

**AFŞİN-ELBİSTAN LİNYİT MADENİNDEN LİNYİT
İYİLEŞTİRME TEKNOLOJİSİNDE KULLANILMA
POTANSİYELİNE SAHİP MİKROORGANİZMALARIN
İZOLASYONU VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Selma SEZEN

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Zooloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE
2015
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**AFŞİN-ELBİSTAN LİNYİT MADENİNDEN LİNYİT İYİLEŞTİRME
TEKNOLOJİSİNDE KULLANILMA POTANSİYELİNE SAHİP
MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

Selma SEZEN

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Zooloji Bilim Dalı**

**ERZURUM
2015**

Her hakkı saklıdır




T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü
TEZ ONAY FORMU



Afşin-Elbistan Linyit Madeninden Linyit İyileştirme Teknolojisinde Kullanılma Potansiyeline Sahip Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Moleküler Karekterizasyonu

Prof.Dr.Medine GÜLLÜCE danışmanlığında, **Selma SEZEN** tarafından hazırlanan bu çalışma, **06/07/2015** tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **Biyoloji** Anabilim Dalı Zooloji Bilim Dalı'nda **Yüksek Lisans tezi** olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof.Dr.Medine GÜLLÜCE

İmza : 

Üye : Doç.Dr.Hatice ÖĞÜTÇÜ

İmza : 

Üye : Doç.Dr.Özlem BARIŞ

İmza : 

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu **20.08/2015** tarih ve **23 / . / 1170** nolu kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

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

AFŞİN-ELBİSTAN LİNYİT MADENİNDEN LİNYİT İYİLEŞTİRME TEKNOLOJİSİNDE KULLANILMA POTANSİYELİNE SAHİP MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Selma SEZEN

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Zooloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

Bu çalışmada, Afşin-Elbistan Linyit Madeninden linyit örnekleri alınarak maden ekosisteminde yer alan bakteri ve küflerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen izolatların tanı ve karakterizasyonu konvensiyonel (morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler) ve 16S rDNA PCR ve ITS PCR moleküler yöntemlerine dayanılarak yapılmıştır. Bu amaçla yapılan izolasyon çalışmalarında 17 farklı bakteri ve 19 farklı küf izole edilmiştir. Sekans analizleri sonucu izole edilen bu bakterilerden 2 tanesinin *Streptomyces galilaeus*, 1 tanesinin *Streptomyces argenteolus*, 2'sinin *Pseudomonas mandelii*, 2'sinin *Bacillus pumilus*, 1 tanesinin *Methylobacterium zatmanii*, 1 tanesinin *Kocuria polaris*, 1 tanesinin *Streptomyces thermocarboxydus*, 6 tanesinin *Arthrobacter sp.* ve 2 tanesinin *Rhodococcus sp.* türlerine ait olduğu belirlenmiştir. Küf izolatlarının ise 6 tanesi *Aspergillus sp.*, 2 tanesi *Aspergillus niger*, 2 tanesi *Aspergillus flavus*, 1 tanesi *Aspergillus flavipes*, 2 tanesi *Alternaria sp.*, 1 tanesi *Alternaria consortialis*, 3 tanesi *Penicillium sp.*, 1 tanesi *Penicillium polanicum* ve 1 tanesinin *Penicillium pimateouiense* olduğu belirlenmiştir.

2015, 112 sayfa

Anahtar Kelimeler: Linyit Kömürü, Temiz Kömür Teknolojisi, Bakteri, Küf, İzolasyon, 16S rDNA PCR, ITS PCR.

ABSTRACT

Master Thesis

ISOLATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF MICROORGANISMS WITH USAGE POTENTIAL FOR LIGNITE ENRICHMENT TECHNOLOGY FROM AFŞIN-ELBİSTAN LIGNITE MINE

Selma SEZEN

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Science of Zoology

Supervisor: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

In the present study, lignite samples were collected from Afşin-Elbistan lignite ore and bacterial and fungal microorganisms of the ore ecosystem were isolated. The isolates were identified by conventional (morphological, physiological and biochemical tests) molecular assay systems (16S rDNA PCR and ITS PCR). Thus, in the present study 17 bacteria and 19 fungi strains were isolated. According to the bacterial sequence data, 2 isolates were assigned to *Streptomyces galilaeus*, 1 isolate to *Streptomyces argenteolus*, 2 isolates to *Pseudomonas mandelii*, 2 isolates to *Bacillus pumilus*, 1 isolate to *Methylobacterium zatmanii*, 1 isolate to *Kocuria polaris*, 1 isolate to *Streptomyces thermocarboxydus*, 6 isolates to *Arthrobacter sp.* and 2 isolates to *Rhodococcus sp.* Furthermore, according to the fungal sequence data, 6 isolates were assigned to *Aspergillus sp.*, 2 isolates to *Aspergillus niger*, 2 isolates to *Aspergillus flavus*, 1 isolate to *Aspergillus flavipes*, 2 isolates to *Alternaria sp.*, 1 isolate to *Alternaria consortialis*, 3 isolates to *Penicillium sp.*, 1 isolate to *Penicillium polanicum* and 1 isolate to *Penicillium pimateouiense*.

2015, 112 pages

Keywords: Lignite Coal, Clean Coal Technology, Bacteria, Fungi, Isolation, 16S rDNA PCR, ITS PCR.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji laboratuvarında yürütülmüştür.

Araştırmalarımın tüm aşamalarında maddi ve manevi desteğini esirgemeyen kıymetli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE'ye ve Biyoloji Bölüm Başkanım Sayın Prof. Dr. Ökkeş ATICI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Örneklerin Afşin-Elbistan Linyit İşletmelerinden alınması hususundaki yardımlarından dolayı Afşin-Elbistan Termik Santral B İşletme müdürü Sayın Durdu KILIÇ'a, çalışmalarımın her aşamasında yanımda olan manevi ve fikri desteğini esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Mehmet KARADAYI'ya, Sayın Doç. Dr. Özlem BARIŞ'a, çalışmalarım sırasında maddi ve manevi desteklerinden dolayı dostlarım ve çalışma arkadaşlarım Sayın Uzm. Biy. Ceyda BOZOĞLU'na, Sayın Uzm. Biy. Selin HÜNDÜR'e, kıymetli ağabeyim ve çalışma arkadaşım Sayın Biyolog Emrullah AKSAKAL'a ve Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji Laboratuvar ekibine teşekkür ederim.

Bu güne kadar yaptığım tüm işlerimde her zaman yanımda olan dostum, arkadaşım, biricik annem Hanife GÖNCÜ'ye maddi manevi desteklerinden ve emeklerinden dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Selma SEZEN

Haziran, 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.....	6
2.1. Maden ve Madencilik.....	6
2.2. Dünya ve Türkiye Madenleri	8
2.3. Önemli Maden Kaynaklarından Birisi Olarak Kömür	9
2.4. Kömür Çeşitleri	10
2.4.1. Turba	12
2.4.2. Linyit	12
2.4.3. Alt nitümlü kömür	13
2.4.4. Bitümlü kömür (Taş kömürü).....	14
2.4.5. Antrasit	14
2.5. Kömürün Kullanım Alanları	14
2.5.1. Kömürün termik santrallerde elektrik enerjisi üretiminde kullanımı.....	15
2.5.2. Kömürün çimento sanayinde kullanımı	17
2.5.3. Şeker sanayiinde kömür tüketimi	18
2.5.4. Tuğla sanayiinde kömür tüketimi.....	18
2.5.5. Linyitlerin gübre olarak kullanımı	18
2.5.6. Kömürün ev yakıtı olarak tüketimi	19
2.6. Dünyada Kömür	19
2.6.1. Dünya antrasit rezervleri	21
2.6.2. Dünya linyit rezervleri.....	21
2.7. Türkiye’de Kömür	22
2.8. Afşin-Elbistan Linyit İşletmeleri.....	25

2.9. Kömür İyileştirme Teknolojileri	27
2.10. Kömür İyileştirme Teknolojilerinde Kullanılabilecek Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Tanınmasına Yönelik Yaklaşımlar	29
2.10.1. Koloni morfolojisi	31
2.10.2. Hücre morfolojisi	31
2.10.3. Bakterilerin gram özellikleri	31
2.10.4. Katalaz, oksidaz, amilaz, jelatinaz, kazein ve tween 80 hidroliz redüksiyon testleri.....	32
2.10.5. PCR tekniği ile gen amplifikasyonu.....	34
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	36
3.1. Linyit Madeninden Örneklerin Alınması	36
3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar	36
3.1.2. Kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı	37
3.2. Yöntem	41
3.2.1. Linyit madeni mikroflorasından bakterilerin izolasyonu ve muhafazası	41
3.2.2. İzole edilen mikroorganizmaların morfolojik testleri	41
3.2.2.a. Hücre morfolojisi.....	41
3.2.2.b. Hücre boyutlarının belirlenmesi	42
3.2.2.c. Gram reaksiyon testi	42
3.2.2.d. Endospor varlığının ve hücre içindeki yerinin belirlenmesi	43
3.2.2.e. Kapsül testi	43
3.2.2.f. Hareketlilik testi.....	44
3.2.2.g. Kültür özelliklerinin belirlenmesi	44
3.2.3. Fizyolojik testler.....	44
3.2.3.a. İzolatların gelişme sıcaklıklarının belirlenmesi.....	44
3.2.3.b. İzolatların gelişebildikleri pH aralıklarının belirlenmesi	45
3.2.4. Biyokimyasal testler	45
3.2.4.a. Katalaz testi	45
3.2.4.b. Oksidaz testi	45
3.2.4.c. Amilaz testi.....	46
3.2.4.d. Jelatinaz testi	46
3.2.4.e. Kazein hidroliz testi.....	46

3.2.4.f. Tween 80 hidrolizi	47
3.2.5. Moleküler testler.....	47
3.2.5.a. Bakteri İzolatlarının bazı genetiksel özelliklerinin belirlenmesi	47
3.2.6. Linyit madeni mikroflorasından fungus izolasyonu ve muhafazası.....	52
3.2.6.a. Stok kültürlerin alınması	52
3.2.6.b. Fungus hücresinden genomik DNA'ların izolasyonu	52
3.2.6.c. Fungus Genomik DNA'sı için jel elektroforezi ve görüntüleme	54
3.2.7. ITS PCR protokolü.....	54
3.2.7.a. Reaksiyonun hazırlanması.....	54
3.2.7.b. ITS PCR programı.....	55
3.2.7.c. PCR ürünlerinin analizi	55
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	56
4.1. Linyit Madeni Mikroflorasından Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Muhafazası.....	56
4.2. İzole Edilen Bakterilerin Morfolojik Testleri.....	56
4.3. İzolatların Fizyolojik Test Sonuçları	58
4.4. 16S rRNA PCR Amplifikasyon Sonuçları	60
4.5. Bakteri İzolatların 16S rRNA Gen Bölgelerinin Baz Dizileri.....	61
4.6. ITS PCR Amplifikasyon Sonuçları	62
4.7. Küf İzolatlarının Mikroskopik İncelemeleri.....	62
4.8. Fungal İzolatların 18S rDNA Gen Bölgelerinin Baz Dizileri	64
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	65
KAYNAKÇA.....	72
EKLER.....	76
EK 1.....	76
EK 2.....	77
EK 3.....	78
EK 4.	79
EK 5.....	80
EK 6.	81
EK 7.....	82
EK 8.	83

EK 9.....	84
EK 10.....	85
EK 11.....	86
EK 12.....	87
EK 13.....	88
EK 14.....	89
EK 15.....	90
EK 16.....	91
EK 17.....	92
EK 18.....	93
EK 19.....	94
EK 20.....	95
EK 21.....	96
EK 22.....	97
EK 23.....	98
EK 24.....	99
EK 25.....	100
EK 26.....	101
EK 27.....	102
EK 28.....	103
EK 29.....	104
EK 30.....	105
EK 31.....	106
EK 32.....	107
EK 33.....	108
EK 34.....	109
EK 35.....	110
EK 36.....	111
EK 37.....	112
ÖZGEÇMİŞ	113

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
DEKTMK	Dünya Enerji Konseyi Türk Milli Komitesi
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNA	Deoksiribonükleotik asit
dNTP	Deoksinükleotittrifosfat
DPT	Devlet Planlama Teşkilatı
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
IEA	Uluslararası Enerji Ajansı
ISO	Uluslararası Standartlar Örgütü
KI	Potasyum iyodit
KOH	Potasyum hidroksit
L	Litre
M	Molar
MIS	Mikrobiyal tanılama sistemi
ml	Mililitre (10 ⁻³)
MTA	Maden Tetkik ve Arama Genel Müdürlüğü
N	Normal
NA	Nutrient Agar

NaCl	Sodyum klorit tuzu
NAS	Nutrient Agar + sükroz
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
TBMM	Türkiye Büyük Millet Meclisi
TE	Tris-EDTA tamponu
TCEB	Türkiye Cumhuriyeti Ekonomi Bakanlığı
Tris-HCl	Trihidroksimetil amino metan-hidroklorik asit
tRNA	Transfer RNA
TKİ	Türkiye Kömür İşletmeleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kömür oluşumu	10
Şekil 2.2. Kömür çeşitleri	12
Şekil 2.3. Türkiye linyit sahaları rezerv haritası	13
Şekil 2.4. Türkiye 2011 yılı kaynak bazlı elektrik enerjisi kurulu gücü.....	16
Şekil 2.5 Türkiye'deki çimento fabrikaları	17
Şekil 2.6. 2009 yılı ülkelerin kömür rezervleri	20
Şekil 2.7. 2009 Yılı Ülkelerin Antrasit Rezervleri	21
Şekil 2.8. 2009 yılı ülkelerin linyit rezervleri	22
Şekil 2.9. Afşin-Elbistan termik santrali ve linyit sahasının genel görünüşü	26
Şekil 2.10. Afşin-Elbistan linyit sahası.....	26
Şekil 2.11. Afşin-Elbistan linyit sahasında linyitin toprak katmanları arasındaki görünümü	27
Şekil 4.1. Bakteri izolatlarının 16S rRNA PCR elektroforez sonuçları.....	61
Şekil 4.2.Küf izolatlarının ITS PCR elektroforez sonuçları	62
Şekil 4.3. Bazı Küf izolatlarının mikroskop görüntüleri.....	63

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Madenlerin sınıflandırılması.....	7
Çizelge 2.2. Kömür rank sınıflaması	11
Çizelge 2.3. Elektrik üretiminde Türkiye'deki termik santrallerin tüketim ve kurulu güç kapasitesi	16
Çizelge 2.4. Türkiye'de linyit rezervlerinin bölgesel dağılımı ve ortalama kimyasal özellikleri	24
Çizelge 4.1. Bakteri izolatların morfolojik özellikleri	57
Çizelge 4.2. Bakteri izolatların katı ve sıvı kültür özellikleri	57
Çizelge 4.3. Bakteri izolatların pH özellikleri	58
Çizelge 4.4. Bakteri izolatların sıcaklık özellikleri.....	59
Çizelge 4.5. Bakteri izolatların biyokimyasal test sonuçları.....	60

1. GİRİŞ

Maden, diğer adıyla cevher yer kabuğunda iç ve dış doğal etkenlerle oluşan, ekonomik yönden değer taşıyan minerallere verilen addır. Yer kabuğu heterojen ve anizotrop yapıdadır. Bu heterojenite yer kabuğunun ilk oluşumundan itibaren jeolojik tarih boyunca geçirdiği jeotektonik evrimden kaynaklanır. Geçirdiği evrime ve süresine bağlı olarak yerkürenin sahip olduğu maden kaynakları şekillenmektedirler (TBMM 2010; Bal 2012).

İnsanlığın tarihi madenciliğin tarihiyle eşdeğer kabul edilebilir, insanoğlu önce çevresiyle ilgilenmiş değişik renk ve ağırlıktaki taşları keşfetmiştir. Bilinen tarihi kayıtlara göre milattan 7000 yıl önce Anadolu'da madenler eritilip işlenmiştir. M.Ö. 2000-1200 yıllarında Hititler demiri eritip çeşitli aletlerin yapımında kullanmışlardır. Nitekim yapılan kazı çalışmalarından elde edilen bilgilere göre, Hitit Krallığı atölyelerinde Firavunlar adına süs eşyaları da imâl edilmiştir (Turan 1983).

Boğazköy civarında yapılan kazılarda Hitit Krallarına ait ticarî bir mektup bulunmuştur. Bu mektupta Asur Krallarından veya Firavunlardan birine istediği demirin teslimi hakkında cevap verilmekte, iyi cins demir imâl etmeleri için emir verildiği, imalât biter bitmez gönderileceği, gecikme sebebinin kötü hava şartlarından kaynaklandığı uzun uzun izah edilmektedir. Ayrıca mektuba bir de demir numunesinin eklendiği anlaşılmaktadır. Bu bilgiler ışığında madenciliğin çok uzun süre önce ortaya çıktığını ve günümüze değin çıkarılması ve işlenmesi hususunda gelişiminin devam ettiği açıkça görülmektedir (Topkaya ve Bircan 1968).

Madencilik faaliyetlerinin gelişmesi ve maden tüketim miktarı, ülkelerin sanayi faaliyetleri ve ekonomik gelişmişliğiyle doğru orantılıdır. Yaşadığımız yüzyıl göz önüne alındığında elektrik ihtiyacı başta olmak üzere sanayi, alt yapı, savunma, bilim, eğitim ve birçok alanda hammadde ihtiyacı madenlerden sağlanmaktadır. Buna bağlı

olarak sahip olduğumuz kullanılabilir hammadde miktarı, bunların ticari kullanımı ve ihracı, ülke ekonomik güçlerini ve siyasi konumlarını doğrudan etkilemektedir.

Maden rezervlerinde büyük payları olduğu gibi dünya maden üretiminde de önemli rol oynayan ülkelerin başında ABD, Çin, Güney Afrika, Kanada, Avustralya ve Rusya gelmektedir (TCEB 2012).

Dünyada 132 ülke arasında toplam maden üretim değeri itibarıyla 28'inci sırada yer alan ülkemiz, maden çeşitliliği açısından ise 10'uncu sırada bulunmaktadır. Başta endüstriyel hammaddeler olmak üzere, bazı metalik madenler, linyit ve jeotermal kaynaklar gibi enerji hammaddeleri açısından ülkemiz zengindir. Ancak birkaç maden dışında dünya ölçeğindeki rezervlerimiz kısıtlıdır. Ülkemiz 50 çeşit madende kısmen yeterli kaynaklara sahipken, 27 maden ve mineralin günümüzde bilinen rezervleri ve kaliteleri ekonomik madencilik için yetersizdir. Bu tablo değerlendirildiğinde ülkemizin, maden kaynakları ve çeşitliliği bakımından kendi kendine kısmen yeterli olan ülkeler arasında yer aldığı söylenebilir. Dünya endüstriyel hammadde rezervlerinin %2,5'i; kömür rezervlerinin %1'i; jeotermal potansiyelinin %0,8'i, mermer rezervlerinin %33'ü ve metalik maden rezervlerinin %0,4'ü ülkemizde bulunmaktadır. Ülkemizin zengin olduğu madenler arasında ilk sırayı dünya rezervlerinin %72'sini oluşturan bor mineralleri almaktadır. Bor dışında trona (doğal soda), kaya tuzu, sodyum sülfat, perlit, ponza, feldspat, bentonit, barit, manyezit, alçı taşı, stronsiyum tuzları, zeolit, sepiyolit, mermer ve doğal taşlar, kuvars, kuvarsit, zımpara taşı gibi endüstriyel hammaddeler ile boksit ve krom gibi metalik madenler ve linyit gibi enerji hammaddeleri ülkemizin zengin kaynaklara sahip olduğu başlıca madenlerdir (TBMM 2010).

Türkiye'deki rezervi yetersiz veya çeşitli yöntemlerin kullanılmasıyla iyileştirilmesine ihtiyaç duyulan önemli mineral kaynakları olarak; bakır, manganez, grafit, boya toprakları, kurşun, alüminyum, maden kömürü, zirkon, çinko, arsenik, talk, titan, demir, kükürt, mika, nikel, fosfat, kil mineralleri gelmektedir. Zengin mineraller arasında ise; sepiyolit, fluorit, kireçtaşı, gümüş, altın, bentonit, trona, asbest, zımpara taşı, krom,

molibden, boksit, sodyumsülfat, zeolit, profilit, kuvars-kuvarsit ve kömür türevleri sıralanmaktadır (Özkök 2005; DPT 2007; Tuna 2011).

Bu madenler arasında özellikle, ülkemizde bulunan kömür türevleri günümüz ve gelecekteki ulusal enerji ve buna bağlı ekonomi politikalarımızın sürdürülebilmesi için ayrı bir öneme sahiptir. Bilinen en eski ve en yaygın kullanım alanına sahip fosil yakıtlar içerisinde yer alan kömür; homojen olmayan, kompakt, çoğunlukla lignoselülozik bitki parçalarından meydana gelen, tabakalaşma gösteren, içerisinde çoğunlukla karbon, az miktarda hidrojen, oksijen, kükürt ve azot elementlerinin bulunduğu, bununla birlikte değişik miktarlarda 60 kadar elementi içeren, inorganik maddeleri de içeren, bataklıklarda oluşan, siyah renk tonlarında, yanabilen, katı fosil organik kütle olarak tanımlanmaktadır (Tao *et al.* 2010).

Sınıfına göre farklı kullanım imkanları olan kömür madenleri, dünya çapında genellikle termik santrallerde elektrik enerjisi elde edilmek için kullanılmaktadır. Yakın zamanda yapılan çalışmalar, dünya geneli kömür tüketiminde benzer uygulamaların %62'lik oranla birinci sırada olduğunu açıkça göstermektedir. Bununla beraber, küresel enerji ihtiyacını karşılamaya yönelik mevcut olan bu durum, dünya üzerinde dağılım gösteren kömür rezervlerinin miktarı ile doğrudan sınırlandırılmaktadır (Aktaş 2011).

Kömür kalitesi doğrudan bu madenin yapısı ile ilişkili olup, kömür türlerinin tanımlanması için yapılan sınıflandırmalarda organik ve inorganik madde içerikleri temel alınmaktadır. Bu sınıflandırmaya "Kömür Rank Sınıflandırması" adı verilir ve buna göre kömürler en kaliteliden daha düşük kaliteli olanına doğru antrasit, bitümlü, alt bitümlü ve linyit olarak gruplandırılmaktadır (Aktaş 2011; TKI 2011).

Anadolu, jeolojik açıdan genç bir yarım ada olmasına karşın, Türkiye'nin hemen hemen her bölgesinde kömür oluşumlarına rastlanmaktadır. Bununla birlikte yakın dönem coğrafik oluşuma ait olan bu kara parçasında ekonomik açıdan daha düşük değere sahip olan linyit madenine rastlanması şaşırtıcı değildir. Ülkemizde en büyük linyit rezervi 3,5 milyar ton ile Elbistan'da bulunmaktadır. Diğer büyük rezervler Orta ve Kuzey Batı

Anadolu ve Ege bölgesindedir. Linyit rezervi açısından zengin bir ülke olmamıza karşın ekonomik değerli linyitlerimizin miktarı oldukça azdır. Nem ve kül içeriği yüksek olan, düşük ısı değerli linyitlerin miktarı ise toplam rezervlerin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Bu bölgelerden elde edilen daha yüksek kalitedeki linyitler ev ısıtmasında ve endüstride kullanılmakta, daha düşük kalitedeki linyitler ise daha çok termik santrallerde kullanılmaktadır (Hayta 2010).

Uluslararası Enerji Ajansı (IEA) raporları, 2009 yılından itibaren dünya kömür rezervinin 723 milyar tonu taş kömürü ve 277,5 milyar tonu da linyit olmak üzere 1 trilyon ton civarında olduğunu göstermiştir. Ülkemizde ise yaklaşık 1,3 milyar ton taş kömürü ve 9,8 milyar tonu görünür rezerv niteliğinde olan toplam 11,5 milyar ton linyit rezervi bulunmaktadır. Bu veriler göz önüne alındığında ülkemizin temel kömür türünü oluşturan linyit madeninin, dünya linyit rezervleri içerisinde %5,9'luk bir paya sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca yakın zamanda yeni kömür rezervlerini ortaya çıkarmaya yönelik yapılan girişimler sonucunda mevcut rezerv miktarı artış göstermiş ve 2011 yılı için ülke çapında 76 milyon tonluk üretim göz önüne alındığında bu rezervlerin 174 yıl yetebileceği öngörülmüştür (Aktaş 2011; TKI 2011).

Önemli bir enerji kaynağı olan fosil yakıtların mevcut miktarlarına rağmen sınırlı rezerve sahip olmaları, oluşumlarının milyonlarca yıllık bir süreci kapsamaları ve ulusların hali hazırda artan enerji ihtiyaçları göz önüne alındığında mevcut kaynakların en verimli ve temiz şekliyle kullanılması gerekliliği, ülkelerin ekonomileri ve sağlık politikalarıyla doğrudan örtüşmektedir. Bu çerçevede fosil yakıtların temiz ve verimli kullanımıyla ilgili teknolojiler 1900'lü yıllardan beri geliştirilmektedir. Bu teknolojiler fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemlerden oluşmaktadır. Fiziksel olarak öğütme (küçük parçalara ayırarak kömürü toprak bileşenlerinden ayırma) şeklinde yapılan bu işlemler, kimyasal yıkama yöntemleriyle de hem atık minerallerden ayrıştırma hem de yakıldığında çevreye zarar veren kükürtlü bileşiklerin uzaklaştırılması şeklinde uygulanmaktadır.

Biyolojik teknolojiler ise yapısındaki bitki ve hayvan kalıntıları itibariyle organik kökenli olan kömür çeşitlerinin, özellikle de daha genç ve daha çok zayıf bağ içeriğine sahip düşük kaliteli linyitlerin mikroorganizmalar tarafından biyolojik olarak işlenebilir nitelikte olması nedeniyle ilk defa 1981 yılında Fakoussa tarafından uygulanmıştır (Laborda *et al.* 1997; Gökçay *et al.* 2001; Başaran *et al.* 2003; Selvi *et al.* 2009; Aksan 2010). Devam eden kömürün verimliliğinin arttırılması ve temiz kömür teknolojisi araştırmaları, kömürün organik bileşiklerden oluşan yapısı göz önüne alındığında mikroorganizmaların bu çalışmalar için kullanılmasının ucuz, temiz, doğal ve yüksek verimlilik sağladığını ortaya koymuştur. Ülkemiz madenleri de son 20 yılda benzer çalışmalara kaynak oluşturmasına karşın Türkiye de aktif olarak çalışan kömür (liniyit) madeninin mikrobiyal florası incelenmemiştir.

Literatürdeki bu eksikliğin giderilmesine katkı sağlanabilmesi için planlanan bu çalışma ile Afşin-Elbistan Linyit işletmelerinin çalışma sahasından alınan linyit örnekleriyle madenin doğal florasının belirlenmesi ve izole edilen mikrobiyal floranın tanı ve moleküler karakterizasyonlarının yapılması ile bilim dünyasına sunulması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Maden ve Madencilik

Yerkürede elementlerin özel şartlar altında (ısı, nem, kimyasal ve biyolojik aktiviteler vb.) bir araya gelmesiyle mineraller oluşur. Doğada ekonomik değeri olan taşlar ise mineral madenler olarak tanımlanırlar. Birikim yapan cevherler yerkürede heterojen yapılar oluştururlar bu yapılar da maden yatağı olarak isimlendirilirler. İnsan yeryüzünde var olduğu tarihten bu yana maden kaynaklarını kullanmış bilimsel ve teknolojik gelişimini yeni kaynakların keşfi ve farklı kullanımları doğrultusunda ilerletmiştir. Bununla birlikte maden yataklarının milyonlarca yıllık kalıntı yığınları değil aktif biyolojik sistemler olduğu unutulmamalıdır (Kural 1998).

Maden yatakları, kimyasal bileşen bakımından, yerkabuğunun ortalama kimyasal bileşimine oranla oldukça farklı kimyasal bileşime sahip, bazı elementlerin ise yerkabuğundaki olağan miktarına göre belirgin bir şekilde zenginleşmiş oldukları yerlerdir. Bu zenginleşme gelişi güzel olmayıp kademeli olarak artmakla birlikte her maden yatağından çıkarılan cevher birbirinden kesinlikle farklıdır (Kural 1998; TKİ 2013).

Madenler kendi fiziksel ve kimyasal özelliklerine, kullanıldıkları sektörlere göre çeşitli biçimlerde sınıflandırılabilirler. En yalın halde madenlerin sınıflandırılması Çizelge 2.1'deki gibidir (Bal 2012).

Çizelge 2.1. Madenlerin sınıflandırılması (Bal 2012)

Madenler					
Enerji Kaynağı Olan Madenler	Enerji Kaynağı Olmayan Madenler				
	Metal madenler			Sanayi maddeleri	
Ham petrol	Temel metaller	Diğer metaller	Demir-çelik ham maddeleri	Taş ocak ve inşaat malzemeleri	Endüstriyel hammaddeler
Doğal gaz	Altın	Kalay	Demir	Traverten	Kil
Bitümlü şist	Gümüş	Pirit	Magnezyum	Mermer	Bentonit
Taş kömürü	Bakır	Civa		Diyabaz	Kaolen
Linyit	Kurşun	Titan		Kalter	Manyezit
Asfaltit	Çinko	Vanadyum		Granit	Bor tuzları
Uranyum	Alüminyum	Arsenik		Kalsit	Barit
		Antimuan		Dolomit	Zımpara
		Molibden		Bazalt	Kükürt
		Kobalt			Fosfat
		Tellür			Alunit
		Platin			Tuz
		Krom			Diatomit
		Tantal			Perlit
		Bizmut			Trona
					Asbest
					Grafit

2.2. Dünya ve Türkiye Madenleri

Dünya maden üretiminde önemli paya sahip ülkelerin başında ABD, Çin, Güney Afrika, Kanada, Avustralya ve Rusya gelmektedir. Bununla birlikte maden grubuna girmeyen petrol ve ürünlerinin üretiminde Suudi Arabistan, İran, Kuveyt, Rusya ve Türkî Cumhuriyetler önemli miktarda rezerve sahiptir. Dünya ticaretinde madencilik ürünleri arasında ihracat değerlerine göre ham petrol, demir dışı metaller ve endüstriyel mineraller önemli yere sahiptir. Dünya ticaret rakamları incelendiğinde çelik, bakır, kurşun ve kalay gibi geleneksel metallerin kullanımı düşerken, ileri seramik malzemeleri, plastik ve polimer kökenli malzemeler gibi yüksek teknoloji ürünü malzemelerin kullanımının giderek arttığı görülmektedir. Madencilik sektörü birçok endüstrinin ilk tedarikçisi olması nedeniyle küresel ekonominin temel taşlarından biridir. Örneğin dünya ekonomisinin ilk sırasında yer alan ülkelere biri olan ABD’de maden ve madencilğe dayalı sanayilerin toplam üretimi yıllık 27,6 milyar dolar olup ABD ekonomisine sağladığı toplam katma değer 2,28 trilyon dolara kadar ulaşabilmektedir. Yine dünya madenciliğinde önemli bir yere sahip olan Kanada’da ise toplam madencilik üretimi 2009 yılında 45,3 milyar dolar civarında olup, sektörden elde edilen vergi geliri ise yıllık 13,5 milyar dolar civarındadır (TBMM 2010).

Ülkemiz karmaşık jeolojik ve tektonik yapısı nedeniyle çeşitli maden yataklarını sınırları içerisinde bulundurmaktadır. Bugün dünyada yaklaşık 90 çeşit maden üretimi yapılırken bunlardan 60’ının üretimi ülkemizde yapılmaktadır. MTA verilerine göre, dünyada 132 ülke arasında maden çeşitliliği açısından 10’uncu sırada yer alan ülkemiz toplam maden üretim değeri açısından 28’inci sırada bulunmaktadır.

Ülkemiz başta endüstriyel hammaddeler olmak üzere, bazı metalik madenler, linyit ve jeotermal kaynaklar gibi enerji hammaddeleri bakımından zengindir. Dünya endüstriyel hammadde rezervlerinin %2,5’i; kömür rezervlerinin %1’i; jeotermal potansiyelinin %0,8’i ve metalik maden rezervlerinin %0,4’ü ülkemizde bulunmaktadır. Ülkemizde zenginlik bakımından ilk sırayı alan maden dünya rezervlerinin de %72’sini oluşturan

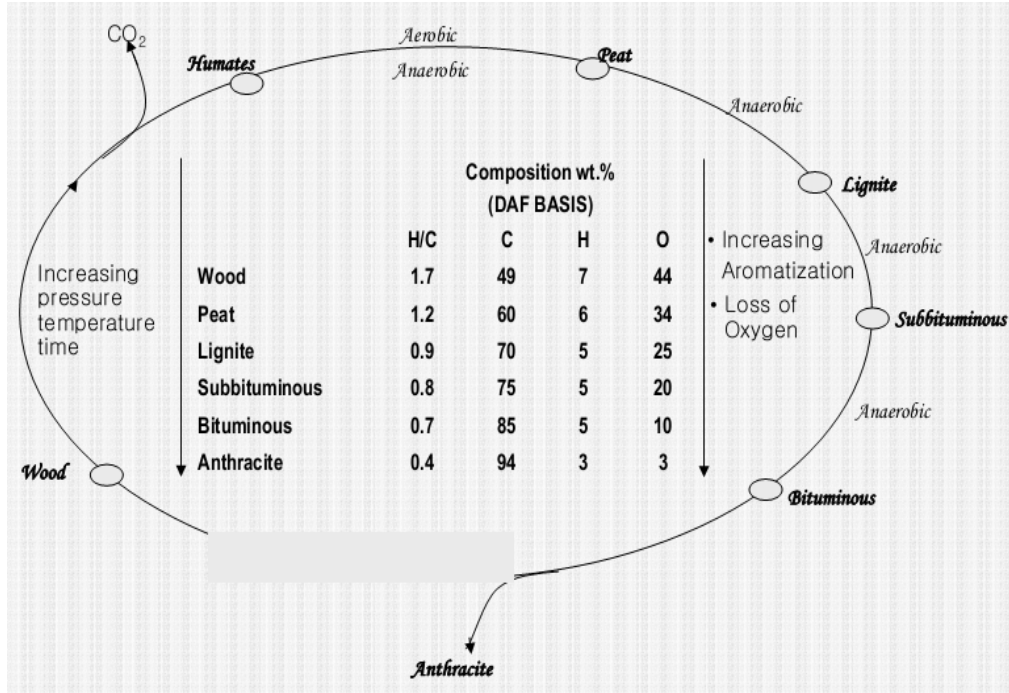
bor mineralleridir. Diğer maden çeşitlerinde ise birkaç maden dışında dünya ölçeğindeki rezervlerimiz oldukça kısıtlıdır.

Dünyada üretimi ve ticareti yapılan 90 çeşit maden ve mineralden 13'ünün ekonomik ölçekteki varlığı ülkemizde henüz saptanamamışken, ülkemizde bulunan 50 çeşit maden ise nispeten yeterli kaynaklara sahiptir. Bununla birlikte 27 maden ve mineralin bilinen rezervleri ve kaliteleri, ekonomik madencilik için yetersizdir. Ülkemizin, maden kaynakları ve çeşitliliği bakımından kendi kendine yeterli olan ülkeler arasında yer aldığı söylenebilirse de mevcut kaynakların iyileştirilerek daha verimli kullanılması, öncelikli politikalarımız arasında yer almaktadır (TBMM 2010).

2.3. Önemli Maden Kaynaklarından Birisi Olarak Kömür

Kömür önemli enerji kaynakları arasında yer alan tortul bir kayadır. Başlıca karbon, hidrojen ve oksijen gibi elementlerin bileşiminden oluşmuş olup, diğer kaya tabakalarının arasında damar haline de milyonlarca yıllık sürede ısı, basınç ve mikrobiyolojik aktiviteler sonucunda meydana gelmiştir (Kural 1998).

Her bir kömürün bileşimi ve karakteri, onu oluşturan organik ve inorganik bileşenlerin oranı, çeşitliliği ve geçirdiği diyajenezin (taşoluş) derecesiyle tanımlanmaktadır. Kömürler, humik kömürler ve sapropelik kömürler olmak üzere 2 temel gruba ayrılırlar. Humik kömürler, çoğunlukla kömürleşmiş bitki parçalarından oluşur ve bantlı bir görünüme sahiptirler. Ülkemizde yer alan bitümlü kömürler ve linyit yatakları humik kömürler grubunda yer almaktadırlar. Sapropelik kömürler ise homojen bir görünüme sahiptirler ve alg, bitki veya bitki sporlarının kömürleşmesiyle oluşurlar (Şekil 2.1). Sapropelik kömürler kolay tutuşabilme özelliklerinden dolayı mum kömürü diye de isimlendirilirler (Kural 1998).



Şekil 2.1. Kömür oluşumu

Kömürün oluşumuna bakıldığında turba, bir kömür çeşidi olmamasına rağmen kömür oluşumunun ilk evresini oluşturur. Turbanın jeolojik zamanlar içerisinde artan-azalan sıcaklık değişimleriyle birlikte basınca maruz kalması ve geçirdiği bir dizi fiziksel ve kimyasal reaksiyonun son basamağını antrasit olarak tamamlar. Turbanın, linyit, alt bitümlü kömür ve bitümlü kömür aşamalarından geçerek antrasite dönüşmesi sürecine kömürleşme (coalification) denir.

2.4. Kömür Çeşitleri

Kömür üretimi, kullanımı ve teknolojisinde ileri ülkeler öncelikle kendi kömürlerinin özelliklerine göre bir sınıflama yapmışlar, ancak daha sonra küreselleşen dünyada ülkelerin pazar ihtiyacının karşılanması adına uluslararası genel bir sınıflama için ortak standartlar geliştirilmiştir. Kömürlerin kullanım amaçlarına göre uluslararası sınıflandırılmasında; ilk olarak 1957 yılında çeşitli ülkelerden üyelerin oluşturduğu Uluslararası Kömür Kurulu'na birçok ülkeden temin edilen numuneler üzerinde yapılan çalışmalar sonucu, Uluslararası Standartlar Örgütü (ISO) tarafından da

desteklenen genel bir sınıflama yapılmıştır. Bu sınıflamada; kalori değeri, uçucu madde içeriği, sabit karbon miktarı, koklaşma ve kekleşme özellikleri temel alınarak, kömürler sert (taşkömürü) ve kahverengi (alt-bitümlü ve linyit) kömürler olarak iki ayrı sınıfa ayrılmıştır.

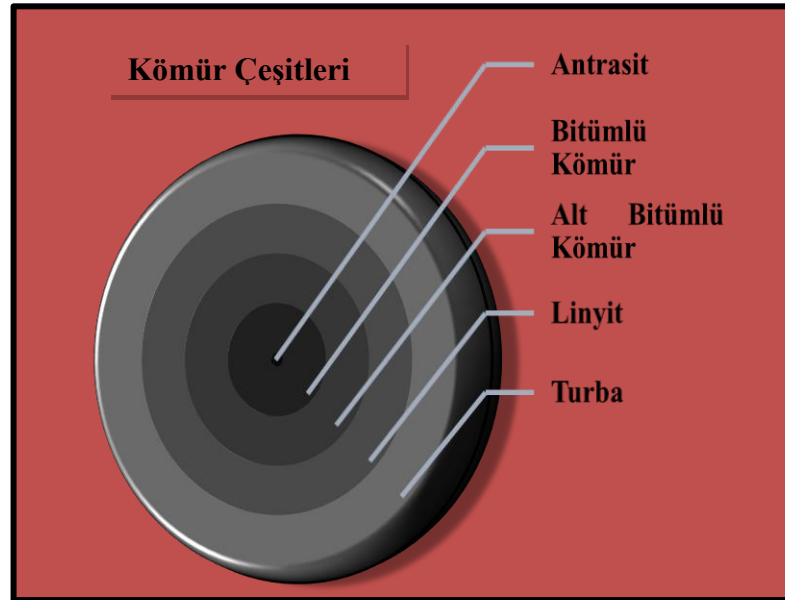
Uluslararası kömür sınıflamasında kabul edilen diğer bir sınıflandırma çeşidi ise Kömür Rank Sınıflamasıdır (Kömürleşme Derecesi Sınıflaması). Bu sınıflamada karbon içeriği temel değişkendir. Yüksek kömürleşme derecesine sahip kömürlerde uçucu madde içeriği, düşük kömürleşme derecesine sahip kömürlerde ise kalorifik değer baz alınarak sınıflandırma yapılmıştır (Çizelge 2.2) (TKİ 2011).

Çizelge 2.2. Kömür rank sınıflaması

Rank (Kömürleşme Derecesi)	Uçucu Madde İçeriği (%Ağırlık, ıslak-külsüz)	Karbon içeriği (%Ağırlık, ıslak- külsüz)	Kalorifik değer (Btu/Lb, Mineral maddesiz)	Nem içeriği (%Ağırlık)
Linyit	69-44	76-62	8.300-6.300	52-30
Alt Bitümlü	52-40	80-71	11.500-8,300	30-12
Bitümlü				
a)Yüksek uçuculu-B	50-29	86-76	13.000-10.500	15-2
b)Yüksek uçuculu-C	50-29	86-76	13.000-10.500	15-2
c)Yüksek uçuculu-A	49-31	88-78	14.000	5-1
d) Orta uçuculu	31-22	91-86	14.000	5-1
e) Düşük uçuculu	22-14	91-86	14.000	5-1
Antrasit	14-2	99-91	14.000	5-1

2.4.1. Turba

Turba oluşumu itibariyle bataklık alanlarda görülen, karbon ve hidrojen içeriği düşük, nem ve oksijen miktarı yüksek henüz kömürleşmeye başlamış fosil yığınlarıdır. Uygun şartlar altında yeterli süre sonunda turba, yüksek kalorili kömür çeşitlerinin orijini oluşturur. Turbadan işlenebilir kömür damarının oluşabilmesi için havanın neden olacağı oksidasyondan korunmuş yeterli miktarda organik madde ve bitkisel materyale ihtiyaç vardır. Aksi takdirde organik tortu havanın serbest oksijeniyle tepkimeye girerek O₂ ve CO₂ açığa çıkar, turba oluşumu engellenir (Kural 1998).



Şekil 2.2. Kömür çeşitleri

2.4.2. Linyit

Linyit fiziksel özellikleri bakımından yumuşak, kolayca ufalanabilen, mat görünümlü kahverengi kömürler diye adlandırılan düşük kalorili kömürlerdir. Linyit kömürlerinin içeriği diğer kömür çeşitlerinde olduğu gibi oluştuğu yatağın organik ve inorganik özelliklerine göre değişim göstermekle birlikte bu kömür çeşidi yüksek nem, oksijen ve yabancı madde içeriğine sahipken enerji değerini belirleyen karbon ve hidrojen

fakirdir. Turbadan sonra yakılarak enerji elde edilebilen kömür sınıfında ilk basamak da yer alan linyit yer küre de en çok bulunan erken dönem kömür çeşididir.

Jeolojik ve doğal yapısı nedeniyle hemen her çeşit enerji kaynağına sahip olan ülkemizde linyit kömürü dışındaki kömür çeşitleri ve diğer fosil rezervleri oldukça kısıtlıdır (Şekil 2.3). Buna bağlı olarak Türkiye de toplam enerji üretimindeki miktarı ve payları da linyit kömüründen daha düşüktür (Ersin 2006).



Şekil 2.3. Türkiye linyit sahaları rezerv haritası

2.4.3. Alt nitümlü kömür

Alt bitümlü kömürler, kömürleşme sürecinde linyit ve taş kömürü (bitümlü kömür) arasında yer alır. Linyitle neredeyse aynı kalorifik değere sahip olan, linyitten farklı olarak nem oranı düşük, nispeten koyu renkli ve daha seyrek gözenek yapısına sahiptir. Alt bitümlü kömürün en önemli özelliklerinden birisi de sentetik petrol üretiminde kullanılabilir yapıda olmasıdır (TKİ 2011).

2.4.4. Bitümlü kömür (Taş kömürü)

Öte yandan “ısıtıldıklarında petrol veren kayaçlar” olarak tanımlanan bitümlü şistler kömürden sonra en önemli alternatif kaynak olarak görülmektedir. Bitümlü şistler, petrol, kömür, doğalgaz gibi diğer kaynaklarla karşılaştırıldığında rezerv bakımından ikinci sırayı almaktadır (TKİ 2010).

2.4.5. Antrasit

Uçucu madde, nem ve kül miktarı düşük, karbon içeriği ve kalori değeri yüksek olan sert kömürlerdir. Kömür oluşumunun son basamağında yer alan bu sert kömürler oluşumlarını yaklaşık 300 milyon yılda tamamlarlar ve dünyada rezervleri sınırlıdır (Kural 1998)

2.5. Kömürün Kullanım Alanları

Bilinen en yaygın ve rezerv bakımından en fazla bulunan fosil yakıt olması nedeniyle kömürün kullanımı eski çağlara dayanmaktadır. Buharlı makinelerin keşfine kadar ısınma, maden ergitme gibi işlemler için doğrudan yakılarak kullanılan kömür, buharlı makinelerin icadı, demir-çelik endüstrisinde kömüre dayalı teknolojilerin kurulmasıyla değer kazanarak sanayi devriminin gerçekleşmesini hızlandırmıştır. Sanayi devriminden sonra artan enerji ihtiyacına paralel olarak kömüre olan ihtiyaçta artmış ve bu durum sanayi ülkelerini yeni maden kaynakları aramaya yöneltmiştir.

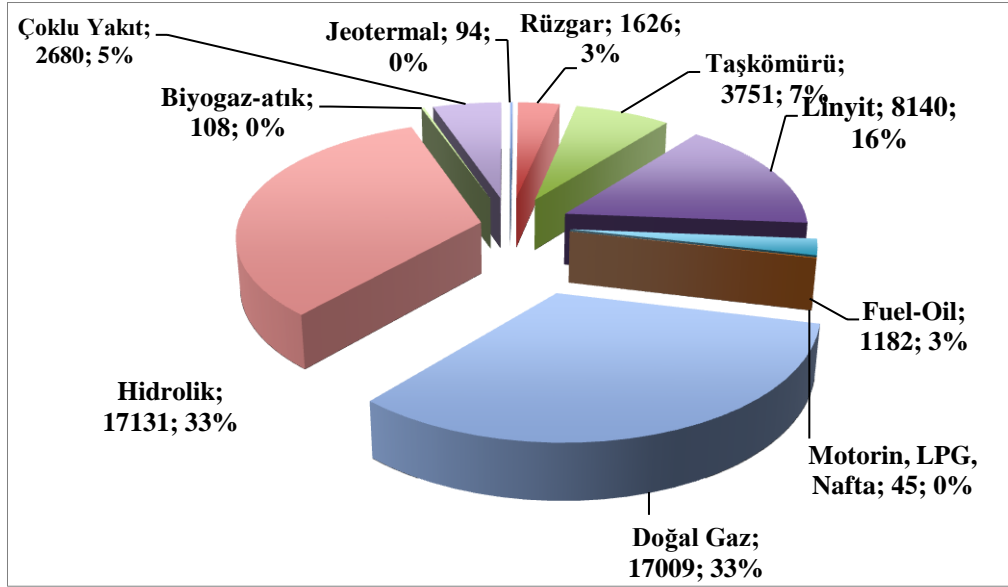
Hollanda, Belçika ve Fransa gibi işçi ücretlerinin fazla olduğu sanayi ülkeleri, maden ocaklarını kapatarak dışarıdan petrol almayı daha ekonomik bulmuşlar ancak 1973 yılı sonrası petrole yapılan zamlar nedeniyle bu ülkeler politikalarını değiştirerek kömür madenlerini yeniden açmışlardır. Gelişmiş kömür rezervleri olan ülkeler (Almanya, ABD, Avustralya gibi) ise petrol ve doğal gazda dışa olan bağımlılıklarını azaltmak için yeni rezervler arama ve kömür teknolojilerini geliştirme adına çalışmalarını hızlandırmışlardır (Kural 1994; MTA 2001).

Anadolu'da taş kömürü 1829 yılında bahriye eri Uzun Mehmet tarafından bulunmuştur. Linyit madenciliğinin tarihi ise çok eskiye dayanmasına rağmen ilk kayda değer gelişmeler 1970'li yıllarda olmuştur. Bu gelişmelerle birlikte linyit madeni bakımından oldukça zengin olan ülkemiz bu fosil yakıt kaynağını öncelikle enerji ihtiyacını karşılamak için kullanmıştır.

2.5.1. Kömürün termik santrallerde elektrik enerjisi üretiminde kullanımı

Elektrik enerjisi üretiminde; termik santrallerden, hidroelektrik santrallerden, nükleer santrallerden ve jeotermal enerji kaynaklarından (güneş, rüzgâr ve dalga enerjisi) yararlanılmaktadır (Şekil 2.1). Ancak enerji verimlilikleri göz önüne alındığında bu kaynaklar arasında en güvenilir ve en yüksek enerji eldesini sağlayan kaynak termik santrallerdir. Hidroelektrik santraller ve jeotermal kaynaklar temiz enerji elde etmemizi sağlayan doğal kaynaklar arasında yer alsalar da enerji verimliliğinin düşük olması ve ülkemizin enerji ihtiyacının giderilmesi ve dışa bağımlılığın azaltılması yönündeki enerji politikalarıyla örtüşmediği bilinmektedir. Enerji verimliliği oldukça yüksek olan nükleer enerji ise meydana gelebilecek kazalar ile çevreye geri dönüşü olmayan hasarlar vermesi nedeniyle güvenli değildir.

1970'li yıllarda ortaya çıkan petrol krizi dünyada ve ülkemizde yeni enerji kaynağı arayışlarına neden olmuştur. Türkiye'nin en büyük kömür yatağı olan Elbistan havzasının 1967 yılında bulunması ve takip eden yıllarda işlenmeye başlamasıyla düşük kaliteli kömürlerin termik santrallerde kullanılması gündeme gelmiş ve hatta uygulanmaya başlamış, ülkenin geri kalanında kömür arama çalışmaları hızlandırılmıştır. Linyit kömürüne dayalı elektrik üretiminin Türkiye'deki tüketim ve kurulu güç kapasitesi Çizelge 2.3'de verilmiştir (Kural 1998; Ersin 2006; TKİ 2009).



Şekil 2.4. Türkiye 2011 yılı kaynak bazlı elektrik enerjisi kurulu gücü (TKİ 2012)

Çizelge 2.3. Elektrik üretiminde Türkiye'deki termik santrallerin tüketim ve kurulu güç kapasitesi

Termik Santraller	Kömür Tüketim Kapasitesi (binton/yıl)	Kurulu Güç (MW)
Muğla-Yatağan	5.350	630
Muğla-Hüsamlar-Kemerköy	5.000	630
Ankara Çayırhan	4.300	620
Muğla-Milas-Sekköy	3.750	420
Kütahya Seyitömer	7.100	600
Kütahya Tunçbilek	2.450	365
Manisa Soma	8.000	1.034
Bursa Orhaneli	1.500	210
Afşin Elbistan A	18.000	1.360
Afşin Elbistan B	18.000	1.440
Sivas Kangal	5.400	450
Çanakkale-Çan	1.800	320
Toplam	80.650	8.079

*Linyit sektör raporu 2010 *MTA

2.5.2. Kömürün çimento sanayinde kullanımı

Çimento sanayisi yüksek miktarda enerji tüketen bir sanayi alanıdır. Çimento sanayisinde kullanılacak nitelikteki kömürün seçiminde kömürün kalorifik değeri, kükürt içeriği ve kül miktarı gibi özelliklerin yanı sıra kömür kaynağının teminindeki süreklilik ve kömür kalitesinin korunması önemlidir. Ülkemizde yakıt maliyetinin düşürülmesi amacıyla düşük kaliteli kömür sınıfında yer alan linyit kullanılmaktadır (Şekil 2.5).

Çimento üretim teknolojisinde, döner fırına aktarılan kömürün yanması ile açığa çıkan kükürt dioksit, büyük oranda çimento hammaddesindeki kireç tarafından tutulsa da kükürt içeriği yüksek olan kömürlerin kullanılması sonucu yeterince tutulamaz ve açığa çıkan kükürt dioksit ve kükürtlü bileşikler çevre kirliliğini olumsuz yönde etkiler (Kural 1998).



Bu harita Türkiye Çimento Müstahsilleri Birliği (TÇMB) tarafından hazırlanmıştır.

Şekil 2.5 Türkiye'deki çimento fabrikaları

2.5.3. Şeker sanayiinde kömür tüketimi

Şeker fabrikalarında kullanılan kömürün ısı değeri en az 2500-3000 kcal/kg olmak zorundadır. Kömürün ısı değerinin düşük olması, kazan kapasitesini olumsuz etkileyerek üretim miktarında düşüğe neden olmaktadır. Bu nedenle kazan içine fuel oil püskürtülmektedir. Ülkemizde, 21 adedi yakıt olarak kömür kullanan toplam 30 adet Şeker Fabrikası bulunmaktadır. Bu fabrikaların yıllık linyit ihtiyaçları ise 900.000 ton civarındadır (Kural 1998; TKİ 2009).

2.5.4. Tuğla sanayiinde kömür tüketimi

Tuğla sanayiinde kullanılan linyit toz haline getirildikten sonra pişirme fırınlarında kullanılır. Fabrikaların üretim kapasitesi dikkate alındığında kullanılan kömürün kalitesi önem arz eder. Bu nedenle tuğla fabrikalarının çoğunda kömür, fuel-oile ek olarak kullanılır. Maliyeti düşürmek için ise linyit, yine tercih edilen fosil yakıtlar arasında ilk sırayı alır (TKİ 2009).

2.5.5. Linyitlerin gübre olarak kullanımı

Linyitin yapısı incelendiğinde toprak humusuna benzer bir yapıyla karşılaşılır, bu yapıdan yola çıkılarak yapılan araştırmalar genç kömürlerin gübre olarak kullanılabilmesi sonucuna ulaşmıştır. Kömür gübresi bitkinin azot ihtiyacının yanı sıra bitki gelişiminde azot kadar önemli karbon yönüyle de beslenmesini sağlar.

Linyit ön işlem görmeksizin toprağa verilebileceği gibi yükseltgenme, amonyaklaşma ve bunların karışımı olan yöntemlerle zenginleştirilerek de kullanılabilir. Ayrıca kömürden humik asit eldesi de bu başlık altında sayılabilecek gübreleme çeşitlerinden biridir. Humik asit eldesinde farklı yöntemler kullanılmakla birlikte bitki gelişimi ve yüksek verim için önemli organik gübre kategorisinde yer alır (Kural 1998).

Kömürün gübre olarak kullanımı toprağın yavaş yavaş beslenmesini sağlar ve hızlı pH değişimlerini önler. Zaman içinde dereceli çözünerek toprağa karışması, şiddetli yağmurlar ve benzeri etkiler sonucunda yeraltı sularına karışmasını önler ve mevcut doğal kaynakları korur (TKİ 2009).

2.5.6. Kömürün ev yakıtı olarak tüketimi

1989 yılından başlayarak günümüze kadar hızla artan kömür ithalatı son yıllarda kullanımını artan doğalgaz nedeniyle azalmış, bu durum ısınma sektöründe linyitin payının gerilemesine neden olmuştur. Isınma sektöründe yeniden kalori değeri düşük, nem ve yabancı madde içeriği yüksek linyitlerin kullanımının artması, ancak emisyonların azaltıldığı, verimin arttırıldığı yöntemlerin uygulanması ile mümkün olacaktır.

Türkiye'nin 2009'da imzaladığı, "Atmosfere salınan sera gazı miktarı %5'e çekilecek, endüstriden, motorlu taşıtlardan, ısıtmadan kaynaklanan sera gazı miktarını azaltmaya yönelik mevzuat yeniden düzenlenecek, daha az enerji ile ısınma, daha az enerji tüketen araçlarla uzun yol alma, daha az enerji tüketen teknoloji sistemlerini endüstriye yerleştirme sağlanacak, ulaşımda, çöp depolamada çevrecilik temel ilke olacak, termik santrallerde daha az karbon çıkartan sistemler, teknolojiler devreye sokulacak" gibi çevreyi korumaya yönelik maddeleri içeren Kyoto protokolü uyarınca değeri düşük, nem ve yabancı madde içeriği yüksek linyitlerin ev yakıtı ve sanayi kollarında kömür iyileştirme teknolojileri yöntemleriyle işlem görmeksizin kullanılması uygun değildir (TKİ 2009).

2.6. Dünyada Kömür

Dünya Kömür Rezervleri;

18. yüzyıl ortalarında İngiltere'de sanayi devriminin başlaması ile kömür, dünya ekonomisindeki yerini almıştır. Buhar gücünün ulaşım ve sanayide kullanılmaya

başlanılması ile kömür tüketimi hızla artmış, dünya nüfusunun artması ile paralel olarak artan elektrik ihtiyacının karşılanması ve ısınmadaki rolü ile birlikte kömür, ülkelerin enerji ihtiyacını karşılayan en önemli kaynaklardan biri haline gelmiştir. Sanayi devriminin gerçekleşmesinde ana faktör olan ve günümüzde de önemini hala koruyan kömür, yeterince kaynağı olan ve bu kaynağı uygun biçimde değerlendirebilen ülkelerin gelişmiş ülkeler seviyesine ulaşmasında önemli rol oynamıştır (Şekil 2.6).

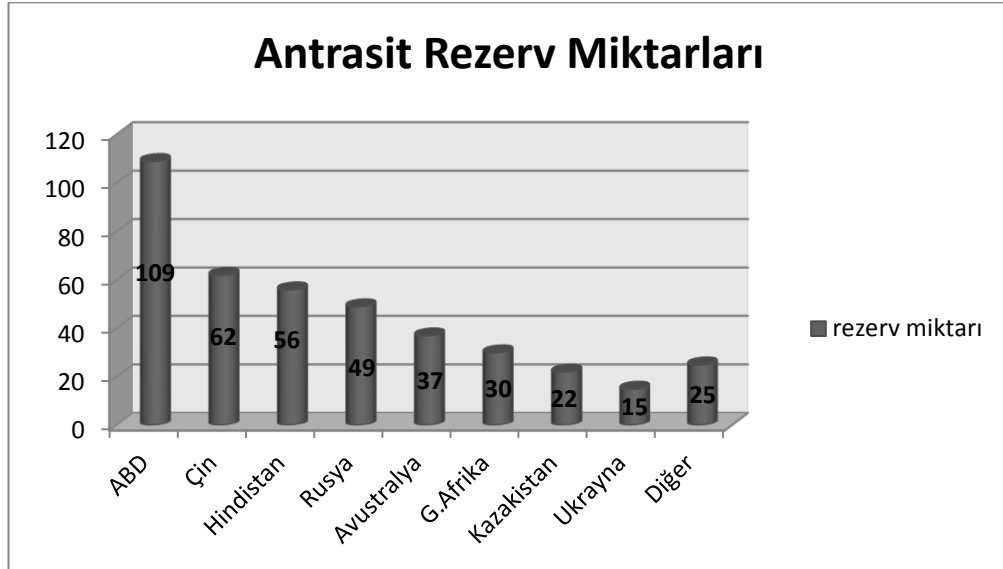
Dünya kömür rezervlerinin miktarı 2000 yılı raporlarına göre yaklaşık 992.000.000.000 ton olarak belirlenmiştir. Bu rezerv miktarının kömür çeşitlerine göre yüzdeleri oranı; antrasit ve bitümlü kömür %51,36, linyit ve alt-bitümlü kömür %48,64'tür. Toplamda 482.542.000.000 tonluk dünya linyit ve alt-bitümlü kömür rezervinin %73,4'ü dört ülkede toplanmıştır. Bu ülkelerin sahip oldukları linyit ve alt-bitümlü kömür rezervinin yüzdesi ise; Almanya %8,9, eski SSCB %27,5, ABD %28,1, Avustralya %8,9 şeklindedir. Kalori değeri yüksek antrasit ve bitümlü kömürün 509.470.000.000 tonluk dünya rezervinin %87,6'sı eski SSCB %19,1, Çin %12,2, Hindistan %14,3, ABD %21,9, Güney Afrika Cumhuriyeti %10,9, Avustralya %9,3 şeklinde olmak üzere 6 ülkede toplanmıştır (DEKTMK 2012; TKİ 2011-2013).



Şekil 2.6. 2009 yılı ülkelerin kömür rezervleri (DEKTMK 2012)

2.6.1. Dünya antrasit rezervleri

Antrasitin toplam dünya rezervi 404 milyar tondur (2009). ABD, 109 milyar tonluk rezerviyle dünya antrasit rezervlerinin %27'sine sahip iken, Çin 62 milyar ton ile %15, Hindistan 56 milyar ton ile %14, Rusya 49 milyar ton ile %12, Avustralya 37 milyar ton ile %9,2, G. Afrika 30 milyar ton ile %7,4, Kazakistan 22 milyar ton ile %5,4. Ukrayna 15 milyar tonla %3,7 ve diğer ülkeler ise 25 milyar tonla %6,2'sine sahiptirler. Antrasit rezerv kaynakları bakımından zengin ülkelerin 2009 yılında belirlenmiş rezerv miktarları Şekil 2.7'de verilmiştir (TKİ 2011; DEKTMK 2012).

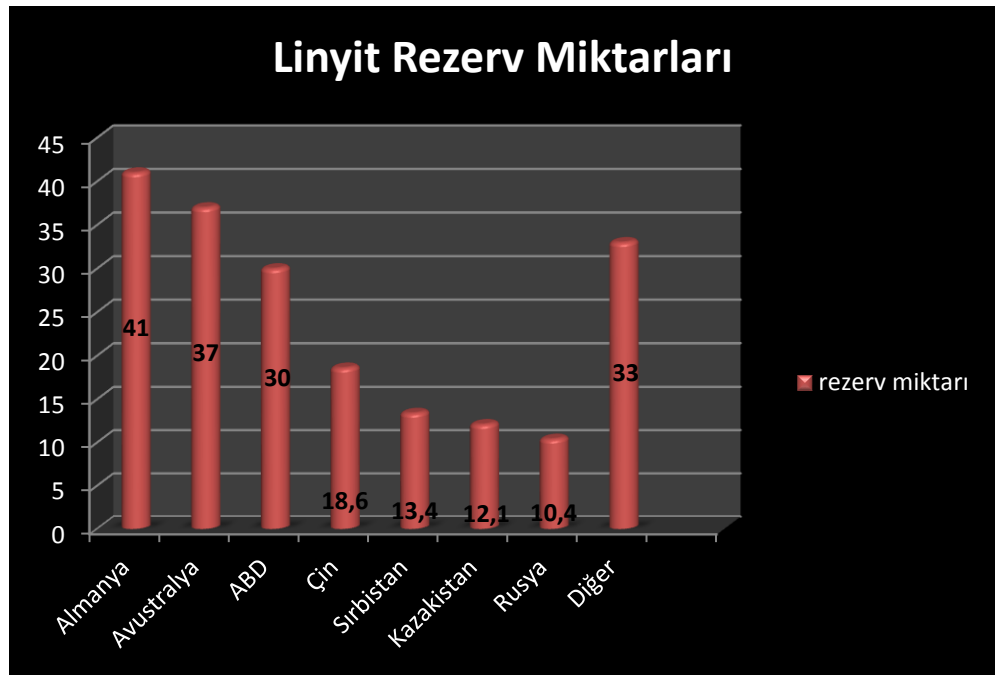


Şekil 2.7. 2009 Yılı Ülkelerin Antrasit Rezervleri (DEKTMK 2012)

2.6.2. Dünya linyit rezervleri

195 milyar ton olan Dünya linyit rezervlerinin en önemli ekonomik üretim payı 40,6 milyar ton ile Almanya'da bulunmaktadır. Avustralya'nın üretim payı 37 milyar ton, ABD'nin 30 milyar ton Çin'in 18,6 milyar ton, Sırbistan'ın 13,4 milyar ton, Kazakistan'ın 12,1 milyar ton ve Rusya'nın 10,4 milyar tondur. Linyit üretiminin neredeyse tamamı açık ocaklarda yapılmaktadır. Linyit büyük oranda elektrik

üretiminde kullanılırken, bazı ülkelerde endüstride ve ev ısınmasında kullanılmaktadır. Çek Cumhuriyeti, bazı Eski Yugoslavya Ülkeleri ve Yunanistan gibi bazı ülkelerde elektrik üretiminin yarısından fazlasında linyit kömürü kullanılmaktadır. Almanya, Avustralya, Macaristan ve Polonya gibi ülkelerde de elektriğin önemli bir kısmı linyit kömüründen elde edilmektedir. Linyit bakımından zengin ülkelerin 2009 yılında belirlenmiş rezerv miktarları Şekil 2.8’de verilmiştir (DEKTMK 2012; TKİ 2011).



Şekil 2.8. 2009 yılı ülkelerin linyit rezervleri (DEKTMK 2012).

2.7. Türkiye’de Kömür

Ülkemizde enerji tüketimi son yirmi yılda %112 artış gösterirken, bu artışın %53’lük kısmının son on yıl içerisinde gerçekleşmesi dikkat çekicidir. Buna karşın enerji üretimimizin son on yılda sadece %31,6 oranında arttırılabilmesi, ülkemiz enerji arz güvenliğinin sürdürülebilmesi açısından oldukça dramatiktir.

Veriler daha detaylı incelendiğinde, enerji üretimimizdeki artış hızının, enerji tüketimindeki artış hızından çok daha geride olduğu açıkça görülmektedir. Diğer bir

deyişle, yerli üretimin tüketimi karşılama oranı yirmi yıl önce %47,3 ve on yıl önce %31 düzeyindeyken söz konusu oran 2012 yılı itibariyle %26,6'ya kadar düşmüştür.

Benzer şekilde yerli kömür üretiminin enerji tüketimini karşılama oranında da gerileme söz konusudur. Bu oran, 1992 yılında %21,4, 2002 yılında %14,5 düzeyindeyken 2012 yılında %14,2 şeklinde belirlenmiştir. Kaynaklarımızdan karşılayamadığımız enerji ihtiyacı ithalatla giderilmeye çalışılmıştır. 2012 yılı itibariyle ülkemizdeki enerji tüketiminin %26,6'sı yerli enerji kaynaklarından elde edilirken, %73,4 gibi önemli bir kısmı ise ithal kaynaklardan sağlanmış ve bu durum ülkemizi enerjide dışa bağımlı hale getirmiştir. Mevcut durum, ulusumuzun geleceği için bu dışa bağımlılığın sona erdirilmesine katkı sağlayacak bilimsel ve teknolojik çalışmaların gerekliliğine vurgu yapmaktadır. Bu hususta Türkiye'yi enerjide dışa bağımlılıktan kurtarabilecek politikalar irdelendiğinde mevcut enerji israfının azaltılması, mevcut kaynakların yeni rezervlerinin bulunması, alternatif enerji kaynaklarının araştırılması ve özellikle de mevcut rezervlerimizin iyileştirme teknolojileriyle işlenerek çok daha verimli bir şekilde kullanılabilmesi konularına dikkat çekildiği görülmektedir (Özel 2006).

Taşkömürü Rezervleri; Türkiye'nin en önemli taşkömürü rezervleri Zonguldak ve civarındadır. Zonguldak havzasında yapılan çalışmalar sonucunda 1,1 milyar ton rezerv saptanmış ve bu rezervin yaklaşık 423 milyon tonunun görünür nitelikte olduğu belirlenmiştir. Havza, Karadeniz Ereğli'den başlayarak Kandilli, Zonguldak, Amasra, Pelit ovası, Azdavay ve Söğütözü'nü de içine alan bölgeyi kapsamaktadır.

Havzada çok sayıda kömür damarı olmakla birlikte günümüzde 22 damar işletilebilmektedir. Bölgede bulunan kömürün ortalama kimyasal özellikleri; %55 sabit karbon, %26 uçucu madde, %11 kül, %8 nem, ısı değeri ise, 6.000 kcal/kg'dir.

Zonguldak havzası dışında Antalya-Pamucak yaylası ve Akseki İlçesi Güzelsu ve Çukurköy mevkiinde yaklaşık 1 milyon ton görünür rezervli sahalardan Diyarbakır-Hazro ilçesindeki yaklaşık 400.000 ton rezervli sahalarda da taşkömürü bulunmakla

birlikte bu sahalar işlenebilirliği ve rezerv miktarları açısından Zonguldak ve çevresindeki havzayla kıyaslandığında oldukça önemsizdir (DEKTMK 2012).

Linyit Rezervleri; Linyit ülkemizin bütün bölgelerine yayılmış olup ısı değerleri 1.000–5.000 kcal/kg arasında değişmektedir. Toplam linyit rezervlerimizin yaklaşık %6,9'u 3.000 kcal/kg'ın üzerinde, %13,2'si 2.500-3.000 kcal/kg arasında, %79,9'u ise 2.500 kcal/kg'ın altında ısı değerine sahiptir. Ülkemizin en önemli linyit rezervleri Güney-Orta Anadolu Bölgesi'nde bulunan Kahramanmaraş'ın Afşin-Elbistan ilçeleri çevresinde bulunmaktadır. Çizelge 2.4 ülkemizdeki linyit rezervlerinin bölgesel dağılımı ve ortalama kimyasal özelliklerini özetlemektedir (DEKTMK 2012; TKİ 2013).

Çizelge 2.4. Türkiye'de linyit rezervlerinin bölgesel dağılımı ve ortalama kimyasal özellikleri (Madencilik Özel İhtisas Komisyonu Raporu 2001)

BÖLGELER	REZERV (109 ton)	NEM (%)	S (%)	KÜL (%)	AİD (kcal/kg)
KUZEY-BATI ANADOLU BÖLGESİ (Kütahya-Balıkesir-Bursa-Manisa- Çanakkale)	1,80	20,0	1,7	20	3.500
İÇ ANADOLU BÖLGESİ (Ankara-Konya-Çankırı-Çorum- Yozgat-Sivas)	1,45	30,0	3,2	25	3.000
DOĞU ANADOLU BÖLGESİ (Bingöl-Erzincan-Erzurum-Van)	0,20	20,0	1,2	20	3.000
GÜNEY BATI ANADOLU BÖLGESİ (Aydın-Muğla-Denizli-Isparta- Burdur- Afyon)	0,90	30,0	2,0	20	2.500
TRAKYA BÖLGESİ (Tekirdağ-Edirne-Kırklareli- İstanbul)	0,40	30,0	3,0	20	2.500
GÜNEY-ORTA ANADOLU BÖLGESİ (Adana-K.Maraş)	3,50	50,0	2,0	20	1.200
TOPLAM	8,25	36,5	2,1	21	2.240

2.8. Afşin-Elbistan Linyit İşletmeleri

Akdeniz Bölgesinde yer alan Kahramanmaraş ilinin ilçeleri olan Afşin ve Elbistan; tarım, sanayi ve yeraltı zenginlikleri bakımından önemli ilçelerdir. Yeryüzü şekilleri genellikle Güneydoğu Torosların uzantıları olan dağlarla bunlar arasında kalan çöküntü alanlarından oluşmaktadır. İl kapsamındaki dağlar Alp-Himalaya sistemi kıvrım dağlarıdır.

MTA Genel Müdürlüğünün endüstriyel hammaddelere yönelik yaptığı çalışmalar sonucunda Afşin ve Elbistan ilçelerinde %98 CaCO₃, %0.1 SiO₂ ve %0.50 MgO içerikli kireçtaşı sahaları ortaya çıkarılmış, bunlardan, Elbistan Mırmırın Dere ve Tepekuzu sahalarının toplam görünür ve muhtemel rezervi 10³ milyon ton olduğu belirlenmiştir. Bu sahalardan elde edilen kireçtaşları termik santralde hammadde olarak kullanılmaktadır.

Elbistan, Ekinözü ve Göksun ilçelerinde demir oluşumlarına da rastlanmaktadır ancak bunlar genellikle küçük boyutlu oluşumlardır ve ekonomik değerleri yoktur. Afşin-Elbistan civarındaki zengin linyit potansiyeli, il sanayisinde önemli rol oynayan Afşin-Elbistan Termik santralinin linyit ihtiyacını karşılamaktadır (Şekil 2.1) (MTA 2005).

Ülkemiz kömür rezervlerinin en önemli kısmını Kahramanmaraş ilinin Afşin ve Elbistan ilçelerinden elde edilen Afşin-Elbistan linyitleri oluşturmaktadır. 120 km²'lik alana yayılmış olan 3.357 milyar ton kapasiteli Afşin-Elbistan linyitlerinin nem, kül, kükürt ve mineral madde içerikleri yüksek (nem içeriği %50, kül içeriği %20, kükürt içeriği %1,5), ısıl değeri (alt ısıl değeri ise 8,7 MJ/kg) düşüktür (Resim 2.3 ve Resim 2.4) (Özel 2006). Mevcut bu değerler, ülkemizin en önemli enerji kaynağı olan linyit rezervlerimizin daha verimli kullanılabilmesi için kömür iyileştirme teknolojilerinden faydalanılması gerekliliğine işaret etmektedir.



Şekil 2.9. Afşin-Elbistan termik santrali ve linyit sahasının genel görünüşü



Şekil 2.10. Afşin-Elbistan linyit sahası



Şekil 2.11. Afşin-Elbistan linyit sahasında linyitin toprak katmanları arasındaki görünümü

2.9. Kömür İyileştirme Teknolojileri

Kömür hazırlama ve iyileştirme teknolojileri; kömürün kullanım amacına yönelik olarak kırma/öğütme, eleme/boyutlandırma, susuzlaştırma, yıkama işlemlerinden oluşmaktadır. Bu teknolojiler, kömür oluşum sürecinde ve üretim sırasında kömürün yapısına karışan inorganik kirleticilerin (kül oluşumuna neden olan mineraller ve piritik kükürt gibi) bir kısmının kömürden uzaklaştırılmasını ve/veya nem oranının düşürülerek kalori değerinin yükseltilmesi süreçlerini içermektedir. Kömür hazırlama yöntemleri, genel olarak fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Ancak son yıllarda bu hazırlık sürecine, alternatif veya destekleyici teknolojilerin geliştirilmesine olanak sağlayacak biyolojik uygulamalar da katılmıştır.

Fiziksel temizleme yöntemleriyle, kömürün üretimi sırasında oluşan şist, kil kum gibi istenmeyen organik ve inorganik maddelerin veya piritik sülfürün kömürden uzaklaştırılması sağlanır. Bu süreç genellikle sulu ortamda, kömür ve istenmeyen

maddeler arasındaki yoğunluk farkından faydalanılarak yapılır. Öğütülen kömür yıkandığında, daha ağır olan istenmeyen parçacıklar dibe çökerek kısmen de olsa kömürün kirleticilerinden arınması sağlanır. Ancak bu yöntem kömürde bulunan organik sülfürün uzaklaştırılmasında işe yaramaz. Kömürün yapısındaki organik kükürdü uzaklaştırmak için kimyasal yöntemlerden biri olan erimiş-yakıcı özütleme tekniği kullanılır. Organik sülfürün çözünmesini sağlayan kimyasal çözeltilerin kömüre uygulanması şeklinde gerçekleştirilir.

Biyolojik temizleme yöntemleri ise başta kömürdeki sülfürlü bileşikler olmak üzere çeşitli istenmeyen diğer kirletici faktörlerin mikroorganizmalar kullanılarak uzaklaştırılmasıdır. Oluşumu itibariyle canlı kalıntılarında meydana gelen ve organik yapılı bir maden çeşidi olan kömürün mikroorganizmalar kullanılarak iyileştirilmesi ilk olarak 1981 yılında Fakoussa ve arkadaşları tarafından, kömür sıvılaştırılma denemelerinde mikroorganizmaların kullanılmasıyla başarılmıştır. Takip eden yıllarda bilim insanları kömürün sıvılaştırılmasının yanı sıra kömürden sülfürlü bileşiklerin ve nemin uzaklaştırılması, kömürün kalorifik değerini artırılması için kömüre mikroorganizmaları veya bu mikroorganizmalardan elde ettikleri bazı enzimleri uygulamışlardır. Oldukça yeni olmasına rağmen biyolojik yöntemler fiziksel ve kimyasal yöntemlerden daha temiz bir yöntem olarak dikkat çekmektedir. Fiziksel ve kimyasal yöntemde olanın aksine biyolojik yöntemlerde kirleticiler bir yerden bir yere ayrılmaz, mikroorganizmalara besin maddesi olarak sunulur ve karşılığında mikroorganizma, kirleticileri uzaklaştıracak enzimleri ve çevreye daha az zararlı metabolitleri salgılar. Buna ek olarak mikrobiyal aktivite kömürdeki nem miktarını düşürerek verimi artırmaktadır (DEKTMK 2012).

Dünyada mikroorganizmalar kullanılarak yapılan desülfürizasyon çalışmalarına bakıldığında; *Aspergillus* sp. ile muamele edilen yüksek sülfür içeriğine sahip Hindistan kömürlerindeki sülfürlü bileşenlerin %70-80 oranında maden yapısından uzaklaştırılabileceği sonucuna varılmıştır (Acharya *et al.* 2005). Yine ülkemizde yapılan benzer bir çalışmada da Tunçbilek'ten elde edilen yüksek sülfür içerikli (%2,59) linyitlerin, *Trametes versicolor* fungusu ile muamelesi sonucunda maden örneğindeki

mevcut sülfürün %40 oranında azaltılabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmada özellikle pH, sıcaklık, ortamdaki kömür yoğunluğu ve inkübasyon zamanı gibi parametrelerin verimi doğrudan etkilediğine ve daha iyi sonuçların elde edilebilmesi için yapılacak optimizasyon çalışmalarının gerekliliğine dikkat çekilmiştir (Aytar vd., 2008). Ülkemiz linyit örneklerinin kullanıldığı bir başka biyolojik desülfürizasyon çalışmasında ise mikrobiyal kaynaklı lakkaz enzimi uygulaması örneklerin kalori değerini değiştirmezken, optimize edilen şartlar altında sülfür emisyonunu piritik sülfür için %35, sülfat için %13 ve organik sülfür için de %25 oranında azaltmıştır (Aytar vd., 2011). Bu konudaki güncel veriler, kömürün çevresel zararlarının azaltılmasını öngören benzer çalışmaların sayısının dünya genelinde artmakta olduğunu ve yapılan uygulamalarla sadece kömür kirleticilerinin uzaklaştırılmayıp aynı zamanda ısıl değerin de arttığını göstermektedir (Aytar vd 2008; Aytar vd 2011; Gonsalvesh *et al.* 2011; Chou *et al.* 2012).

Tüm bu literatür verilerine rağmen biyolojik kömür iyileştirme yöntemleri Türkiye’de ya bilimsel çalışmalarla sınırlı kalmış ya da yapılan çalışmalar hazır suşlar satın alınarak gerçekleştirildiği için saha uygulamasına geçilememiştir. Bu durum madenlerimizin floralarının belirlenmesi yönündeki eksikliği ortaya çıkarmış ve maden florası belirleme üzerine yapılabilecek çalışmaların önünü açmıştır.

2.10. Kömür İyileştirme Teknolojilerinde Kullanılabilecek Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Tanılanmasına Yönelik Yaklaşımlar

Kömür iyileştirme teknolojilerinde mikroorganizmaların kullanımı, dünyada neredeyse bir asır önce başlamış olmasına karşın ülkemizde son birkaç yıldır çalışmalara konu olmuştur. Kömür yapı itibariyle çoğunlukla fosil bitki kalıntılarının oluşturduğu organik yapılı bir cevherdir. Özellikle linyit ve alt bitümlü kömür gibi henüz oluşumunu tamamlamamış kömür örnekleri mikroorganizma faaliyetlerine izin verecek miktarda organik yük içermektedirler. Kömür oluşum evreleri incelendiğinde mikroorganizmaların kömürün oluşumunda da önemli rol aldığı görülmektedir. Bununla birlikte her kömür maden sahasının içeriğindeki organik yükün çeşidinin ve miktarının

farklı olması, kömürün yapısını, içeriğini ve kalitesini değiştirmesi nedeniyle her maden yatağından çıkarılan kömür örneği yapı itibariyle kesinlikle birbirinden farklıdır.

Bu bilgiler ışığında kömürün iyileştirilmesi amacıyla kullanılacak en uygun mikroorganizmaların, iyileştirilmesi planlanan maden ocağının florasından seçilebileceği gerçeği ortaya çıkar. Bu şekilde yürütülecek çalışmalarda maden florasından izole edilecek mikroorganizmaların, iyileştirme teknolojilerindeki verimliliklerinin yüksek olmasının yanı sıra bu mikroorganizmaların en doğru biçimde tanınması da çalışmanın güvenilirliği ve sürdürülebilirliği açısından oldukça önemlidir. Mikroorganizmaların tanınmasının doğru şekilde yapılabilmesi için geliştirilmiş birçok farklı tanılama sistemi mevcuttur.

Mikroorganizmaların tanınması modern mikrobiyoloji gelişene dek klasik yöntemler kullanılarak yapılmıştır. Mikroorganizmaların morfolojik (hücre şekli, büyüklüğü, hareketliliği, flagel oluşturup oluşturmadığı, spor oluşturup oluşturmadığı, hücresel inklüzyonlar, renk, koloni morfolojisi, Gram boyanma özelliği), biyokimyasal, fizyolojik ve patolojik özelliklerinin belirlenmesini içeren klasik metodlar konvensiyonel yöntemler olarak adlandırılmıştır. Bitki ve hayvanlarla karşılaştırıldığında, mikroorganizmaların morfolojileri ve klasik yöntemlerle tanılama teknikleri kesin bir sınıflandırmaya temel oluşturacak güvenilirlikte değildir.

Bu yöntemler daima alternatif ya da destekleyici tanı sistemlerine ihtiyaç duyması, uzun zaman ve işgücü gerektirmesi, tanının daha çok cins düzeyinde olması ve az sayıda fenotipik özellik tespit edilmesi nedeniyle, mikroorganizmalar arasındaki farklılıkları ortaya koymada özellikle de tür ve tür altı taksonomik grupların belirlenmesinde yetersiz kalması gibi dezavantajlara sahiptir. Buna rağmen klasik tanılama yöntemleri mikrobiyolojinin temelini oluşturması, klasik testler olmaksızın mikroorganizmaların metabolik aktivitelerinin belirlenemeyeceği ve moleküler testlerin maliyetli olması nedeniyle klasik testlerin yetersiz kaldığı alanlar moleküler testlerle desteklenerek mikrobiyologlar tarafından hala kullanılmaktadır.

2.10.1. Koloni morfolojisi

Bakteri ve küfler gelişimlerine izin verecek besin ve mineral madde içeriğine sahip katı besiyerlerinde geliştirilirse kendilerine özgü koku, renk ve şekillerde gelişim gösterirler. Bu gelişim öğeleri mikroorganizmaların genetik kontrolü altında kalıtılır ve türe bağlı olarak değişiklik gösterir. Mikroskop olmaksızın çıplak gözle görülen gelişim özellikleri mikroorganizmaların tanınmasının ve tanılanmasının ilk basamağını oluşturması nedeniyle oldukça önemlidir (Hasenekoğlu 2001; Bal 2012).

2.10.2. Hücre morfolojisi

Bakteri ve küflerin şekil, boyut ve çaplarının belirlenmesi mikrobiyoloji biliminde önemli bir yer tutar. Oldukça küçük canlılar olan mikroorganizmalar hücre yığınları oluşturmadıkları sürece gözle görülemezler. Hücre olarak gözlemlenebilmeleri için mikroskoba ihtiyaç vardır. Bakterilerin hücre şekilleri mikroskop altında çubuk, sarmal, yuvarlak, sarmal biçimli ve pleomorfik (değişik biçimli) olarak gözlenebilirken, küfler ard arda dizilmiş hücreleri ile hif adı verilen hücre iplikçiklerinden oluşur. Koloni morfolojisinde olduğu gibi yine bu özellikler genetik materyal tarafından kodlanır ve türe özgü olarak değişim göstermesi nedeniyle tanılamada değerli bir bilgi olarak yer tutar (Hasenekoğlu 2001; Temiz 2010).

2.10.3. Bakterilerin gram özellikleri

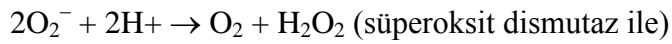
Gram boyama tekniği 1884 de Danimarkalı bilim adamı Christian Gram tarafından geliştirilmiştir. Bakterilerin tanılanmasında önemli yer tutan Gram boyama tekniği bakterilerin hücre duvar yapısındaki farklılıktan faydalanılarak bakterilerin Gram pozitif ve Gram negatif olarak iki gruba ayrılmasını sağlar (Hasenekoğlu 2001; Temiz 2010).

2.10.4. Katalaz, oksidaz, amilaz, jelatinaz, kazein ve tween 80 hidroliz redüksiyon testleri

Bakteriler, çeşitli biyokimyasal aktivitelerini, (büyüme ve çoğalma) çevrelerinden elde ettikleri besinleri kullanarak gerçekleştirirler. Bakteri hücrelerinin içinde veya dışında meydana gelen biyokimyasal dönüşümler, biyolojik katalizörler olan enzimler tarafından yönetilir. Bakteriler, bu enzimleri kullanarak karbohidratları, yağları, proteinleri ve çeşitli bileşikleri parçalamaktadırlar. Özellikle bakterilerin gerçekleştirdikleri, biyokimyasal aktiviteler sonucunda, yan ürün olarak ortaya çıkan maddeler tanı ve karakterizasyon açısından oldukça önemlidir (Harley and Prescott 2002; Dülger 2003; Narayanasamy 2010).

Katalaz testi; Bazı bakteriler oksijenin indirgenmesi reaksiyonlarında, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit (O_2^-) üreten flavoproteinleri içerirler. Fakat bu bileşikler, güçlü okside edici ve hücre bileşenlerine hızlı bir şekilde zarar veren ajanlardır. Bakteri, kendi hücrelerini de bu şekilde oluşan oksijen ürünlerine karşı koruması gerekmektedir. Birçok bakteri, özellikle de zorunlu aerob ve fakültatif anaerob bakteriler bu savunma mekanizması için süperoksitlerin uzaklaştırılmasında süperoksit dismutaz, hidrojen peroksitin uzaklaştırılmasında ise, katalaz ya da peroksidaz enzimlerini kullanmaktadır.

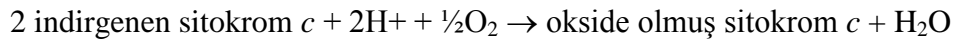
Katalaz aktivitesi reaksiyonu;



Fakat zorunlu anaerob bakteriler, bu enzimlerden yoksundurlar ve oksijen ürünlerinin yok edilmesini tolere edemezler. Katalaz testi bakterilerin tanı ve karakterizasyonunda önemli bir yere sahiptir.

Oksidaz testi; Oksidaz enzimleri, aerobik solunum sırasında elektron taşınımı sistemindeki işlemlerde önemli rol oynar. Sitokrom oksidaz, sitokrom *c*'yi indirgeyerek oksidasyon sırasında elektron akseptörü olarak oksijeni kullanır. Oksitlenmiş sitokrom *c* ve suya dönüştürür.

Oksidaz aktivitesi reaksiyonu;



Oksidaz testi, bakterilerin tanı ve karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılan önemli bir yöntemdir (Harley and Prescott 2002).

Amilaz testi; Birçok bakteri, organik molekülleri daha küçük moleküllere dönüştüren enzimlere sahiptir. Nişasta molekülü, dallanmamış glukoz polimeri olan amiloz ile daha büyük dallanmış polimer olan amilopektin bileşenlerini içerir. Hem amilopektin hem de amiloz, bakterilerin α -amilaz enzimleri ile dekstrin, maltoz ve glukozu hidrolize edilirler. Amilaz testi sayesinde, mikroorganizmaların bu enzime sahip olup olmadıklarının araştırılması, tanılama açısından önemli olup, bu test özellikle *Bacillus* cinsi bakterilerde daha da önemlidir (Harley and Prescott 2002; Barış 2008).

Jelatinaz Testi; Bu test, mikroorganizmaların bir protein türü olan jelatini büyüme için tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanma yeteneklerini belirlemek amacıyla yapılmaktadır. Kollojenin kaynatılması sonucu ortaya çıkan bir protein olan jelatin ısıtıldığında jel kıvamında görülür, soğuduğunda ise katı bir kıvam alır. *Clostridium* türleri gibi jelatinaz aktivitesine sahip bakteri türleri jelatinin tek karbon kaynağı olarak kullanıldığı besiyerine inoküle edilirse jelatinaz aktivitesi nedeniyle jelatini metabolize edilir ve besi yerindeki jel yapısı bozulur. Jelatinaz aktivitesi olmayan bakterilerin inoküle edildiği besiyerlerinde ise değişiklik gözlenmez (Orhan 2013).

Kazein Hidroliz Testi; Bu test, sütün proteinini oluşturan koloidal karakterdeki kazeinin kullanılarak, mikroorganizmalar tarafından sentezlenen, proteolitik ve

ekstrasellüler proteaz enziminin varlığını tespit etmek amacıyla yapılmaktadır. Proteaz varlığında hidroliz olarak rengi beyazdan şeffaf hale dönüşen kazein, protez üretmeyen bir bakteri türüyle muamele edildiğinde herhangi bir renk değişimi gözlenmez.

Tween 80 Hidrolizi; Bu test mikroorganizmaların lipaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır. Yeterli inkübasyon süresinden sonra besiyerindeki neutral red indikatör boyanın enzimin tween 80'i substrat olarak kullanması sonucu oluşan renk değişimi (kırmızıdan pembeye) lipaz pozitif olarak değerlendirilir (Orhan 2013).

2.10.5. PCR tekniği ile gen amplifikasyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR-PCR), DNA ve RNA dizilerinin, uygun primer dizileri kullanarak, PCR cihazı ile çoğaltımı esasına dayanan bir yöntemdir. Bu teknikte, kullanılan hedef genetik materyaller, çok az sayıda olsa bile kolayca çoğaltılabilir ve tanımlanabilir (Türkyılmaz ve Esendal 2002; Çetinkuş 2007).

Tek bir hücrede bulunan DNA veya RNA miktarı, amplifikasyon reaksiyonu için yeterli olur. Bu yöntem DNA'da mevcut mutasyonların ve polimorfizmlerin tanısında ve patojen organizmalara ait DNA'nın varlığını göstermede büyük kolaylık sağlar. Ayrıca temel moleküler biyolojide karmaşık analitik ve sentetik protokollerin kolaylaştırılmasında yararlıdır (Mueller *et al.* 2001; Türkyılmaz ve Esendal 2002; Nybo 2009).

PCR, DNA'nın önemli ölçüde saflaştırılmasını gerektirmediği için, nükleik asitlerle çalışmada harcanan zaman ve emeği azaltmakta ve hücresiz klonlama (cell-free molecular cloning) olarak da adlandırılmaktadır (Saiki *et al.* 1988; Mueller *et al.* 2001).

PCR tekniğinde kullanılan enzim, *Taq* polimeraz diye adlandırılan ve *Thermus aquaticus*'dan izole edilen ısıya dayanıklı DNA polimerazdır. Bu enzimin kullanılması çeşitli kolaylıklar sağlamaktadır. Enzim, yüksek ısıda sentezi gerçekleştirdiği için, başlatıcı oligonükleotidlerin kısmi benzerlik (homoloji) taşıyan bölgelere, yanlış

bağlanma olasılığını azaltmakta ve her döngüde yeni enzim ilavesini gerektirmemektedir (Saiki *et al.* 1988; Mueller *et al.* 2001; Rittie and Perbal 2008; Nybo 2009).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Linyit Madeninden Örneklerin Alınması

Afşin-Elbistan Linyit maden alanının farklı alan ve basamaklarından linyit örnekleri alınmış, steril numune kaplarında saklanarak Erzurum Atatürk Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Laboratuvarına getirilerek buzdolabında +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar

Çalışma esnasında aşağıdaki alet ve cihazlar kullanılmıştır:

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

Steril Kabin (Esco AC2-4E1, SINGAPORE)

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

İnkübatör (Zhicheng ZHWY-200B, CHINA)

İnkübatör (Binder BD53, GERMANY)

Magnetik Karıştırıcı (Daihan Scientific MSH 20A, KOREA)

Mikroskop (Boeco BM 180, GERMANY)

pH Metre (InoLab pH730 wtw Series, GERMANY)

Buzdolabı (Beko BK9470, TÜRKİYE)

Su Banyosu (Mettler WNB14, GERMANY)

Mikrodalga Fırın (Beko MD1505, TÜRKİYE)

Hassas Terazı (Mettler Toledo AL204, CHINA)

Saf Su Cihazı (GFL 2004, GERMANY)

Dikey Tüp Karıştırıcı (GFL 3025, GERMANY)

Buz Makinesi (Scotsman AC45, ITALY)

Santrifüj (Hettich Mikro 22R, GERMANY)

Vorteks (Heidolph Reax Top, GERMANY)

Elektroforez Tankı (Yatay) (OWL B2, U.S.A.)

PCR (Corbett Research CG1-96, AUSTRALIA)

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.

Nutrient broth (NB): 13 g nutrient broth içeriği (Oxoid) 1 L saf su içerisine eklendi. Besiyeri otoklavda steril edildi.

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

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.

Trypticase soy agar (TSA): 40 g tripticase 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.

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.

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 (Bal 2012).

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

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

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 eppendorf tüplerine 1,2 ml konularak hazırlandı (Adıgüzel 2006).

%3'lük KOH çözeltisi: 3 g KOH 100 ml steril saf su içerisinde çözölerek hazırlandı.

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

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).

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

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

%3'lik H₂O₂ çözeltisi: 17 ml %30'luk H₂O₂'in hacmi steril saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

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 çözöldü. 1 N HCl ile pH'sı 8 olana kadar titre edildi. Toplam hacim 200 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavda steril edildi.

Jelatin agar (1000ml için): 10 gr tripton, 5 gr maya ekstraktı, 4gr jelatin, 6 gr agar 1000 ml saf su içerisine konularak pH'ı 7,0'a ayarlanır ve 121°C'de 15 dk otoklavlandı. Sterilizasyon sonrası 45-50°C'ye kadar soğutulan besiyeri steril tüplere dököldü ve katılaşıması sağlandı (Orhan 2013).

Kazein agar (1000ml için): Kazein agar (1000 mL için): 10 g pepton, 10 g maya ekstraktı, 35 g NaCl, 2 g kazein, 6 g agar 1000 mL saf su içerisine konularak pH 7,0'a

ayarlanır, 10 mL'lik tüplere 5 mL olacak şekilde dağıtılır ve 121°C'de 20 dk otoklavda steril edildi (Orhan 2013).

Nişasta agar (1000 mL için): 10 g tripton, 5 g maya ekstraktı, 35 g NaCl, 2 g nişasta, 10 g agar 1000 mL saf su içerisinde konularak pH 7,0'a ayarlanır ve 121°C'de 20 dk otoklavda steril edildi. Sterilizasyon sonrası 45-50°C'ye kadar soğutulan besiyeri steril petrilere döküldü ve katılaşması sağlandı.

Neutral Red solüsyonu (20 mL için): 0,2 g Neutral Red 20 mL saf suda çözüldü (Orhan 2013).

Tween 80 solüsyonu (102,5 mL için): 100 mL fosfat tamponu, 2 mL Neutral Red ve 0,5 mL Tween 80 birbirine karıştırılarak pH'ı 7'ye ayarlanır ve 4 mL'lik tüplere dağıtılarak 121°C'de 20 dk otoklavda steril edildi (Orhan 2013)

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 2013).

5 M NaCl çözeltisi: 29,22 g NaCl'ün 100 ml saf su içerisinde çözülmesiyle hazırlanarak otoklavda steril edildi.

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.

%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.

Dimetil sülfoksit (DMSO): %100'lük DMSO (Sigma) 2ml'lik eppendorf tüplere aktarılarak, kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

%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.

Fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) çözeltisi: 25 ml fenol, 24 ml kloroform ve 1 ml izoamilalkol karıştırılarak hazırlandı. -20°C’de muhafaza edildi.

Kloroform: izoamilalkol (24:1) çözeltisi: 24 ml kloroform ve 1 ml izoamilalkol karıştırılarak hazırlandı. -20°C’de muhafaza edildi.

%70’lik Etil alkol: 70 ml saf etil alkolün hacmi steril distile su ile 100 ml ye tamamlandı. -20°C’de muhafaza edildi.

Proteinaz K: 1 ml steril distile su içerisinde 20 mg proteinaz K olacak şekilde hazırlandı. -20°C’de muhafaza edildi.

Bovine serum albumin: 1 ml steril distile su içerisinde 20 mg bovine serum albumin olacak şekilde hazırlandı. -20°C’de muhafaza edildi.

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.

5XTAE Tamponu (pH: 8): 24,2 g Tris, 5,71 ml glisial 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.

0,5XTBE Tamponu: 100 ml 5xTBE’nin hacmi steril distile su ile 1 L’ye tamamlanarak hazırlandı.

0,5XTAE Tamponu: 100 ml 5xTAE’nin hacmi steril distile su ile 1 L’ye tamamlanarak hazırlandı.

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.

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.

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 $C1 \times V1 = C2 \times V2$ formülü kullanılarak, 5 µM/ml lik primer çalışma solüsyonu hazırlanmış ve PCR çalışmasında kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir (Adıgüzel 2006).

3.2. Yöntem

3.2.1. Linyit madeni mikroflorasından bakterilerin izolasyonu ve muhafazası

Madenden alınan örnekler, 1 ml veya 1 g olacak şekilde hazırlanarak, 9 ml steril %0,9'luk fizyolojik su içerisinde, 1-2 saat çalkalanarak homojenize edilmiş, bir seri dilüsyon (10⁻⁵'e kadarlık dilüsyon serisi) hazırlanmıştır. Bu dilüsyonların her birinden birer paralel olmak üzere, flora bakterilerinin izolasyonu için, TSA, NA ve PDA besi yerlerine yayma ekim yapılarak, 28°C'de bir hafta süresince etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi boyunca 1, 3, 5 ve 7. günlerde, petri plaklarında gözlemlenen farklı görünüme sahip bakteri kolonilerinin ve küflerin, 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 (SLM kodlarıyla) numaralandırılmış ve daha sonraki karakterizasyon işlemlerinde kullanılıncaya kadar -86°C'de saklanmıştır.

3.2.2. İzole edilen mikroorganizmaların morfolojik testleri

3.2.2.a. Hücre morfolojisi

Saflaştırılan bakteriler, çizgi ekimle Nutrient agar besiyerine ekilmiş, 28°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; Adıgüzel 2006).

3.2.2.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 2009; Orhan 2013).

3.2.2.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. 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 renksizleşir. Yıkama işlemi sonrasında saf sudan geçirilen preparat safranin ile 20 saniye boyanır. Boyama süresi sonunda hafif su akımı ile yıkanan preparat kurutulur, immersiyon objektifinde inceleme yapılır. Mor renk Gram (+), pembe-kırmızı renk Gram (-) olarak değerlendirilir (Harley and Prescott 2002; Orhan 2013).

Bu metodlardan ikincisi ise; Gram (-) bakterilerin %3'lük 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 (Bal 2012; Orhan 2013; Hündür 2015)

3.2.2.d. Endospor varlığının ve hücre içindeki yerinin belirlenmesi

Endospor durumları için, teste tabi tutulacak bakteri izolatları, Nutrient agar 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. süreyle 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).

3.2.2.e. Kapsül testi

Bakteri izolatlarının yaşlı kültürlerinden preparat hazırlanarak çini mürekkebiyle boyanmış ve mikroskopta incelenerek glikokaliks yapının dışındaki mukoid örtünün varlığı aranmıştır (Temiz 2000).

3.2.2.f. Hareketlilik testi

Bakteri İzolatları Nutrient broth + %0,6 agar içeren tüplere iğne öze yardımıyla ekilerek bir gün inkübe edilmiştir. Tüplerde oluşan ekim çizgisine göre gelişim gözlemlenerek hareketlilik durumu incelenmiştir (Temiz 2000; Barış 2009).

3.2.2.g. 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 2009; Orhan 2013).

Bakteriler sıvı besiyerlerinde ise üstte pellikül, 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 (Barış 2008).

3.2.3. Fizyolojik testler

3.2.3.a. 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 ve minimum büyüme sıcaklıkları belirlenmiştir (Harley and Prescott 2002; Barış 2008).

3.2.3.b. İzolatların gelişebildikleri pH aralıklarının belirlenmesi

Bakteri izolatlarının gelişebildikleri pH aralığının belirlenmesinde; farklı pH değerlerine (4; 5; 6;7; 8; 9) sahip nutrient broth besiyerleri kullanılmıştır. İzolatlar, nutrient broth besiyerlerine inoküle edilmiş, inkübasyon sonrasında spektrofotometrede (OD600'de) yapılan ölçümler sonucunda, izolatların büyüebildikleri maksimum ve minimum pH aralıkları tespit edilmiştir (Dülger 1997; Bal 2012).

3.2.4. Biyokimyasal testler

3.2.4.a. Katalaz testi

Elde edilen bakteri izolatlarının, katalaz enzimine sahip olup olmadıkları bu test ile belirlenmiştir. Bu enzim, elektron transfer zincirinin sonunda açığa çıkan hidrojenperoksit (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 %3'lik H_2O_2 damlatılmıştır. Kabarcık oluşumu katalaz pozitif; oluşmaması ise katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Harley and Prescott 2002).

3.2.4.b. Oksidaz testi

Bakterilerin, elektron transferinde bulunan sitokrom c proteinine sahip olup olmadıkları bu testle belirlenmiştir. Sitokrom c proteini (oksidaz c), solunum olayında görev almakta ve elektron transfer sisteminde, maddeleri birinden diğerine indirgeme reaksiyonuyla hücresel enerji (ATP) oluşumuna sebep olmaktadır. Test; organizmanın sitokrom-c oksidase enzimine sahip olması durumunda, bu enzimin reaksiyona girmesi sonucu mavi renk oluşturması esasına dayanır. Bu test için %1 Tetra methyl-p-phenyldiamine dihydrochloride içeren kit halindeki diskler kullanılmıştır. Bu diskler 1 damla steril saf su ile doyurulmuş ve üzerine NA besiyerinde geliştirilen 24-48 saatlik bakteri

kültüründen bir öze dolusu eklenmiştir. Bakteride sitokrom c proteini varsa, bu diskte kodlu olan substratıyla reaksiyona girerek mavimsi mor bir renk oluşumuna neden olur. Bu durum oksidaz pozitif olarak değerlendirilmiş, renk değişiminin görülmemesi ise oksidaz negatif olarak kaydedilmiştir (Harley and Prescott 2002; Adıgüzel 2006; Bal 2012).

3.2.4.c. 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; Bal 2012).

3.2.4.d. Jelatinaz testi

Bu test mikroorganizmaların bir protein türü olan jelatini büyüme için tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanma yeteneklerini belirlemek amacı ile yapılmaktadır. Nutrient agar da geliştirilen 24-48 saatlik bakteri kültüründen steril iğne öze ile tek bir koloni alınarak, 5 ml jelatin agar besiyerine 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 değerlendirilmiştir (Orhan 2013).

3.2.4.e. Kazein hidroliz testi

Bu test sütün proteinini oluşturan koloidal karakterdeki kazeinin, mikroorganizmalar tarafından sentezlenen, proteolitik ve ekstrasellüler proteaz enziminin varlığını tesbit etmek amacıyla yapılmaktadır. Nutrient agar da geliştirilen 24-48 saatlik bakteri

kültüründen steril iğne öze ile tek bir koloni alınarak, 5 ml kazein agar besi ortamı içeren tüplere ekim yapılarak 28°C'de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. 5 günlük inkübasyondan sonra tüpler de meydana gelen şeffaflaşma proteaz enziminin bir göstergesi olduğundan pozitif, herhangi bir değişimin olmaması ise mikroorganizmanın proteaz enzimine sahip olmadığını gösterdiğinden negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Orhan 2013).

3.2.4.f. Tween 80 hidrolizi

Bu test mikroroganizmaların lipaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır. Lipaz aktvitesinin belirlenmesi için Nutrient agar da geliştirilen 24-48 saatlik bakteri kültüründen steril iğne öze ile tek bir koloni alınarak, 5 ml tween 80 solüsyonu içeren tüplere ekim yapılarak 28°C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. 7 günlük inkübasyondan sonra besiortamındaki neutral red indikatör boyanın kırmızıdan pembeye renk değişimi lipaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Orhan 2013).

3.2.5. Moleküler testler

3.2.5.a. Bakteri İzolatlarının bazı genetiksel özelliklerinin belirlenmesi

1. Bakteri hücrelerinden genomik DNA'ların izolasyonu

Araştırmada kullanılacak olan bakteri izolatlarından DNA ekstraksiyonu, Adıgüzel 2006 tarafından modifiye edilen izolasyon metoduna göre aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

DNA'sı izole edilecek olan bakteriler NA besiyerine 3 faz halinde ekilerek petriyeler 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 dak 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 dak 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 dak 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 dak 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 dak bekletilmiştir.

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

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

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

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

Buzdolabından çıkartılan tüpler 15 000 rpm de 15 dak santrifüjlenmiştir.

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

Peletin üzerine yeniden %70 lik etanolden 500-600 μl eklenerek, 15 000 rpm de 15 dak 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 dak 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.

2. 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 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

DNA konsantrasyonu ($\mu\text{g}/\text{ml}$)= 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 µl)/Stok DNA Konsantrasyonu (µg/ml) formülü ile DNA çalışma solüsyonu hazırlanmış ve bu hesaplardan elde edilen değer stok DNA çözeltisinden alınacak miktarı vermiştir. Bu miktar TE çözeltisi ile 200 µl'ye tamamlanarak 100 ng/µl konsantrasyondaki DNA çalışma solüsyonu hazırlanmış ve DNA tüpleri -86°C'de sonraki çalışmalarda kullanılincaya kadar saklanmıştır (Bal 2012; Hündür 2015).

4. Bakteri izolatlarının 16S rRNA bölgesinin PCR ile amplifikasyonu

Test izolatlarından saflaştırılmış olan genomik DNA'lardan bakteri sistematigi açısından önemli olan 16S rRNA bölgesi evrensel primerler (forward ve reverse primerler) kullanılarak *in vitro* koşullar altında PCR yardımı ile çoğaltılmıştır (Bal 2012; Hündür 2015).

Reaksiyonun (Master mix'in) hazırlanması

PCR'ı yapılacak her bir örnek için 3 µl 10 x PCR tamponu (100 mM Tris – HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, %0.01 jelatin pH: 8.3), 0.6 µl dNTP (deoksiniükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP – 10mM), 3 µl UNI 16S-L (forward ATT CTA GAG TTT GAT CAT GGC TCA), 3 µl 16S-R (reverse ATG GTA CCG TGT GAC GGG GGG TGT GTA), 1.2 µl DMSO, 0.6 µl MgCl₂(50 µM), 0.3 µM / ml taq DNA polimeraz ve 15.3 µl sdH₂O ile 27 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlanmış ve karışıma son olarak 3 µl template DNA (100 ng/µl) eklenerek son hacim 30 µl'ye tamamlanmıştır. Master mix ve template DNA içeren ependorf tüplerin üzerine buharlaşmayı engellemek amacıyla 15 µl 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.

16S rRNA PCR ürünlerinin elektroforezi

1.50 gr agaroz üzerine 150 ml 0.5X TBE (%1'lik agaroz jel) tamponu ilave edilerek karışım mikrodalga fırında iyice çözününceye kadar kaynatılmıştır. 50°C'ye kadar soğutulan agaroz jele 0.8 µg/ml olacak miktarda ethidium bromür eklenerek içerisine tarak yerleştirilmiş olan elektroforez jel küvetine dökülmüştür. 30-35 dk bekletilerek jelin donması sağlanmış, donan jelden taraklar dikkatlice çıkarılmış ve içerisinde 0.5X TBE tamponu bulunan elektroforez tankının içine yerleştirilmiştir. Jeldeki ilk çukura, 10 kb DNA markırından [50-100-200-300-400-500-750-1000-1400-1500-2000-3000-4000-6000-8000-10000] (Sigma D-7058) 10 µl yüklenmiştir. Diğer çukurlara ise her bir örnek için 2.5 µl 6X yükleme tamponu, 10 µl PCR ürünü karıştırılarak yüklenmiştir. Elektroforez jel düzeneği 90 volta ayarlanarak örnekler 2 saat yürütülmüştür. Jel üzerinde bulunan ve ethidium bromür ile boyanan DNA bantları jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenmiş ve bilgisayar ortamında (DNR BioImaging Systems Software) analiz edilmiştir.

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 (Bal 2012; Hündür 2015).

3.2.6. Linyit madeni mikroflorasından fungus izolasyonu ve muhafazası

Uygun ortamlardan alınan örnekler, 1 ml veya 1 g şeklinde hazırlanarak, 9 ml steril %0,9'luk 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 mikroorganizmalarının izolasyonu için, PDA ve RBA besiyerlerine nokta ekim yapılarak, 28°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 aktarılmıştır. Elde edilen bu stok kültürler kodlanmış (SZN1-SZN 42) ve daha sonraki karakterizasyon işlemlerinde kullanılmaya kadar oda ısısında saklanmıştır.

3.2.6.a. Stok kültürlerin alınması

Potato Dextrose Agar besiyerinde canlandırılmış olan örnekler oda sıcaklığında saklanmış ve altı ayda bir yeni besiyerlerine ekilerek stok kültür yenilenmektedir.

3.2.6.b. Fungus hücrelerinden 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: İzooamil 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 santifürülenir.
- 7- Santifürüleme işleminin ardından 400 µl'lik süpernatant kısmı yeni bir 2 ml'lik steril eppendorf tüpüne aktarılır.
- 8- 1000 µl'lik %99,5 saf alkol eppendorf tüplerine eklendikten sonra tüpler birkaç kez alt-üst edilir.
- 9- Yeniden +4°C'de 10 dakika 16.000 rpm'de santifürü işlemi yapılır.
- 10- Santifürü 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 santifürülenir.
- 14- Santifürü işleminden sonra süpernatant kısmından 350 µl alınır ve yeni bir steril eppendorf tüpüne aktarılır.
- 15- 300 µl'lik -20°C'de bekletilen izopropanol eklenir ve 5-10 kez alt-üst edilir.
- 16- Süpernatant kısım eppendorf tüplerini sallamadan dikkatli bir şekilde boşaltıldıktan sonra pellet 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 santifürü edilir.
- 18- Santifürüden çıkartılan örneklerin pellet kısmındaki ethanolün uçması için 37°C'lik etüvde 90 dakika veya 40°C'lik etüvde 60 dakika tüplerin ağzı açık kalacak şekilde bekletilir.
- 19- Ethanolün uçmasının ardından 50 µl'lik DNA Rehydration solüsyonu (Promega) eppendorf 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.

3.2.6.c. Fungus 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.

3.2.7. ITS PCR protokolü

3.2.7.a. 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 primer, 0,25 µl R primer, 0,5 µl dNTP (deoksinükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,5 µl Expand High Fidelity Enzyme Mix ve 1 µl bisülfid muamelesi görmüş genomik DNA ilave edilir.

3.2.7.b. ITS PCR programı

Hazırlanan örnekler, 3 dakika 94°C’de denetürasyon, bunu takiben 40 döngü olacak şekilde 94°C’de 1 dakika denatürasyon, 55°C’de 1 dakika bağlanma 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 (Hündür 2015).

3.2.7.c. PCR ürünlerinin analizi

Elde edilen PCR ürünleri QIAxcel Advanced analiz sistemiyle değerlendirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Linyit Madeni Mikroflorasından Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Muhafazası

Çalışma alanı olarak belirlenen Afşin-Elbistan Linyit madeninin farklı derinlerinden alınan linyit örnekleri, genel besiyerlerine karışık kültürler olarak ekilmiştir. Besi yerlerinde gelişen bakteriyel kolonilerden farklı olduğu tespit edilen toplam 18 adet bakteri ve 20 adet küf izole edilmiş ve bakteriler “SLM” , küfler “SZN” şeklinde kodlanmıştır.

4.2. İzole Edilen Bakterilerin Morfolojik Testleri

Linyit madeninden izole edilen bakterilerin hücre morfolojisi, hücre boyutu, Gram özellik, endospor oluşturabilme yeteneği, kapsül varlığı, hareketlilik ve çeşitli kültürel incelemeleri kapsayan morfolojik özelliklere ait araştırma bulguları Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Bakteri izolatların morfolojik özellikleri

İzolatın Kodu	Hücre Morfolojisi	Boyutları μ		Gram Özelliği	Endospor		Kapsül	Hareket
		Çapı	Boyu		Durumu	Yeri		
SLM-1	Bacil	0,5-1	2-4	+	+	Uca yakın	-	-
SLM-3	Bacil	1-1,5	3-5	+	+	Merkezi	-	-
SLM-6	Bacil	0,5-1	2-4	+	-	-	-	+
SLM-8	Bacil	0,5-1	2-4	+	-	-	-	-
SLM-11	Bacil	1-2	3-5	+	-	-	-	+
SLM-12	Bacil	1-1,5	2-4	-	-	-	-	-
SLM-13	Bacil	1	2-4	+	-	-	-	+
SLM-14	Coccus	1-1,5	-	+	-	-	-	+
SLM-15	Coccus	1-2	-	+	-	-	-	+
SLM-17	Bacil	2	3-5	+	-	-	+	+
SLM-18	Bacil	1-1,5	2-4	+	-	-	-	+
SLM-19	Bacil	1-2	3-6	+	+	Merkezi	-	+
SLM-21	Bacil	1-1,5	4	+	-	-	-	-
SLM-23	Bacil	0,5-1	2-4	-	-	-	-	+
SLM-24	Bacil	1-2	3-5	-	+	Uca yakın	-	+
SLM-25	Rizoid	-	-	+	-	-	-	+
SLM-30	Bacil	1-2	3-6	+	-	-	-	-

* ++: Güçlü pozitif

Çizelge 4.2. Bakteri izolatların katı ve sıvı kültür özellikleri

İzolatın Kodu	Katı Kültür			Sıvı Kültür
	Koloni Rengi	Koloni şekli	Koloni Kıvamı	
SLM-1	Koyu kırmızı	Düzenli	Tereyağı kıvamında	Dipte çökelti
SLM-3	Kırık beyaz	Düzenli	Krem kıvamında	Bulanık
SLM-6	Krem	Düzenli	Koyu, besi yerine yapışık	Bulanık
SLM-8	Mat krem	Düzenli	Koyu, besi yerine yapışık	Bulanık
SLM-11	Kirli sarı	Düzenli	Krem kıvamında	Bulanık
SLM-12	Krem	Düzenli	Krem kıvamında	Bulanık
SLM-13	Krem-beyaz	Düzenli	Krem kıvamında	Bulanık
SLM-14	Koyu truncu	Düzenli	Krem kıvamında	Dipte çökelti
SLM-15	Kirli beyaz	Düzenli	Krem kıvamında	Bulanık
SLM-17	Açık pembe	Düzenli	Krem kıvamında	Bulanık
SLM-18	Şeffaf beyaz	Düzenli	Krem kıvamında	Dipte çökelti
SLM-19	Mat beyaz	Düzensiz	Sümüksü kıvamda	Dipte çökelti
SLM-21	Mat yavruağzı	Düzenli	Tereyağı kıvamında	Bulanık
SLM-23	Krem	Düzenli	Krem kıvamında	Bulanık
SLM-24	Kirli sarı	Düzensiz	Sümüksü kıvamda	Bulanık
SLM-25	Mat krem	Düzenli	Koyu, besi yerine yapışık	Bulanık
SLM-30	Beyaz-krem	Düzensiz	Sümüksü kıvamda	Bulanık

4.3. İzolatların Fizyolojik Test Sonuçları

Seçilen izolatların maksimum ve minimum büyüme sıcaklıkları ve büyüyebildikleri pH aralıkları Çizelge 4.3, 4.4 ve 4.5’de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Bakteri izolatların pH özellikleri

	Abs-600nm					
	pH-4	pH-5	pH-6	pH-7	pH-8	pH-9
SLM-1	0,025	0,322	0,289	0,121	0,057	0,071
SLM-3	0,012	1,435	0,495	1,165	0,877	0,928
SLM-6	0,003	0,02	0,028	0,08	0,101	0,046
SLM-8	0,1	0,28	0,462	0,597	0,503	1,022
SLM-11	0,09	0,358	0,126	0,727	0,428	0,367
SLM-12	0,086	0,455	0,321	1,465	1,474	0,748
SLM-13	0,133	0,506	0,33	1,05	1,042	0,783
SLM-14	0,07	0,057	0,272	0,316	0,469	0,556
SLM-15	0,086	0,153	0,13	0,496	0,371	0,166
SLM-17	0,208	0,593	0,826	0,321	0,889	1,02
SLM-18	0,153	0,415	0,808	0,802	0,17	0,122
SLM-19	0,27	0,558	0,73	1,077	1,271	0,679
SLM-21	0,148	0,68	0,727	1,006	1,103	0,417
SLM-23	0,222	0,237	0,626	0,895	0,988	1,198
SLM-24	0,237	0,576	0,428	0,621	0,934	1,436
SLM-25	0,046	0,046	0,081	0,091	0,059	0,06
SLM-30	0,256	0,424	0,45	0,37	0,422	0,424

Çizelge 4.4. Bakteri izolatların sıcaklık özellikleri

	Abs-600nm				
	20°C	30°C	37°C	40°C	50°C
SLM-1	0,174	0,119	0,168	1,189	1,88
SLM-3	0,362	0,580	0,767	0,369	1,029
SLM-6	0,079	0,082	0,084	0,08	0,87
SLM-8	0,566	0,657	0,09	0,135	0,234
SLM-11	0,521	1	0,492	0,376	0,206
SLM-12	0,934	1,408	0,369	0,327	0,25
SLM-13	0,597	0,927	0,885	0,865	0,233
SLM-14	0,244	0,498	0,452	0,436	0,153
SLM-15	0,089	0,228	0,293	0,268	0,124
SLM-17	0,722	0,924	0,507	0,411	0,334
SLM-18	0,516	0,755	0,669	0,455	0,165
SLM-19	0,437	0,498	1,014	1,154	0,817
SLM-21	0,737	0,9	0,194	0,183	0,292
SLM-23	0,714	1,187	0,257	0,246	0,232
SLM-24	0,626	0,647	0,672	0,837	1,222
SLM-25	0,339	0,808	1,015	0,645	0,274
SLM-30	0,418	0,639	0,644	1,011	1,189

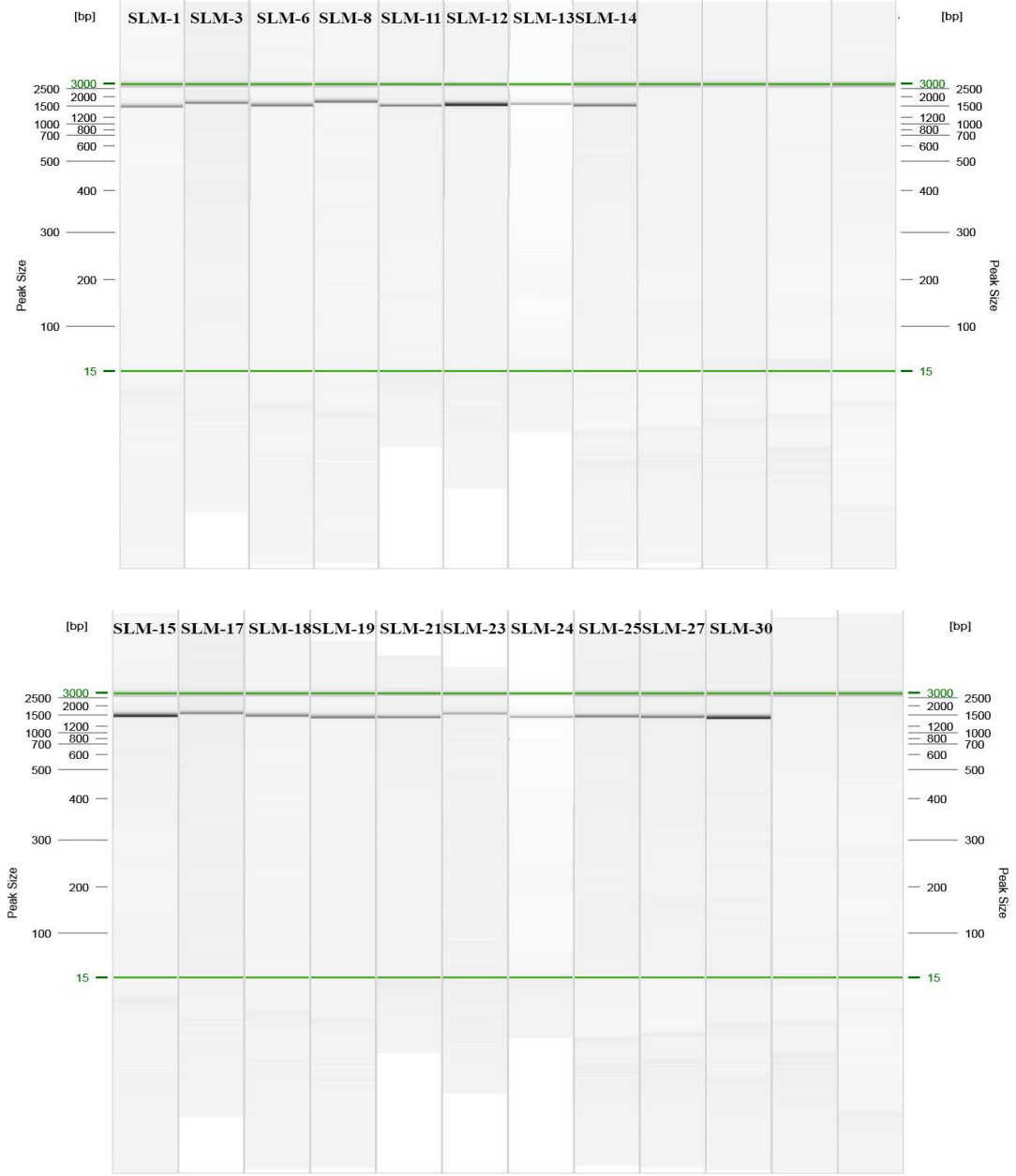
Çizelge 4.5. Bakteri izolatların biyokimyasal test sonuçları

İzolatin Kodu	Katalaz Testi	Oksidaz Testi	Amilaz Testi	Jelatinaz Testi	Kazein Hidroliz Testi	Tween 80 Hidrolizi
SLM-1	++	-	-	+	+	-
SLM-3	++	-	+	+	+	-
SLM-6	Z +	+	+	+	+	-
SLM-8	-	+	-	+	-	+
SLM-11	++	-	+	+	-	-
SLM-12	++	-	-	+	-	+
SLM-13	++	-	-	+	+	-
SLM-14	++	-	+	+	-	+
SLM-15	++	-	-	+	+	-
SLM-17	Z +	+	+	+	-	+
SLM-18	++	-	+	-	+	+
SLM-19	++	+	+	-	-	+
SLM-21	Z +	-	+	+	-	+
SLM-23	++	-	+	-	-	+
SLM-24	++	+	+	-	-	-
SLM-25	++	+	+	-	-	-
SLM-30	++	+	-	-	+	+

* +: Zayıf pozitif ++: Güçlü pozitif

4.4. 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.



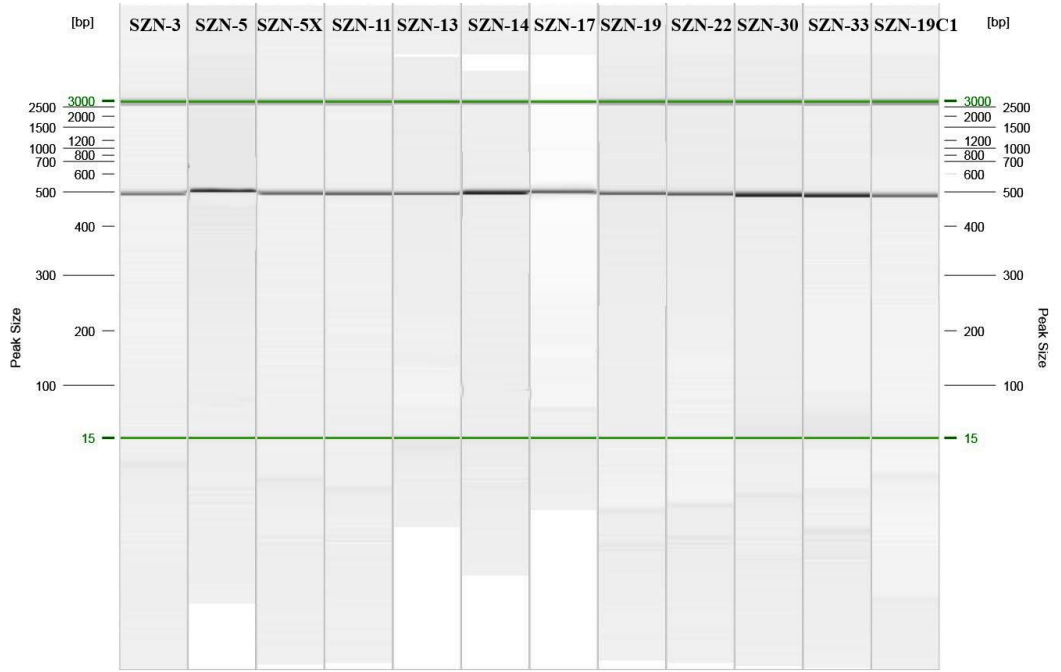
Şekil 4.1. Bakteri izolatlarının 16S rRNA PCR elektroforez sonuçları

4.5. Bakteri İzolatların 16S rRNA Gen Bölgelerinin Baz Dizileri

İzole edilen 17 bakterinin 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 ek de verilmiştir.

4.6. ITS PCR Amplifikasyon Sonuçları

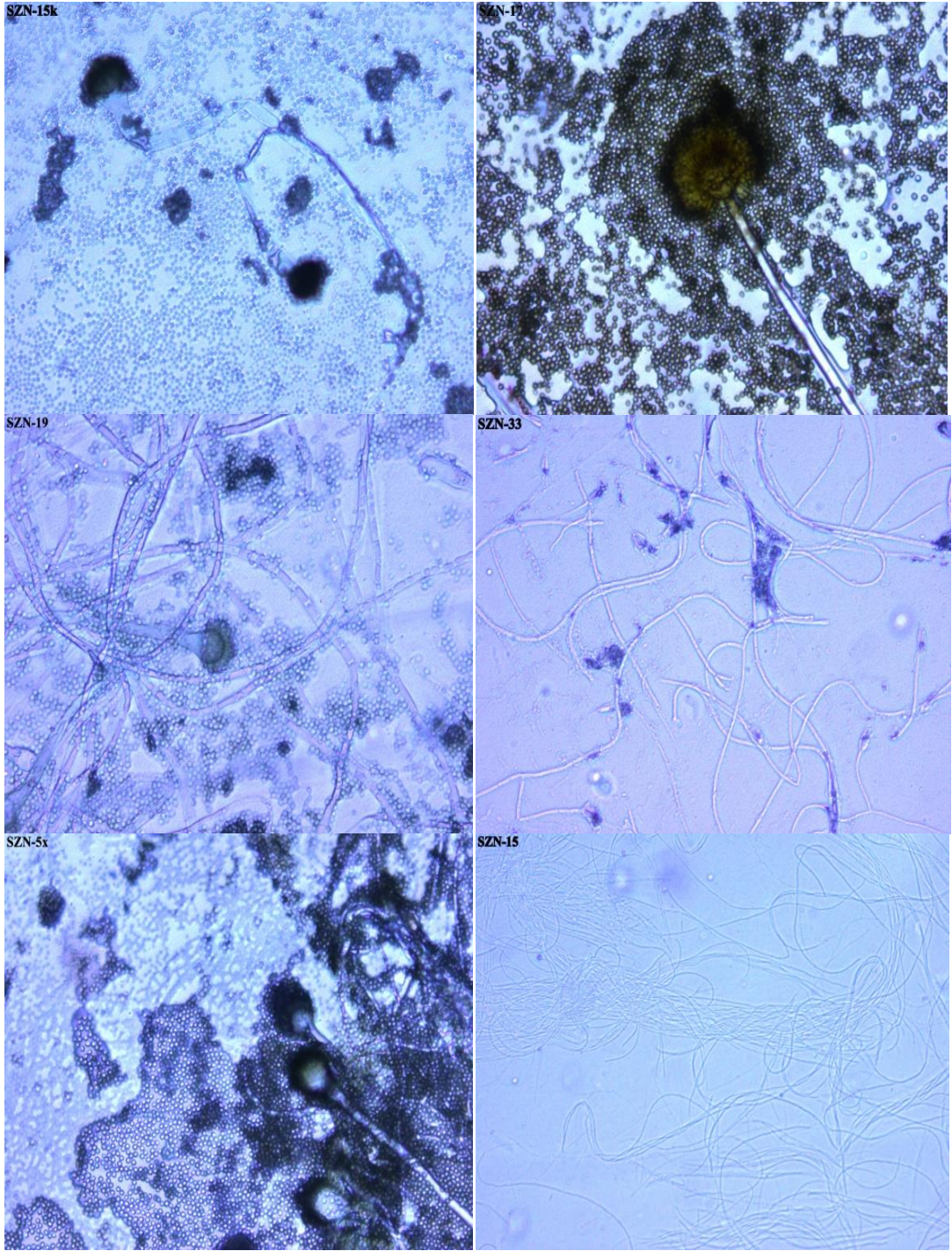
Test edilen küf izolatlarının ITS PCR amplifikasyon sonuçları değerlendirilmiş ve yapılan analiz sonuçlarına göre tüm izolatların ortalama 500bp uzunluğunda tek bant verdiği belirlenerek Şekil 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2.Küf izolatlarının ITS PCR elektroforez sonuçları

4.7. Küf İzolatlarının Mikroskopik İncelemeleri

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



Şekil 4.3. Bazı Küf izolatlarının mikroskop görüntüleri

4.8. Fungal İzolatların 18S rDNA Gen Bölgelerinin Baz Dizileri

Elde edilen 19 küf izolatının 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 ek de verilmiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bilinen tarihinden bu yana insanoğlu yaşamını devam ettirmesini sağlayacak gereçleri ve bu gereçlerin yapımı için gerekli olan enerjiyi yeryüzündeki mevcut maden kaynaklarını kullanarak ortaya çıkarmış ve bu bağlamdaki bilimsel ve teknolojik gelişmelerini maden kaynaklarından faydalanarak ilerletmiştir.

İlerleyen teknolojiyle birlikte madenler, hammadde kaynağı ve bu hammadde kaynaklarının işlenmesini sağlayacak enerji sağlayıcısı olması nedeniyle sanayi kollarının vazgeçilmez bir parçası haline gelmiştir. Artan insan nüfusu ve bu nüfusun ihtiyaç duyduğu araçlar ve enerji, ülkeleri yeni enerji kaynakları bulmaya yöneltmiş, bununda yeterli olmayacağına farkına varan insan ırkı yeryüzündeki mevcut tüm enerji ve hammadde kaynakların verimliliğini arttıracak bilimsel yöntemleri kullanmaya başlamıştır (Gökçay *et al.* 2001; Hayta 2010; Bal 2012; Hündür 2015).

Gelişen teknolojiyle birlikte en temel ihtiyaçlar arasına giren enerji temini, kaynaklarının keşfi ve kullanımı bakımından ilk olarak fosil yakıtlardan karşılanmıştır. Bu yakıtlar arasında da Milattan 7000 yıl önce kullanıldığı belirlenen kömür, insanlığın enerji ihtiyacını karşılamada kullanılan en eski enerji kaynağı olması bakımından ilk sırayı almıştır. Sanayi devrimiyle birlikte popüleritesi artan kömür, taşınmasının kolay ve güvenli, yeryüzünde yüksek miktarda rezerve sahip olması ve ucuz olması nedeniyle 19. yüzyılın ortalarında ham petrolün yakıt olarak kullanılabilceğinin keşfiyle ve takip eden yıllarda ham petrolün işlenerek sanayide kullanımına kadar kömür ülkelerin enerji ihtiyacının karşılanmada önemini korumuştur. Takip eden yıllarda petrolün daha ucuz olması nedeniyle kömür üretimi azalmış, hatta bazı ülkeler kömür madenlerini kapatmıştır. Tüketim artışına bağlı olarak petrol rezervlerinin azalması, yaşanan politik krizler, rezervlerin sadece belli bölgelerde yoğunlaşmış olması enerji arz güvenliğini korumaya yönelik yaklaşımlara dikkat çekerek son yıllarda kömür kaynaklarına olan ilgiyi yeniden arttırmıştır (Aytar 2007; Aksan 2010).

Tüm bu bilgiler gözönüne alındığında fosil yakıtların yenilenebilir enerji kaynakları olmadığı, hemen hemen tüm kıtalarda bulunmasına rağmen yeryüzündeki kömür rezervlerinin sınırlı olması ve oluşumunun milyonlarca yılda gerçekleşmesi bu kaynakların mümkün olan en verimli şekilde kullanılması için geliştirilecek ileri teknolojilerin gerçekleştirilmesini zorunlu kılmaktadır.

Ülkemizin enerji ve ekonomi politikaları arasında ilk sırayı alan enerji arz güvenliğine istinaden kömür iyileştirme teknolojileri başlığı altında yer alan temiz kömür teknolojileri de insan ve çevre sağlığının korunması amacıyla üzerinde çalışılan önemli teknolojiler arasında yer almaktadır. Çevreyi korumaya yönelik maddelerin bulunduğu Kyoto protokolü uyarınca da belirtildiği gibi; ısı değeri düşük, nem ve yabancı madde içeriği yüksek bir kömür çeşidi olan linyitin ev yakıtı ve sanayi kollarında kömür iyileştirme teknolojileri yöntemleriyle işlem görmeksizin kullanılması canlı ve çevre güvenliği bakımından uygun değildir. Yüksek nem içeriğine sahip olması linyitlerin enerji verimliliğiyle ilgiliyken, içeriğinde bulunan sülfürlü bileşikler ve yabancı maddeler linyitlerin yakılmasından sonra kül ve kompleks gazlarla birlikte atmosfere salınmaktadır. Bu durum ise çevrede bulunan canlı ekosistemini doğrudan olumsuz yönde etkilemektedir.

Bu olumsuzluklar göz önüne alındığında önemli bir enerji kaynağı olan kömürün çevreye verdiği zararın en aza indirilmesi amacıyla yapılan uygulamalar ekosistemi korumaya yönelik temel tedbirler arasında yer almaktadır. Uzun zamandır kullanılan fiziksel ve kimyasal kömür işleme teknikleri bu tedbirlerin başında gelirken son yıllarda biyolojik işleme tekniklerinin de bu alandaki hızlı gelişimi dikkat çekmektedir. Temel olarak fiziksel işleme yöntemleriyle, kömür üretimi sırasında oluşan şist, kil kum gibi istenmeyen organik ve inorganik maddelerin veya piritik sülfürün yoğunluk farkından yararlanılarak kömürden uzaklaştırılması sağlanırken kimyasal temizleme yöntemlerinde fiziksel temizleme teknikleriyle uzaklaştırılmayan organik sülfürün kimyasal çözücüler uygulanarak kömürden uzaklaştırılması sağlanır. Uygulanan bütün bu ve benzeri teknikler temiz kömür teknolojileri adı altında yapılmasına ve atmosfere salınan zararlı gazların giderilmesine yardımcı olsa da yöntemlerin doğal çevreden

elimine edilmesi uzun zaman alan veya mümkün olmayan kimyasal çözeltileri içermesi fiziksel ve kimyasal kömür temizleme teknolojilerinin tam anlamıyla çevre dostu olmadığını gözler önüne sermektedir.

Bu yöntemlere ek olarak son yıllarda hızla gelişen biyolojik temizleme yöntemleri ise ekosistemde doğal olarak gerçekleşen prosesleri temel alarak oluşturulmuş kompozit reaksiyonlar serisi şeklinde işlemesi nedeniyle ortama doğası dışında elimine edilemeyecek kimyasallar ve metabolik atıklar salmaz ve tam anlamıyla temiz kömür teknolojileri gerçekleştirilebilir. Bu özellikleri dikkatle incelendiğinde biyolojik kömür temizleme ve iyileştirme teknolojileri verimlilikleri arttırıldığı takdirde, ucuz, kolay uygulanabilir ve temiz olması gibi özellikleri nedeniyle fiziksel ve kimyasal yöntemlerle kıyaslandığında oldukça avantajlıdır.

Oluşumu itibariyle canlı kalıntılarından meydana gelen ve organik yük miktarı fazla olan kömür biyolojik yöntemlerle iyileştirilmeye uygundur. Bu noktada iyileştirilmesi mutlak zorunlu olan olgunlaşmamış kömür sınıfında yer alan, yapısındaki bitki ve hayvan kalıntıları itibariyle özellikle de daha genç ve daha çok zayıf bağ içeriğine sahip düşük kaliteli linyitlerin mikroorganizmalar tarafından işlenmesi sırasında (sülfürlü bileşiklerin giderilmesi, kömürün sıvılaştırılması ve kalori değerinin arttırılması gibi) kömür ve/veya içerisindeki inorganik maddeler besin komponenti olarak kullanılırlar. Mikroorganizmaların bu özelliklerinden yola çıkan bilim insanları dünyada ve ülkemizde düşük kalite kömür sınıfında yer alan linyitle ilgili kayda değer birçok çalışma yapmışlardır (Cohen *et al.* 1990; Hofrichter *and* Frischthe 1997; Laborda *et al.* 1997; Gökçay *et al.* 2001; Başaran *et al.* 2003; Acharya *et al.* 2005; Özkan 2007; Aytar *et al.* 2008; Selvi *et al.* 2009; Khousnahad 2009; Tao *et al.* 2010; Chou *et al.* 2012; Sekhohola *et al.* 2012).

Tüm bu değerli çalışmalara rağmen bilim insanları biyolojik kömür işleme teknolojilerinde kömür madenlerinden izole edilmiş mikroorganizmaları kullanmak yerine satın aldıkları hazır strainleri (kültür koleksiyonlarındaki ticari ırk) kullanmışlardır. Bu ırkların laboratuvar şartlarında kömüre uygulanması sonucu elde

ettikleri veriler üzerine kurguladıkları çalışmalar kömür sahalarında rutin uygulamalara dönüştürülememiştir. Mikroorganizmaların doğal ortamlarında laboratuvar şartlarında olduğundan çok daha farklı gelişim göstermeleri, karşılaştıkları çevresel stres faktörleri (sıcaklık değişimleri, nem, rüzgar, kimyasal maddeler, rekabet vb.) kömür işlemedeki verimliliklerini doğrudan etkileyeceği göz önüne alındığında madenin doğal mikroorganizma florasından elde edilecek örneklerin saha uygulamalarında daha başarılı olabileceği yapılan diğer maden iyileştirme çalışmalarında açıkça vurgulanmaktadır (Bal 2012; Hündür 2015).

Yukarıda bahsi geçen çerçevede kurgulanan bu tez çalışmasında Afşin-Elbistan Linyit İşletmeleri maden sahasından alınan maden örneklerinden küf ve bakteri florasının izolasyonu ve karakterizasyonu yapılarak gelecekte gerçekleştirilebilecek biyolojik kömür işleme teknolojilerine yönelik, linyit işleme yeteneğindeki bakteri ve küflerin literatüre kazandırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla yapılan izolasyon çalışmalarında 17 farklı bakteri ve 19 farklı küf izole edilmiştir ve bu izolatların tanılanması amacıyla klasik ve moleküler test teknikleri kullanılmıştır. İzole edilen bu bakterilerden iki tanesinin *Streptomyces galilaeus*, ikisinin *Pseudomonas mandelii*, ikisinin *Bacillus pumilus*, bir tanesinin *Methylobacterium zatmanii*, bir tanesinin *Kocuria polaris*, bir tanesinin *Streptomyces thermocarboxydus*, altı tanesinin *Arthrobacter sp.* ve iki tanesinin *Rhodococcus sp.* türlerine ait olduğu belirlenmiştir.

Bilindiği gibi *Streptomyces sp.* türleri antibiyotik üretimi amacıyla tıbbi biyoteknolojide kullanılmaktadır, bunun yanı sıra lignoselülitik aktivitelerinin yüksek olması nedeniyle de kağıt, kumaş ve gıda endüstrisi gibi alanlarda ağartma ve işleme teknolojilerinde aktif olarak kullanılmaktadır (Özşahin 2006). Şimdiye kadar lignini tek karbon kaynağı olarak kullanabilen hiçbir organizma bulunamamış olmasına rağmen olgunlaşmamış kömürlerin yapısı göz önüne alındığında mevcut mikroorganizmaların lignoselülitik aktivitelerinden faydalanılarak bu kömürlerin işlenmesinde kullanılabilmesi açıkça görülmektedir.

Toprakta yaygın olarak bulunan *Pseudomonas* cinsi bakterilerin ise bir çok hastalığa neden olduğu bilinmektedir, bu bakteri türlerinin lipaz aktiviteleri yüksek olması özellikle çevre kirliliği bakımından ciddi risk oluşturan kirletici faktörleri önemli oranda degradasyon kabiliyeti göstererek toprağın doğal yolla temizlenmesinde rol oynaması sebebiyle çevre biyoteknolojisine yönelik çalışmalarda tercih edilmektedir (Onbaşılı 2006) .

Yine biyoteknolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılan *Bacillus* ve *Arthrobacter* cinsi bakterilerin linyiti çözebilen alkali bileşenler ürettiği ve lignoselüloolitik enzimler sentezledikleri literatür verileri arasında yer almaktadır. Bu bakteri türlerinden bazılarının enzim aktiviteleriyle lignin bağlarını çözerken diğer bazılarının da bu işlemi ürettiği çeşitli metabolitlerle gerçekleştirdiği düşünülmekle birlikte mekanizması tam anlamıyla çözülmüş değildir (Lerato *et al.* 2012).

Yakın zamanda yeni türlerinin keşfi yapılan psikrotolerant, renkli koloniler oluşturan *Kocuria polaris* üzerine yürütülen çalışmalarda bu bakterinin soğuğa toleransı göz önünde bulundurularak dondurma, gıda ve eczacılık alanlarında renkli pigmentlerinin kullanılabileceği fikri ileri sürülmüş ve bu bağlamda çalışmalar yürütülmüştür. Literatür verilerinde bu bakterinin amilaz, üreaz ve lipaz aktivitelerinin yüksek olduğuna dair bilgilerle çalışmamızda bulduğumuz verilerle örtüşmektedir. Bu bakteri türleri henüz maden işleme teknolojilerinde kullanılmamış olsa da yüksek tuz oranı ve düşük sıcaklık gibi ekstrem ortamlarda yaşayabilmesi ve patojen özellik taşıması bu mikroorganizmayı uygun sanayi endüstrilerinde kullanılabilir kılmaktadır (El-Sharouny *et al.* 2013; Yusef *et al.* 2014).

Rhodococcus türleri daha önce de kömür ve diğer fosil yakıtları işleme teknolojilerini geliştirecek uygulamalara ön hazırlık teşkil edecek çalışmalarda kullanılmış ve sonuç olarak kömürdeki önemli kirleticilerden biri olan organik sülfürün uzaklaştırılmasında başarıya ulaşılmıştır (Kilbane and Jackowski 1992; Konishi *et al.* 1997).

Çalışmamızda izole edilen diğer mikroorganizma çeşidi olan küflerin üç tanesinin *Alternaria*, beş tanesinin *Penicillium* ve on iki tanesinin de *Aspergillus* türlerine ait olduğu belirlenmiştir.

Aspergillus cinsine ait türler Antarktika dahil bütün dünyada yaygın olarak bulunan hifli mantarlardır; doğal yaşam ortamları toprak ve çürüyen bitki materyali olan bu türlerin doğadaki temel işlevleri karbon ve nitrojen döngüsüyle ilgilidir. Biyodegradasyonda rol alan bu mantarlar ürettikleri enzimler sayesinde tüm organik maddeleri ayrıştırarak kullanır ve saprofit olarak yaşarlar. Uygun koşullarda bitki, hayvan ve insanlarda patojen hale geçebilmelerine rağmen yaşamsal döngülerini tamamlamak için konak olarak insana gereksinimleri yoktur. Üreme hızları ve kapasiteleri oldukça yüksek olan bu mantarların yaklaşık 250 türünün tanılandığı bilinmektedir. Hala yeni türler tanılanmakla birlikte bu cinse ait yaygın türlerden *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus niger*, mikroflorasını çalıştığımız maden sahasında da yoğun miktarda bulunmaktadır. Yaygın türler arasında sayılmamasına rağmen çalışmamızda ayrıca *Aspergillus ardalensis* ve *Aspergillus flavipes* türleri de izole edilmiştir. Lignin peroksidaz ve degradasyon yeteneği yüksek enzimleri sayesinde bitki ve hayvan dokularını hızla parçalayan bu mikroorganizmaların olgunlaşmamış kömürü kolaylıkla degrade edebileceği ve hızlı üreme kabiliyeti nedeniyle biyoproseslerin süresini kısaltacağı öngörülmektedir (Kantarcıoğlu ve Yücel 2003; Acharya *et al.* 2005).

Alternaria cinsine ait türler daha önce temiz kömür biyoteknolojileri çalışmalarında kullanılmış, kalori değeri düşük, kül ve kükürt içeriği yüksek linyitlere uygulanması sonucu bu mikroorganizmanın metabolik aktivitesi organik ve inorganik kükürdü linyitten başarıyla (%38 ve %51) uzaklaştırmıştır (Aytar *et al.* 2014).

Penicillium cinsine ait türler penisilin antibiyotiğinin keşfinden sonra birçok çalışmaya konu olmuştur. *Penicillium* türleri Mn-peroksidaz, esteraz ve fenoloksidaz enzimlerine sahip olması ve bu enzimlerin yüksek aktivite göstermesi nedeniyle kömür sıvılaştırma denemelerinde kullanılmış ve iyi sonuç vermiştir (Laborda *et al.* 1999).

Tüm bu veriler göz önüne alındığında tez çalışmamızda izole edilen bakteri ve küflerin kömür iyileştirme teknolojilerinde kullanıldığı ve/veya kullanılma potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. Tez çalışmamız, kömür madeni sahasının mikroflorasının belirlenmesi konusunda Türkiye’de ve Dünyada henüz örneğinin bulunmaması bakımından Dünya literatürüne kazandırılmış özgün bir çalışmadır.

Bununla birlikte kömür ve türevlerinin iyileştirilmesini kapsayan ve diğer endüstri kollarında yapılacak benzer biyoteknolojik çalışmalara kaynak sağlayacak, enzim aktiviteleri yüksek, sıcaklık ve tuz toleransına sahip bu değerli mikroorganizmaların kültür koleksiyonu Atatürk Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarında muhafaza edilmekte ve bilim dünyası ile paylaşılmaktadır.

KAYNAKÇA

- Acharya, C., Sukla, L. B., Misra, V. N., 2005. Biological Elimination of Sulphur from High Sulphur Coal by Aspergillus-like fungi”, Fuel, 84, 1597-600.
- Adıgüzel, A., 2006. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Aksan, A., 2010. Türkiye'nin Kömür Politikaları ve Temiz Kömür Teknolojilerinin Kullanılması Durumunda Ülke Ekonomisine Katkılarının Ve Çevresel Etkilerinin Değerlendirilmesi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 123 s.
- Aktaş, M. 2011. Türkiye’de Kömür Madenciliği ve Enerjideki Rolü, TKİ Kurumu Yazılı Bildiri Metni.
- Aytar, P., Aksoy, D., Ö., Toptas, Y., Çabuk, A., Koca, S., Koca, H., 2014. Isolation and Characterization of Native Microorganism from Turkish Lignite and Usability at Fungal Desulphurization. Fuel. 116, 634-641.
- Aytar, P., 2007. Beyaz Çürükçül Funguslarla Linyit Kömüründen Kükürt Giderimi İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi. Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir, 83s.
- Aytar, P., Gedikli S., Şam, M., Ünal, A., Çabuk, A., Kolankaya, N., Yürüm, A., 2011. “Desulphurization of Some Low-Rank Turkish Lignites with Crude Laccase Produced from *Trametes versicolor* ATCC 200801”, Fuel Processing Technology, 92, 71-5.
- Aytar, P., Şam, M., Çabuk A., 2008. “Microbial Desulphurization of Turkish Lignites by White Rot Fungi”, Energy & Fuels, 22, 1196-9.
- Bal, T., 2012. Aşkale (Erzurum) Manyezit Ocaklarından Cevher Zenginleştirme Potansiyeli Bulunan Bakterilerin İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum, 102 s.
- Barış, Ö., 2009. Erzurum İlindeki Mağaralarda Damlatası Oluşumunda Etkili Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Tanısı. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi. Erzurum.
- Başaran, Y., Denizli, A., Sakintuna, B., Taralp, A., Yuda, Y., 2003. Bio-Liquefaction/Solubilization of Low-Rank Turkish Lignites and Characterization of the Products Energy & Fuels, 17, 1068-74.
- Chou, L.C., 2012. Sulfur in Coals: A Review of Geochemistry and Origins, International Journal of Coal Geology, 100, 1-13.
- Çetinkuş, K., 2007. Çamaltı Tuzlası Halofilik Mikroorganizmalarının İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- DPT., 2001. Sekizinci Kalkınma Planı Madencilik Özel İhtisas Komisyonu Raporu (2001-2005), Ankara.
- DPT., 2007. Dokuzuncu Kalkınma Planı Madencilik Özel İhtisas Komisyonu Raporu (2007-2013), Ankara.

- Dülger, S., 1997. Ayder Kaplıcasından Termofilik Bakteri İzolasyonu ve Teşhisi. Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- DEKTMK, 2012. Enerji Raporu 2012 SSN : 1301-6318
- El-Sharouny, E. E., Belal, M. A., Yusef, H. H., 2013. Isolation and Characterization of Two Novel Local Psychrotolerant *Kocuria* spp. with High Affinity Towards Metal Cations Biosorption Life Science Journal 10(4).
- Ersin, M., 2006. Türkiye’de Linyit Kömürlerinin Enerji Kaynağı Olarak Önemi, İstanbul Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. İstanbul, 158 s.
- Fakoussa, R. M., 1988. Production of Water-Soluble Coal-Substances by Partial Microbial Liquefaction of Untreated Hard Coal. Resour Conser Recycl 1251–260.
- Gokcay, F. C., Kolankaya, N., Dilek, B. F., 2001. Microbial Solubilization of Lignites Fuel, 80, 1421-33.
- Gonsalvesh, L., Marinov, S. P., Stefanova, M., Carleer, R., Yperman, J., 2011. Evaluation of Elemental Sulphur in Biodesulphurized Low Rank Coals Fuel, 90, 2923-30.
- Harley, J.P., and Prescott, L.M., 2002. Laboratory Exercises in Microbiology, Fifth Edition New York: The McGraw–Hill Companies, 466p.
- Hasenekoğlu. İ., Yeşilyurt, S., 2001. Mikrobiyoloji. Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi. 692 s.
- Hayta, U., 2010. Linyit-Bitümlü Şist Karışımlarının Pirolyzi Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. Ankara, 87 s.
- Hofricher, M., Fritche, W., 1997. Depolymerization of Low Rank Coal by Extracellular Fungal Enzyme Systems. II. The Ligninolytic Enzymes of The Coal-humic-acide-degradings Fungus *Nematolama frowardii* b19. Applied Microbiology and Biotechnology, 47, 419-424.
- Hündür, S., 2015. Kütahya (Turanocağı ve Ortaocak) Manyezit Ocaklarından Cevher Zenginleştirme Potansiyeli Bulunan Bakterilerin ve Küfrelerin İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. Erzurum, 119s.
- Kantarcıoğlu, A., S., Yücel, A., 2003. *Aspergillus* Cinsli Mantarlar Ve İnvaziv Aspergilloz: Mikoloji, Patogenez, Laboratuvar Tanımı, Antifungallere Direnç Ve Duyarlılık Deneyleri. Cerrahpaşa Tıp Dergisi, 3 (36).
- Kilbane II, J. J., Jackowski, K., 1992. Biodesulfurization of Water-Soluble Coal Derived Material by *Rhodococcus rhodococcus* IGTS8.
- Konishi, J., Ishii, Y., Onaka, T., Okumura, K., Suzuki, M., 1997. Thermophilic Carbon-Sulfur-Bond-Targeted Biodesulfurization. American Society For Microbiology. 3164–3169.
- Kural O., 1998. Kömür Özellikleri, Teknolojileri ve Çevre İlişkileri. İstanbul Teknik Üniversitesi Maden Fakültesi Maden Mühendisliği Bölümü 785 s.
- Laborda, F., Fernandez, M., Luna, N., Monistrol, I. F., 1997. Study of the Mechanisms by which Microorganisms Solubilize and/or Liquefy Spanish Coals Fuel Processing Technology, 52, 95-107.
- Lerato M., Sekhohola, Eric E., Igbini A., Cowan K., 2011. Biological Degradation and Solubilisation of Coal, Springer Science, DOI 10.1007/s10532-012-9594-1
- MTA, 2005. Kahramanmaraş İli Maden ve Enerji Kaynakları Raporu 2005.

- Mueller, P.R., Wold, B., and Garrity, P.A., 2001. Ligation-Mediated PCR For Genomic Sequencing and Footprinting, *Current Protocols in Molecular Biology*, 1-26.
- Narayanasamy, P., 2010. Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis: Bacterial and Phytoplasmal Pathogens, 2, 15-21.
- Nybo, K., 2009. Molecular Biology Techniques Q & A DNA and General PCR Methods: PCR Primer Design. *BioTechniques*, 46(7), 505-507.
- Onbaşı D., 2006. Çevredeki Organik Kirleticilerden Biyoteknolojik Olarak Bazı İkincil Metabolitlerin Üretimi. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 145s.
- Orhan F., 2013 Doğu Anadolu Bölgesindeki Tuzlu Topraklardan İzole Edilen Tuza Dayanıklı Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Erzurum, 206 S.
- Özel, S., 2006. Afşin-Elbistan Linyitinin Yakıt Özelliklerinin İyileştirilmesi. Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 94.S
- Özkök, M.A., 2005. Stratejik Hammadeler ve Türkiye. Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Gebze. 92.S
- Özşahin A. D., 2006. Kahramanmaraş İli Kağıt Fabrikaları Çevresinden İzolasyonu Yapılan *Bacillus* Sp. Suşlarından Elde Edilen Selüloz Enziminin Karakterizasyonu ve Biyoteknolojide Kullanılabilirliğinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş, 58s.
- Rittie, L., and Perbal B., 2008. Enzymes Used in Molecular Biology: a Useful Guide. *J. Cell Commun, Signal*, 2, 25-45.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., 1988. Primer- Directed Enzymatic Amplification of DNA With a Thermostable DNA Polymerase, 239, 487- 494.
- Selvi, A. V., Banarjee, R., Ram, I. C., Singh, G., 2009. Biodepolymerization Studies of Low Rank Indian Coals. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 1713-1720.
- Tao, X. X., Chen, H., Shi, K. Y., Lv, Z. P., 2010. Identification and Biological Characteristics of a Newly Isolated Fungus *Hypocrea lixii* and Its Role in Lignite Bioconversion. *African Journal of Microbiology Research*. 4(17), 1842-1847.
- TBMM, 2010. Madencilik Sektöründe Sorunların Araştırılarak Alınması Gereken Önlemlerin Belirlenmesi, Ankara, 781 s.
- Temiz, A., 2000. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatipoğlu Yayınevi, Ankara.
- TKİ, 2009. Kömür Sektör Raporu (Linyit) 2009.
- TKİ, 2011. Kömür Sektör Raporu (Linyit) 2011.
- TKİ, 2013. Kömür Sektör Raporu (Linyit) 2013.
- 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.
- Turan, 1983. Madencilüğümüzün Tarihsel Gelişimi. *Cumhuriyet Dönemi Türkiye Ansiklopedisi* 1332-1338.
- Topkaya, M. ve Bircan, A., 1968. Türkiye Madenciliğinin Tarihçesi. *Madencilik*, 7 (3).

- TCEB, 2012. Madencilik Sektörü, Sektör Raporları Ankara, 23 s.
- Türkyılmaz, S., ve Esendal, M,Ö., 2002. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Mikrobiyolojide Kullanım Alanları. Kafkas Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 8(1), 71-76.
- Yusef, H. H., Belal, M. A., El-Sharouny, E.E., 2014. Production of Natural Pigments From Novel local Psychrotolerant *Kocuria* spp. Life Science Journal, 11(9).

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Antalya'nın Alanya ilçesinde doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini Alanya'da tamamladı. 2007 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2011'de biyolog olarak mezun oldu. 2011 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans öğrenimine başladı. Bu süre zarfında 43., 44., 45., 46. TÜBİTAK Ortaöğretim Öğrencileri Arası Araştırma Projelerinde görev aldı. 2013 yılında Erzurum Palandöken Devlet Hastanesi mikrobiyoloji laboratuvarında Biyolog olarak göreve başladı ve halen bu kurumda çalışmaktadır.