004. Effects of the biologically produced polymer alginic acid on microscopic calcite dissolution rates. *Environ. Sci. Technol.* 38, 3040–3046.
- Raschman, P., Spakova, M., Fedorockova, A., 2010. Effect of hydrochloric acid concentration on the selectivity of leaching of high-calcium dead-burned magnesite. *Acta Montanistica Slovaca Rocnik*, 15(3), 232-237.
- Rulkens, W., Grotenhuis, J. and Tichý, R. 1995. *Heavy metals*, Springer, 165-191.
- Sand, W., Gehrke, T., Jozsa, P.-G. and Schippers, A., 2001. (Bio) chemistry of bacterial leaching—direct vs. indirect bioleaching. *Hydrometallurgy*, 59 (2), 159-175.
- Sariiz, K. ve Nuhoğlu, İ., 1992. *Endüstriyel hammadde yatakları ve madenciliği*. Anadolu Üniversitesi.
- Saygılı, H., Sahin, F. ve Aysan Y., 2006. *Fitobakteriyoloji, Meta Basım Matbaacılık*, İzmir, Türkiye, pp 550.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. and Van Dijck, P., 2002. On the safety of *Aspergillus niger*—a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 59 (4-5), 426-435.
- Seifelnassr, A. and Abouzeid, A., 2000. New trends in mineral processing: Exploitation of bacterial activities. *Ore Dressing*, 4, 17-41.
- Sertkaya, G., 2007. *Kolemanit Atıklardan Biyoliç Yöntemi İle Borik Asit Eldesi*. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Üniversitesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Adana.
- Sever, E., 2006. *İskenderun Demir Çelik Fabrikası Atıklarına Biyoliç Uygulaması*. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Sha-Sha, F., Pei-Jun, L., FENG Qian, F., Xiao-Jun, L., Peng, L., Yue- Bing, S., and Yang, C., 2011. Soil Quality Degradation in a Magnesite Mining Area. *Pedosphere*, 21(1), 98–106.
- Sulu-Gambari, F., 2011. *Bacterially-Induced Dissolution of Calcite: The Role of Bacteria in Limestone Weathering*. McGill University, Department of Earth & Planetary Science.
- Takmak, T., 2007. *Beylikova Manyezit Açık Ocağının Üretim Planlaması*. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- TBMM, 2010. "Araştırma Komisyonu Rapor" Madencilik Sektöründe Sorunların Araştırılarak Alınması Gereken Önlemlerin Belirlenmesi, Ankara, 781 s.
- Temiz, A., 2000. *Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri*. Hatipoğlu Yayınevi, Ankara.
- Tipre, D.R., Vora, S.B., Dave, S.R., 1999. Comparative copper and zinc bioextraction at various stages of scale up using *Thiobacillus ferrooxidans* consortium. In: Amils, R., Ballester, A. (Eds.), *Proc. International Biohydrometallurgy Symposium on Biohydrometallurgy and the Environment towards the Mining of the 21st Century, Part A*. Elsevier, Amsterdam, pp. 219 – 229.
- TMMOB, 2011. *Maden Mühendisleri Odası Madencilik Sektörü Ve Politikaları Raporu.*, "Doğal Kaynakların Gerçek Sahibi Halktır", 47s.
- TOBB, 2007. *Türkiye Odalar ve Borsalar Birliği, Türkiye Madencilik Sektör Raporu.*, TOBB, Ankara.

- Toprak, Y., 2006. Yukarıtirtar-Aşağıtirtar Köyleri (Isparta Kuzeydoğusu) Arasında Gözlenen Manyezit Yatağının Oluşumu Ve Kökeni. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Toprak, Y., 2006. Yukarıtirtar-Aşağıtirtar Köyleri (Isparta Kuzeydoğusu) Arasında Gözlenen Manyezit Yatağının Oluşumu ve Kökeni. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Torun, M. ve Avşaroğlu, N., 2008. Dünya Madencilikinin Son On Yılında (1998-2008) Metal Fiyatlarındaki Değişmeler ve Nedenleri. <http://www.belgeler.com>, (15.07.2012).
- Tuna, İ. K., 2011. Stratejik ve Kritik Madenlere İlişkin Küresel Politikalar Çerçevesinde Türkiye'deki Stratejik ve Kritik Madenlerin Ulusal Güvenliğe Etkileri, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Sosyal Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale, 215 s.
- Vandevivere, P., Welch, S., Ullman, W. and Kirchman, D., 1994. Enhanced dissolution of silicate minerals by bacteria at near-neutral pH. *Microbial ecology*, 27 (3), 241-251.
- Ventosa, A., Quesada, E., Rodríguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F. & Ramos-Cormenzana, A., 1982. Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. *J Gen Microbiol.*, 128, 1959–1968.
- Yanmış, D., 2014. Düşük Kaliteli Manyezit Rezervlerinin Biyoteknolojik Yöntemlerle Zenginleştirilmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Yersel, G. ve Ayday, C., 1992. Kütahya Turanoçağı ve Ortaocak Manyezit Bölgeleri Sondaj Verilerinin Jeostatistiksel Yöntemlerle Değerlendirilmesi. *Türkiye Jeoloji Bülteni*, 35, 25-33.
- Yıldız, R. ve Köse, A. 2002. Madencilik yatırım projelerinin hazırlanması, değerlendirilmesi ve Manyezit ocağına Uygulanması, Ankara.
- Zhang, Y. and Geider, K., 1997. Differentiation of *Erwinia Amylovora* strains by pulsed-field Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4421-4426.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında İstanbul'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2008 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden 2012 yılında mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.