

**AŞKALE (ERZURUM) MANYEZİT OCAKLARINDAN
CEVHER ZENGİNLEŞTİRME POTANSİYELİ BULUNAN
BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

Tuğba BAL
Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL
2012
Her hakkı saklıdır.

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**AŞKALE (ERZURUM) MANYEZİT OCAKLARINDAN CEVHER
ZENGİNLEŞTİRME POTANSİYELİ BULUNAN BAKTERİLERİN
İZOLASYONU VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Tuğba BAL

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

**ERZURUM
2012**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

Aşkale (Erzurum) Manyezit Ocaklarından Cevher Zenginleştirme Potansiyeli Bulunan Bakterilerin İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu

Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında, Tuğba BAL tarafından hazırlanan bu çalışma 01 /08/ 2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak ~~oybirliği/oy~~ **oybirliği** (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

İmza : 

Üye : Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

İmza : 

Üye : Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

İmza : 

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU

Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projesi kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: 2010/272

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

AŞKALE (ERZURUM) MANYEZİT OCAKLARINDAN CEVHER ZENGİNLEŞTİRME POTANSİYELİ BULUNAN BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Tuğba BAL

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Bu çalışmada; Erzurum- Aşkale sınırları içerisinde yer alan üç farklı manyezit madeni ocağından örnekler alınarak, cevher zenginleştirme potansiyeli olan bakterilerin izolasyonu gerçekleştirildi.

Elde edilen izolatların tanı ve karakterizasyonu konvensiyonel (morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler) ve moleküler yöntemlere (yağ asiti metil ester profilleri (FAME), BOX-PCR ve 16S rRNA) göre yapıldı. Sekans analizleri sonucunda, bu bakteri izolatlarının 2'sinin *Staphylococcus epidermidis*, 2'sinin *Bacillus sp.*, 2'sinin *Exiguobacterium sibiricum*, 4'ünün *Exiguobacterium aurantiacum* ve diğerlerinin ise sırasıyla *Staphylococcus haemolyticus*, *Shewanella baltica* ve *Klebsiella oxytoca* olduğu belirlendi.

2012, 97 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Manyezit, Bakteri, İzolasyon, MIS, 16S rRNA, BOX PCR

ABSTRACT

Master Thesis

ISOLATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE BACTERIA WHICH HAVE POTENTIAL OF ORE ENRICHMENT IN MAGNESITE QUARRIES IN AŞKALE (ERZURUM)

Tuğba BAL

Ataturk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ahmet ADIGUZEL

In this study; the isolation of bacteria which have potential of ore enrichment was carried out by taking samples from three magnesite quarries which are located in Erzurum-Askale borderlines.

The obtained isolates were identified and characterized according to the conventional (morphological, physiological and biochemical tests) and molecular techniques (fatty acid methyl ester profiles (FAME), BOX PCR and 16S rRNA). As a result of sequence analysis, it was determined that 2 of these bacteria isolates were *Staphylococcus epidermidis*, 2 of them were *Bacillus sp.*, 2 of them were *Exiguobacterium sibiricum*, 4 of them were *Exiguobacterium aurantiacum* and the others were *Staphylococcus haemolyticus*, *Shewanella baltica* ve *Klebsiella oxytoca*, respectively.

2012, 97 pages

Keywords: Magnesite, Bacteria, Isolation, MIS, BOX PCR, 16S rRNA

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı (2010/272) tarafından desteklenmiş olup; Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji laboratuvarı ile Yeditepe Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü laboratuvarında yürütülmüştür.

Bu araştırmanın planlanması ve yürütülmesinde emeği olan tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e ayrıca çalışmanın değerlendirilmesinde büyük emeği geçen, çalışmalar dışında da hiçbir zaman yardım ve desteklerini esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE'ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın farklı aşamalarında ve tezin hazırlanma sürecinde fikirlerinden istifade ettiğim Sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Özlem BARIŞ'a ve Sayın Arş. Gör. Derya YANMIŞ'a, manevi desteklerinden dolayı tüm Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji Laboratuvarı çalışanlarına, ayrıca çalışmalarımın bir bölümünü yürüttüğüm Yeditepe Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN'e, Turkmag Madencilik Sanayi ve Ticaret A.Ş.'deki Makine Mühendisi Sayın Yalçın YANMIŞ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım boyunca benim bütün zorluklarıma katlanan, eğitimimin her aşamasında maddi, manevi desteklerini esirgemeyen ve bana olan güvenlerinden dolayı anneme, babama ve kardeşime de sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tuğba BAL

Temmuz 2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER	10
2.1. Maden ve Madencilik	10
2.2. Dünya ve Türkiye’de Madenler	12
2.3. Manyezit	14
2.3.1. Manyezitin tarihçesi	14
2.3.2. Manyezitin tanımı, manyezitin fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	14
2.3.3. Türkiye’de manyezit yatakları.....	16
2.3.4. Manyezitin kullanım alanları.....	17
2.4. Karbonatlı Bir Bileşik Olan CaCO ₃ Nedir?	18
2.5. Canlı ve Çevre İlişkileri	20
2.6. İzole Edilen Bakterilerin Tanınması ve Karakterizasyonu	24
2.7. Bakteri Sistematiğinde Kullanılan Konvensiyonel Yöntemler	25
2.7.1. Koloni morfolojisi	26
2.7.2. Hücre morfolojisi	26
2.7.3. Spor boyama.....	26
2.7.4. Büyüme sıcaklıkları, pH aralıkları ve oksijen ihtiyaçları.....	27
2.7.5. Gram reaksiyon testi.....	27
2.7.6. Katalaz, oksidaz, amilaz ve nitrat resüksiyon testleri	27
2.8. Bakteri Sistematiğinde Kullanılan Moleküler Yöntemler.....	30
2.8.1. PCR tekniği ile gen amplifikasyonu.....	31
2.8.1. Genomik parmak izi analizleri	33
2.8.3. 16S rRNA veya 16S rDNA analizleri	34

2.8.4. Yağ asit profilleri (Mikrobiyal Tanılama Sistemi=MIS)	35
2.8.5. DNA hibridizasyonu.....	36
2.8.6. Serolojik teknikler	36
3. MATERYAL ve YÖNTEM	38
3.1. Manyezit Madeni Örneklerinin Alınması	38
3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar	38
3.1.2. Kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı	39
3.2. Yöntem	45
3.2.1. Manyezit madeni mikroflorasından bakterilerin izolasyonu ve muhafazası....	45
3.2.2. İzolatların CaCO ₃ üzerine çözücü özelliklerinin araştırılması	46
3.2.3. İzolatların MgCO ₃ üzerine çözücü özelliklerinin araştırılması.....	46
3.2.4. Morfolojik testler.....	46
3.2.4.a. Hücre morfolojisi.....	46
3.2.4.b. Hücre boyutlarının belirlenmesi.....	46
3.2.4.c. Gram reaksiyon testi.....	47
3.2.4.d. Endospor varlığının ve hücre içindeki yerinin belirlenmesi	48
3.2.4.e. Hareketlilik testi	48
3.2.4.f. Kültür özelliklerinin belirlenmesi	48
3.2.5. Fizyolojik testler.....	49
3.2.5.a. İzolatların gelişme sıcaklıklarının belirlenmesi.....	49
3.2.5.b. İzolatların gelişebildikleri pH aralıklarının belirlenmesi	49
3.2.6. Biyokimyasal testler	49
3.2.6.a. Katalaz testi	49
3.2.6.b. Oksidaz testi	50
3.2.6.c. Amilaz testi.....	50
3.2.6.d. Nitrat redüksiyon testi	51
3.2.7. Moleküler testler.....	51
3.2.7.a. Bakteri izolatlarının yağ asit profillerinin belirlenmesi.....	51
3.2.7.b. İzolatların bazı genetiksel özelliklerinin belirlenmesi.....	53
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	60
4.1. Bakteri İzolasyonu Sonuçları	60
4.2. İzolatların CaCO ₃ Üzerine Çözücü Özelliklerinin Sonuçları.....	60

4.3. İzolatların MgCO ₃ Üzerine Çözücü Özelliklerinin Sonuçları.....	62
4.4. İzolatların Morfolojik Test Sonuçları.....	63
4.5. İzolatların Fizyolojik Test Sonuçları.....	64
4.6. İzolatların Biyokimyasal Test Sonuçları	65
4.7. İzolatların Yağ Asit Profillerine Göre Analiz ve Tanı Sonuçları.....	65
4.8. BOX PCR Amplifikasyon Sonuçları.....	68
4.9. BOX PCR Sonuçlarına Göre Cluster Analizi.....	69
4.10. 16S rRNA PCR Amplifikasyon Sonuçları	70
4.11. İzolatların 16S rRNA Gen Bölgelerinin Baz Dizileri	70
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	72
KAYNAKLAR	80
EKLER	89
EK 1	89
EK 2	90
EK 3	91
EK 4	92
EK 5	93
EK 6	94
EK 7	95
EK 8	96
EK 9	97
ÖZGEÇMİŞ	98

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre (10 ⁻⁶)
µM	Mikromolar
A	Absorbans
bp (bç)	Base pair (Baz çifti)
BSA	Bovine Serum Albumin
CTAB	Hekzadesil trimetil-amonyum bromit
dk	Dakika
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleikasit
DNA	Deoksiribonükleotik asit
dNTP	Deoksinükleotittrifosfat
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ERIC-PCR	Enterobacterial repetitive intragenic consensus
FAME	Yağ asit metil ester
g	Gram
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HPLC	High Pressure Liquid Cromatography (yüksek basınç sıvı kromatografisi)
KI	Potasyum iyodit
KOH	Potasyum hidroksit
L	Litre
M	Molar
MIS	Mikrobiyal tanılama sistemi
ml	Mililitre (10 ⁻³)
N	Normal
NA	Nutrient Agar
NaCl	Sodyum klorit tuzu
NAS	Nutrient Agar + sükroz
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu

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

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Manyezitin Genel Görünüşü	15
Şekil 2.2. Türkiye Manyezit Rezervlerinin Dünyadaki Dağılımı	16
Şekil 2.3. Karşılaştırmalı rRNA gen dizilemesi ile tanımlanmış filogenetik yaşam ağacı	25
Şekil 2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	32
Şekil 2.5. Bakteri tanılanmasında kullanılan yağ asit metil ester analizi (FAME)	35
Şekil 4.1. YDC-agar besiyerinde zon oluşturan 13 izolatın fotoğrafları	61
Şekil 4.2. Bakteri izolatlarının BOX PCR elektroforez sonuçları	68
Şekil 4.3. Bakteri izolatlarının 16S rRNA PCR elektroforez sonuçları	70

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Madenlerin Sınıflandırılması	11
Çizelge 2.2. Endüstriyel Madenlerde Dünyadaki İlk Üç Ülke.....	13
Çizelge 4.1. İzolatların morfolojik özellikleri.....	63
Çizelge 4.2. İzolatların katı ve sıvı kültür özellikleri.....	64
Çizelge 4.3. İzolatların fizyolojik özellikleri	64
Çizelge 4.4. İzolatların biyokimyasal test sonuçları	65
Çizelge 4.5. İzolatların yağ asit profilleri esas alınarak Sherlock 6.0 kütüphanelerine göre tanı sonucu ve yüzde tanı değerleri	66
Çizelge 4.6. Sherlock 6.0 kütüphanelerine göre izolatların yağ asit profilleri.....	67
Çizelge 4.7. BOX PCR sonuçlarına göre cluster analizi.....	69
Çizelge 4.8. İzole edilen bakterilerden elde edilen 16S rRNA gen dizileri ile gen bankasındaki 16S rRNA gen dizilerinin karşılaştırılması	70

1. GİRİŞ

Maden, diğer adıyla cevher yer kabuğunda iç ve dış doğal etkenlerle oluşan, ekonomik yönden değer taşıyan minerallere verilen addır. Yerkabuğunun içerisinde, kayaçların bileşiminde yer alan mineral toplulukları olan madenler, büyük ölçüde yerin jeolojik yapısına ve yapının oluşum zamanına bağılı olarak şekillenmektedirler (Wikipedia 2012).

Madencilik, insanlık tarihiyle birlikte başlar ve tarihin her döneminde insanlar için vazgeçilmez öneme sahip olmuştur. İnsanoğlu yeryüzüne yakın kısımlardan veya erişebildiği derinliklerden, kullanabileceği her türlü mineralin elde edilmesinde büyük çaba göstermiştir. Bu durum, günümüze kadar artarak süre gelmiş ve yaşamımızın her alanına derinlemesine işlemiştir. İnsanlar ilk çağlardan itibaren madencilik faaliyetlerine ve madenlerden yararlanmaya başlamışlar, bu faaliyetlerin sonucunda da medeniyetin doğuşunu sağlamışlardır. Uzay çağı ve sanayi ötesi bilgi toplumunun doğuşu da, maden ürünlerinden sağlanan özel metal, alaşım ve malzemeler sayesinde gerçekleşmiştir. Madencilik, ayrıca tarım ile birlikte toplumların hammadde ihtiyaçlarını sağlayan iki temel üretim alanından birisi konumundadır (Önal 2004). İçinde bulunduğumuz yüzyılda da, madencilik faaliyetleri olmaksızın insan yaşamının sürdürülebilmesi olası değildir. Bugün, kullandığımız arabalardan, içinde yaşadığımız evlere, bilgisayarlardan telefonlara kadar yaşamımız için vazgeçilmez olan hemen her şey, madencilik etkinlikleri sonucu elde edilen ürünler sayesinde varlık kazanabilmektedir (TMMOB 2011).

Genellikle ülkelerin maden tüketimi ile gelişmişlik düzeyleri arasında doğrudan bir ilişki olduğu gözlemlenmekte olup, gelişmiş ülkelerin var olan ekonomik güçlerine sahip olmalarında, doğal kaynakları etkin bir şekilde kullanmalarının büyük rol oynadığı görülmektedir (TBMM Araştırma Komisyon Raporu 2010). Günümüzde, dünyada yıllık 1,5 trilyon dolar değerinde 10 milyar tonun üzerinde maden üretilmektedir. Bu rakamın %75'i enerji ham maddeleri, %10'u metalik madenler ve %15'i de endüstriyel hammadde üretimine aittir. Bu kapsamda verilen değerlerden

madencilik endüstrisinin dünya ekonomisi için ne kadar önemli olduğu görülmektedir. Dünyada madenciliğin güçlü olduğu ülkeler arasında ABD, Çin, Güney Afrika, Kanada, Avustralya ve Rusya sayılabilmektedir. Dünya maden rezervleri açısından en zengin ülkeler ve bu ülkelerdeki önemli maden cevherleri aşağıdaki gibidir:

- ✓ Güney Afrika Cumhuriyeti - Altın, platin grubu metaller, manganez, krom, alüminyum
- ✓ Çin - Demir, kurşun, manganez, molibden, kalay, zirkonyum, çinko ve fosfat
- ✓ Kanada - Uranyum, çinko, altın, bakır, nikel, kobalt, demir, petrol ve doğal gaz
- ✓ Avustralya - Kömür, demir, rutil, çinko, kurşun ve uranyum
- ✓ ABD – Kurşun, molibden ve fosfat cevherleri

Türkiye ise farklı jeolojik zamanların yaşandığı, kıtalar arası hareketliliğin, tektonizmanın, magmatik hareketlerin ve volkanizmanın çok yoğun gerçekleştiği bir coğrafyadır. Bu jeolojik durum, ülkemizde büyük ve süreklilik gösteren maden rezervlerinin varlığını engellerken, çok çeşitli madenlerin bulunmasına da neden olmaktadır. Bu durum Türkiye'yi, madencilik sektöründe, maden rezervleri açısından zengin ülkeler arasında önemli hale getirmektedir (Tuna 2011).

Dünyada yaklaşık 90 çeşit madenin üretimi yapılmaktayken ülkemizde 60 civarında maden türünde üretim yapılmaktadır. MTA verilerine göre, dünyada 132 ülke arasında toplam maden üretim değeri itibarıyla 28'inci sırada yer alan Türkiye, maden çeşitliliği açısından 10'uncu sırada bulunmaktadır (TBMM Araştırma Komisyon Raporu 2010). Ülkemiz, başta endüstriyel ham maddeler olmak üzere, bazı metalik madenler, linyit ve jeotermal kaynaklar gibi enerji ham maddeleri açısından zengindir. Dünya endüstriyel ham madde rezervlerinin %2,5'i; kömür rezervlerinin %1'i; jeotermal potansiyelinin %0,8'i ve metalik maden rezervlerinin %0,4'ü ülkemizde bulunmaktadır (DPT 2007; TBMM Araştırma Komisyon Raporu 2010).

Türkiye rezervleri birkaç maden dışında dünya ölçeğinde kısıtlıdır, fakat maden kaynakları ve çeşitliliği bakımından kendi kendine kısmen yeterli olan ülkeler arasında yer almaktadır. Dünya maden rezervlerinin binde 5'i Türkiye'de bulunmaktadır (Özkök

2005). Bazı maden kaynakları açısından da dünyanın en büyük rezervlerine sahiptir. Türkiye 50 çeşit madende ise kısmen yeterli kaynaklara sahipken, 27 maden ve mineralin günümüzde bilinen rezervleri ve kaliteleri, ekonomik madencilik için yetersizdir. (DPT 2007; TBMM Araştırma Komisyon Raporu 2010).

Türkiye'deki yetersiz mineral kaynakları arasında; bakır, manganez, grafit, boya toprakları, kurşun, alüminyum, maden kömürü, zirkon, çinko, arsenik, talk, titan, demir, kükürt, mika, nikel, fosfat, kil mineralleri gelmektedir. Zengin mineraller arasında ise; sepiyolit, fluorit, kireçtaşı, gümüş, altın, bentonit, trona, asbest, zımpara taşı, krom, molibden, boksit, sodyumsülfat, zeolit, profilit, kuvars-kuvarsit, linyit olarak sıralanmaktadır. Buna karşılık endüstriyel ham maddelerde oldukça zengin konumda olan ülkemiz, başta bor, trona, mermer, feldspat, alçıtaşı, pomza, perlit, stronsiyum, kalsit ve manyezit ile dünyanın sayılı zengin ülkelerinden birisi konumundadır (Özkök 2005; DPT 2007; Tuna 2011).

Manyezit, yer kabuğunda %1,39 oranla en çok bulunan sekizinci mineraldir. Türkiye; Çin, Rusya, Brezilya ve Kuzey Kore'den sonra en büyük manyezit yataklarına sahip 5. ülkedir. Türkiye'nin manyezit rezervi 168,4 milyon tondur. Manyezit, ülkemizin dünya maden sektöründe rekabet edebileceği madenlerden biridir. İhraç ettiğimiz manyezit ürünleri arasında tabii magnezyum karbonat ve ateşe dayanıklı tuğla en büyük paya sahiptir. Dünyadaki toplam ham manyezit üretiminin %30,2'si Avrupa ülkelerinde, %69,8'i ise diğer ülkelerde gerçekleşmektedir. Türkiye, Avrupa içerisinde ham manyezit üretimi bazında %51,3; Slovakya %15,8; Avusturya %12,2; İspanya %2; Yunanistan ise %8 paya sahiptir. Ham manyezit üretimi baz alındığında ülkemiz, Çin'den sonra dünyanın ikinci büyük üretici ülkesidir. 2008 yılında Türkiye, dünya manyezit ihracatında %32 ile ilk sırada yer almıştır (DPT 2007; Tuna 2011).

Dünya manyezit rezervlerine bakıldığında Türkiye, yüzölçümünün yaklaşık %85'inin manyezit oluşumuna uygun ultrabazik kökenli kayalarla kaplı olmasından dolayı, önemli manyezit yataklarına sahiptir (Akkoyun 2001). Türkiye'de manyezit oluşumlarına sahip illerimiz; Denizli (Hırsız Dere-Çambaşı Köy ve civarı), Erzincan

(Çayırılı ve Refahiye), Erzurum (Aşkale), Balıkesir (Dursunbey), Bursa (Mustafa Kemalpaşa ve Orhaneli), Kütahya (Kınık), Bilecik, Eskişehir (Mihallıççık), Bolu (Mudurnu), Konya (Meram-Yunak), Seyhan-Adana (Haruniye), Datça-Muğla (Kızlar Köyü), Fethiye-Muğla (Göcek) ve Isparta (Değirmenderesi) olarak sıralanabilir (Akkoyun 2001).

Manyezit, magnezyum oksit (MgO) hammaddesinden oluşan önemli bir endüstriyel refrakter malzemedir. Refrakter malzeme; 1000°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda uzun süre kullanılabilen ateşe dayanıklı malzemeler olarak tanımlanır. Başlıca magnezyum bileşenlerinden olan manyezit; yapısını oluşturan magnezyum karbonat (MgCO₃), teorik olarak %47,62 magnezyum oksit (MgO) ve %52,38 karbon dioksit (CO₂) içermesine karşın, değişik oranlarda kalsiyum, silisyum, demir, mangan ve alüminyum elementlerini de bulundurur. Rengi beyaz, sarı veya gri ile kahverengi arasında değişmektedir. Bütün bunların başında toplam tüketiminin %80 ini kapsayan ve magnezya adı verilen MgO bulunmaktadır (Sha-Sha *et al.* 2011).

MgO, ergime sıcaklığının yüksek olması nedeniyle refrakter malzeme endüstrisinin önemli bir hammaddesi durumundadır. MgO ile birlikte diğer magnezyum bileşikleri, demir-çelik, çimento, ilaç, kozmetik, kimya, kâğıt, tekstil, kauçuk sanayilerinden boya ve patlayıcı madde yapımına kadar pek çok kullanım alanıyla tüm dünya ülkelerinde aranan hammaddelerin başında gelmektedir (Carretero and Pozo 2010; Sha-Sha *et al.* 2011; Torun ve Avşaroğlu 2012). Tüm bu veriler ele alındığında, endüstriyel bir hammadde olan bu cevherin, kalitesinin artırılması gerekmektedir. Cevherin kalitesi de içerdiği bileşik miktarına göre artmakta veya azalmaktadır (DPT 2001).

Her maden (cevher) bir mineraldir, ancak her mineral cevher değeri taşımaz. Bir mineralin cevher değeri taşınması için piyasa şartları gibi bir takım ekonomik etkenlerce belirlenen tenör değerlerine sahip olması gerekir. Tenör; cevherde bulunan ve cevherin zenginleştirilmesi veya işlenmesi sonucunda elde edilen ürün içerisindeki kıymetli elementin yüzdesel bir oran olarak ifadesidir (Wikipedia 2012). Madencilik alanında yüksek tenörlü cevherlerin bulunmaması, düşük tenörlü cevherlerin ve yeterince

zenginleştirilememiş atıkların tekrar kullanılmasının kaçınılmaz olması, yeni teknolojilerin gelişmesine neden olmaktadır. Bu teknolojiler ise fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemlerden oluşmaktadır (Kocadağistan 2007).

Manyezit cevherinin de ekonomik ve kaliteli olup olmamasını doğrudan etkileyen ve yapısında bulunan en önemli kirleticilerin başında kireç (CaCO_3), silis (SiO_2) gelmektedir ve cevherin ticari anlamda kullanılabilmesi için bu safsızlıkların oranlarının sırasıyla %1 ve %2'den az olması gerekmektedir. Fakat bunun yanında manyezit bünyesinde yer alan Mg'un da, özellikle saf halde ve/veya safa yakın elde edilmesi cevherin kalitesi açısından oldukça önemli bir prosestir. Çünkü magnezyum, gerek saf halde gerekse çeşitli bileşikler halinde günümüz teknolojisi için oldukça önemli bir ham maddedir. (Erdoğan vd. 2004, Demir and Dönmez 2008).

Manyezit işleme teknolojisi, maden yatağından cevherin üretimi ile başlar ve genellikle açık işletme metodlarıyla, nadiren de kapalı işletme metodlarıyla üretilen cevher, genel olarak bir zenginleştirme işlemine tabii tutulur. Günümüze kadar yapılan çalışmalar bu kirletici bileşenlerin uzaklaştırılmasını hedef almış ve birçok cevher zenginleştirme yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin ilk grubunu, manyezit zenginleştirme çalışmalarında uzun zamandır kullanılmakta olan, fiziksel ve kimyasal yöntemler oluşturmaktadır (Demir and Dönmez 2008).

Ülkemizin çeşitli bölgelerinden alınan manyezit cevherlerinin, fiziksel ve kimyasal yöntemlerle zenginleştirilmesini amaçlayan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Fiziksel zenginleştirme yöntemleri; manyetik ayırma, manyetik ayırma+liç ve kalsinasyon, elle ayıklama, gravite ve flotasyon, manyezit yüzey özellikleri ve flokülasyonu, kolon flotasyonu, amin flotasyonu ve seçimli aglomerasyon (yağ aglomerasyonu) olarak adlandırılan çalışmalardır (Erdoğan 2004). Bununla birlikte hem organik hem de inorganik asitlerin kullanılarak yapıldığı kimyasal zenginleştirme çalışmaları da bulunmaktadır. Kalsit, manyezit ve dolomit içeren çeşitli karbonatların hidroklorik asit solüsyonunda çözünmesi, manyezitin sülfirik asit solüsyonunda optimum şartlarda zenginleştirilmesi, sulu karbondioksit ve sitrik asit çözeltilerinde manyezitin

çözünürlüğü, glukonik asit solüsyonunda kalsine manyezitin kimyasal liçi ve hidroklorik asitin çeşitli konsantrasyonlarının, manyezitin bünyesindeki kalsiyumun kimyasal liçindeki etkilerini araştıran çalışmalar kimyasal yöntemlerdir (Chou *et al.* 1989; Abalı vd 2006; Mesci and Sevim 2006; Demir and Dönmez 2008; Bayrak vd 2010; Dönmez vd 2009; Raschman *et al.* 2010).

Yapılan tüm bu fiziksel ve kimyasal yöntemler, pratikte yaygın şekilde kullanılmasına rağmen, düşük değerli cevherlerin zenginleştirilememesi, geri kazanılan ürün miktarının az olması, düşük verimlilik, yüksek fiyat sınırlandırması, birçok proseste refrakter malzeme kullanılması, yüksek enerji miktarlarına ihtiyaç duyulması, duyarlılığın az olması, kullanılan kimyasalların canlılar ve çevre üzerine olumsuz etkilerinin olması gibi önemli dezavantajlara sahiptir (Liu *et al.* 2003; Sever 2006).

Bu durum karşısında biyoteknolojik gelişmelere paralel olarak madencilikte, biyolojik kazanım teknikleri büyük oranda önem kazanmış ve ticari anlamda da endüstride gittikçe gelişen bir uygulama alanı olmuştur. 1940'larda demir ve sülfürü oksitleyen bakterilerin tanınması ve özelliklerinin belirlenmesi ile madencilik, metalurji ve çevre uygulamalarında yeni fırsatlar ve çalışma alanları doğmuştur. Tüm bunların sonucunda düşük tenörlü cevherlerle, yeterli ölçüde zenginleştirilemeyen atık cevherlerin, yeniden kazanımında çevresel sorunlar oluşturmayan mikroorganizmaların kullanımı yaygın bir şekilde tercih edilmektedir. (Akçıl ve Çiftçi 2003; Sever 2006; Kocadağistan 2007; Liu *et al.* 2008; Pathak *et al.* 2009; Chang *et al.* 2008; Chan *et al.* 2009; Schippers *et al.* 2010; Zhang 2012).

Bazı asidofilik mikroorganizmaların metabolik faaliyetleri sonucu madenlerden, metallerin çözünmesi ve bunu müteakip çözüldüğü metallerin geri kazanımı esasına dayanan biyoliç (mikrobiyolojik liç) yöntemi doğada kendiliğinden gerçekleşen biyolojik yöntemdir. Son yıllarda geliştirilen mikrobiyolojik liç yöntemleri metalik hammaddeler için çok önemlidir. Klasik yöntemler ile çözünemeyen veya parçalanamayan fakir cevherler ve endüstri atıkları, bakteriler ile ekonomik biçimde geri kazanılmakta ve suda çözünmeyen maden filizleri çözünür hale getirilmektedir

(Sever 2006). Biyoliç yöntemi, madencilik endüstrisinde, özellikle sülfürlü cevherlerin zenginleştirilmesinde kullanılan tekniklerden biridir fakat bu teknikle de; oluşan ürünler ile yüksek ağır metal konsantrasyonlarının ve askıda katı maddeleri içeren son derece asidik suların meydana gelmesi, ayrıca bu yöntemin yavaş bir proses olması, kontrolünün zor olması ve mikroorganizmaların aktif olarak varlığının sürdürülmesi gerekliliği gibi dezavantajları bulunmaktadır (Leveille 2000; Kocadağistan 2007; Zhang *et al.* 2009). Bununla birlikte, günümüze kadar yapılan çalışmalarda, düşük kalitede manyezit madenlerinin zenginleştirilmesinde, biyoliç için kullanılan mikroorganizmalar, bu madenin bileşiminde bulunan CaCO_3 'ün tamponlayıcı özelliğinden dolayı uygulanamamıştır.

Bu nedenle, manyezitin biyoteknolojik yöntemlerle zenginleştirilmesi oldukça önemli bir ihtiyaçtır. Bu amaçla yapılabilecek manyezit zenginleştirme uygulamaları genellikle, cevherin yapısında bulunan CaCO_3 , SiO_2 , ve Fe_2O_3 gibi kirletici bileşenlerin uzaklaştırılmasını veya magnezyumun manyezitten çözünmesini sağladığı ölçüde başarılı olacaktır.

Tüm bu veriler ele alındığında düşük kaliteli manyezit madenlerinin zenginleştirilmesinde, madenin bünyesinde yer alan CaCO_3 'ün uzaklaştırılması gerekmektedir. Ancak yapılan fiziksel ve kimyasal yöntemlerin dezavantajları ve biyoliç mekanizmasının manyezite uygulanamaması gibi nedenlerden dolayı bu çalışmalar ile karbonatlı bir bileşik olan CaCO_3 'ün uzaklaştırılması mümkün değildir. Doğada çözünemeyen karbonatların bozunmasında, az çok CO_2 ve asit üreten, çeşitli mikroorganizmaların rol oynadığı bilinmektedir ve çözünemeyen karbonatlar mikroorganizmaların etkisiyle de bozunmaya uğrayabilir. Bu, genellikle mikroorganizmalar tarafından üretilen organik ve inorganik asitlerin bir sonucudur. (Ehrlich and Newman 2009).

Yapılan çalışmalarda karbonatların çözünmesi ve mikroorganizmalar arasındaki ilişki hakkında ise çok fazla araştırma bulunmamaktadır (Lüttge and Conrad 2004). Ancak, Urzi *et al.* (1991) glukozdan; süksinik, pirüvik, laktik ve glukonik asit üreten ve

biyofilm oluşturan *Micrococcus halobius* bakterisinin karbonatların çözünmesinde etkili ve yüzey üzerinde renk değişimine neden olduğunu, Ehrlich and Newman 2009, Johnston and Vestal (1993), Bonaventura *et al.* (2010), bakterilerin de dahil olduğu çeşitli mikroorganizmaların hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak oksalik asit ve diğer organik asitleri (süksinik, pirüvik, laktik, sitrik, asetik ve propionik asit) ürettiklerini ve kalsiyum karbonatın bu asidik ortamların etkisiyle biyolojik olarak çözündüğünü, Perry *et al.* (2004) mikroorganizmaların alginik asit gibi kompleks bileşikler içeren, ekstraselüler metabolitler üreterek karbonatların çözünmesinde etkili olduğunu ve Lüttge and Conrad (2004) bakterilerin hem CO₂, hem de organik asitler üreterek, yerel pH değişikliklerine bağlı olarak, karbonatlı bileşikleri çözebildiklerini belirtmişlerdir.

Bu bilgiler ışığı altında, CaCO₃'ün çözünmesinde etkili olabilen, Türkiye orijinli, yeni bakteri izolatlarının elde edilerek tanılanması ve manyezit madeni üzerine uygulanması ile farklı bir biyoteknolojik çalışma gerçekleşmiş olacaktır.

Biyoteknoloji; biyolojik prosesleri teknik metotlara ve endüstriyel üretim alanlarına uygulayan, biyoloji, biyokimya, mikrobiyoloji, moleküler biyoloji ve genetik mühendisliği ile sıkı bir işbirliği içerisinde çalışan bir bilim dalıdır. Özellikle son zamanlarda, yeni ve etkili izolatların araştırılması ve bu izolatların biyoteknolojik proseslerde kullanılması, biyologlar ile biyoteknologların oldukça ilgisini çekmiştir (Barış 2008).

Yeni bakteri izolatların elde edilerek belirlenmesi; çalışılan alanlardan bakterilerin izolasyonu, karakterizasyonu, tanılanması ve bakteri kütüphanesi oluşturulmasını içerir (Özkan 2009). Bakteri izolatlarının tanılanmasında konvensiyonel ve moleküler teknikler kullanılmaktadır.

Konvensiyonel teknikler; bakteri izolatlarının tanılanmasında geleneksel olarak kullanılan, morfolojik (hücre şekli, boyutu, koloni rengi ve tipi), fizyolojik (farklı sıcaklık ve pH'lardaki gelişim) ve biyokimyasal (yağ asiti analizleri) özelliklerinin incelenmesini içeren, fenotipik özelliklere dayalı yöntemlerdir (Madrid 2001; Adıgüzel

2006; Kıran 2006; Mosivand 2009). Bununla birlikte konvensiyonel yöntemlerin uzun süreli deneylere, fazla iş gücüne, yetişmiş araştırmacılara ihtiyaç duyması, ekonomik olmaması ve alınan sonuçların yoruma açık olması gibi birçok dezavantajı bulunmaktadır. Bundan dolayı, bakterilerin sadece bu özelliklerine göre sınıflandırılmaları, farklı bakteri grupları arasındaki evrimsel ilişkiyi tespit etmede ve özellikle de tür ve tür altı taksonomik grupları belirlemede yetersiz kalmaktadır. Konvensiyonel tekniklerin, bu dezavantajlarından yola çıkılarak bakterilerin tanılanmasında moleküler teknikler geliştirilmiştir (Adıgüzel 2006; Adıgüzel 2009; Gırı 2009; Khiyami 2012).

Moleküler teknikler; özellikle PCR temelli olup mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın şekilde kullanılmaktadır. PCR yönteminin değişik formatları geliştirilerek hedef olan genomik DNA'nın yanı sıra, genomik RNA, 16S-23S rRNA, mRNA molekülleri de kullanılmakta ve bakterilerin tür ve tür altı düzeyde tanılamaları yapılmaktadır. (Adıgüzel 2011; Durmaz 2012; Khiyami 2012). Özellikle son zamanlarda, 16S rRNA geninin *E.coli*'de klonlanması ve sekanslanması ile bakterilerin tanılanması esas, ribozomal gen veritabanındaki sekans bilgilerinin benzerliğine dayanmaktadır. Ayrıca PCR'a dayalı parmak izi analizlerinin yapılmasıyla da, bakterilerin sınıflandırılması, tanılanması ve tiplendirilmesi gerçekleştirilmektedir. Bu yöntem özellikle klinik mikrobiyoloji ve mikrobiyal ekoloji alanlarında yaygın olarak kullanılan bir tekniktir (Külekcı 2012).

Bu çalışma ile Erzurum-Aşkale sınırları içerisinde yer alan üç farklı manyezit madeni ortamındaki, doğal floradan, manyezit cevherinin yapısındaki en önemli kirleticilerden biri olan, CaCO_3 'ü çözme yeteneğindeki bakterilerin, manyezit florasından elde edilmesi ve bu bakteri izolatlarının tanı ve moleküler karakterizasyonlarının yapılması ile bilim dünyasına sunulması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Maden ve Madencilik

Dünyamızda, elementlerin özel bir takım fiziko-kimyasal şartlar altında, bir araya gelmeleri sonucunda mineraller oluşur. Bir veya daha çok mineralin, ekonomik değer taşıyan ve belli geometrilere, yer kabuğunda oluşturdukları birikimlerine maden yatağı denir. Maden yataklarının işletilmesi sonucunda maden ocağı veya işletmesi ortaya çıkar. Gelişen teknolojiler sayesinde insanlığın kullanımına sunulan ve ekonomik değeri bulunan mineral/mineral grupları veya kayalara maden adı verilir ve madenler, milyonlarca yılda oluşan tüketildiğinde yenilenemeyen kaynaklardır. Madenlere bir ekosistem olarak bakıldığında sahip oldukları kimyasal bileşenlerin içeriklerine ve bu içeriklerin özelliklerine bağlı olarak biyosferin oldukça farklı bir parçasını oluşturdukları görülmektedir. (Bağırsakçı 2000; Gadd 2010; Wikipedia 2012).

Madenlerin doğada bulunuş şekilleri rastgele değildir. Çok karmaşık mekanizmaları içeren doğa olayları sonucunda oluşur ve yer kabuğunun özellikli bir takım bölgelerine yerleşirler. Birer doğa gizemi sayılan madenlerin yerleştikleri yerlerden bulunup çıkarılması, yer bilimlerinin temel görevleri arasındadır (Tuna 2011).

Madenler kendi fiziksel ve kimyasal özelliklerine, kullanıldıkları sektörlere göre çeşitli biçimlerde sınıflandırılabilirler. En yalın halde madenlerin sınıflandırılması Çizelge 2.1'deki gibidir (Bağırsakçı 2000).

Çizelge 2.1. Madenlerin Sınıflandırılması (Bağırsakçı 2000)

MADENLER					
Enerji Kaynağı Olan Madenler	Enerji Kaynağı Olmayan Madenler				
	Metal Madenler			Sanayi Madenleri	
	Temel Metaller	Diğer Metaller	Demir-Çelik Hammaddeleri	Endüstriyel Hammaddeler	Taşocak ve İnşaat Malzemeleri
Ham Petrol					
Doğal Gaz	Altın	Kalay	Demir	Kil	Traverten
Bitümlü Şist	Gümüş	Pirit	Magnezyum	Kaolen	Diyabaz
Taş Kömürü	Bakır	Titan		Bentonit	Mermer
Linyit	Kurşun	Civa		Bor Tuzları	Granit
Asfaltit	Çinko	Vanadyum		Manyezit	Kalter
Uranyum	Alüminyum	Arsenik		Zımpara	Dolomit
		Antimuan		Barit	Kalsit
		Kobalt		Kükürt	Bazalt
		Molibden		Fosfat	
		Tellür		Alunit	
		Tantal		Tuz	
		Krom		Diatomit	
		Platin		Perlit	
		Bizmut		Trona	
				Asbest	
				Grafit	

Madencilik; maden niteliğindeki yer kabuğunda bulunan her çeşit faydalı minerallerin bulunup çıkarılması, işletilmesi, değerlendirilmesi, geliştirilmesi, nakledilmesi, çıkarılan cevherin kırma, eleme, öğütme, sınıflandırma, flotasyon, rafinaj gibi bir dizi prosesten geçirilerek hazırlanması ve zenginleştirilmesinin yapılması çalışmalarını kapsamaktadır (Bağırsakçı 2000; DPT 2007; Tuna 2011).

İnsanoğlu ile diğer canlılar arasındaki en önemli fark, hammaddelerden bir şeyler üretebilme kabiliyetidir. İnsanlar tarafından farklı amaçlar için kullanılan yer kabuğunun, ulaşılabilen yerlerinde veya içinde bulunan her şey hammaddeler olarak adlandırılmaktadır. İnsanlar tarih öncesi devirlerden itibaren de madencilğe başlamıştır. Tarih öncesi devirler, tunç devri ve maden devri olarak bilinmektedir. Bu devirlerde zengin bileşikler ile doğada bulunan ve ilk işlenen maden bakırdır. Bunu takip eden dönemlerde insanlar, kurşun, çinko, tunç ve en sonunda demir-çelik üretimine geçmiştir (Erdoğan 2008; Tuna 2011).

2.2. Dünya ve Türkiye’de Madenler

Dünya maden rezervlerinde önemli payı olan aynı zamanda maden üretiminde de rol oynayan ülkelerin başında ABD, Çin, Güney Afrika, Kanada, Avustralya ve Rusya gelmektedir. Dünya ticaretinde madencilik ürünleri arasında, ihracat değerlerine göre ham petrol, demir dışı metaller ve endüstriyel mineraller önemli yere sahiptir. Maden aramacılığına en çok yatırım yapan ülkelerin başında ise yine ABD, Kanada ve Avustralya gelmektedir. Bu durum ülkelerin gelişmişliği ile birlikte maden potansiyeli ile de ilgilidir (Weatherstone 2008; Tuna 2011).

Çok çeşitli cevher ürünleri ve mineralleri üreten ABD, dünyanın lider madencilik ülkesidir. ABD; altın, bakır, gümüş, çinko, molibden ve kömür ile, manganez ve titanyum dışında hemen hemen bütün önemli metallerin üreticisidir. Dünyanın önde gelen madencilik ülkelerinden bir diğeri de Kanada’dır. Ülke, altın, nikel, bakır, çinko, kurşun, demir cevheri ve yakın zamanlarda elmas olmak üzere, çeşitli önemli madenlerin üreticilerinden ve ihracatçılarından birisidir. Birçok madenin üretimi açısından dünyanın en önemli ülkesi konumunda olan Çin’in, ölçek ve büyüklük açısından madencilik endüstrisi de, üretim istatistikleri eksik olsa da, dünyada 3. sırada yer almaktadır. Elmas, nikel, bakır, kömür, altın, platinyum grubu metaller, kalay ve boksit olmak üzere, çeşitli ürünlerde küresel ölçekte lider olan önemli bir mineral üreticisi de Rusya’dır. Avustralya; dünyanın en büyük boksit, elmas, ilmenit ve zirkon üreticisidir. Ayrıca önemli miktarda kömür, demir cevheri, altın, uranyum, çinko, kurşun ve gümüş üretmektedir ve madenlerin çoğunda hemen hemen kendi kendine yetecek kadar şanslıdır. Güney Afrika ise; elmas, uranyum, bakır ve kobalt ile fosfatlar dışında, Afrika’da bulunan hemen hemen tüm metal ve minerallerin üretiminde lider üretici durumundadır (Haselip 2006; Torun ve Avcıoğlu 2008; Weatherstone 2008; TBMM Araştırma Komisyon Raporu 2010; Tuna 2011).

Türkiye ise coğrafik büyüklüğü, jeolojik yapısı ve çeşitli yer altı kaynaklarının oluşumuyla oldukça zengin maden rezervlerine sahiptir. Türkiye’nin maden potansiyeli genel olarak; “çeşitlilik açısından zengin, ancak birkaç örnek dışında dünya ölçeğinde

rezervleri sınırlı” olarak tanımlanmaktadır. Ülkemizde hemen her türden maden varlığına rastlanmaktadır. Bununla birlikte Türkiye'nin zengin olduğu madenler arasında ise ilk sırayı dünya rezervlerinin %72'sini oluşturan bor mineralleri almaktadır (TBMM Araştırma Komisyon Raporu 2010; Tuna 2011).

Türkiye metalik madenlerde önemli bir potansiyele sahiptir. Özellikle altın, çinko, kurşun, bakır, krom ve gümüş bunlar arasında en önemlileridir. Fakat ülkemiz enerji hammaddeleri açısından zengin kaynaklara sahip değildir. Bunun yanı sıra en önemli mineral kaynakları arasında olan trona, mermer, feldspat, alçıtaşı, pomza, perlit, stronsiyum ve kalsit ile Türkiye dünyanın sayılı zengin ülkelerinden birisi konumundadır. Bunlarla birlikte ülkemiz, endüstriyel bir hammadde olan manyezit yönünden de Çin, Rusya, Brezilya ve Kuzey Kore'den sonra en büyük manyezit yataklarına sahip 5. ülke konumundadır. Ayrıca ham manyezit üretimi baz alındığında ülkemiz, Çin'den sonra dünyanın ikinci büyük üretici ülkesidir. Çin, ham manyezit üretimi bazında bakıldığında ülkemizin 4 - 5 katı arasında üretim değerine sahiptir. Ancak işin ticari boyutuna bakıldığında, son yıllarda Çin'in üretiminin büyük kısmının, kendi iç piyasasında tükenir hale geldiği bilinmektedir (DPT 2007; Tejerina *et al.* 2008; TBMM Araştırma Komisyon Raporu 2010; Tuna 2011). Önemli endüstriyel hammaddelerde dünyada ilk 3 sırada yer alan ülkeler Çizelge 2.2'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.2. Endüstriyel Madenlerde Dünyadaki İlk Üç Ülke

Endüstriyel Madenler	Birinci	%	İkinci	%	Üçüncü	%	Toplam %
Kil	Amerika	72	Avrupa Birliği	12	Senegal	4	88
Grafit	Çin	60	Hindistan	16	Brezilya	10	86
Feldspat	Avrupa Birliği	60	Türkiye	10	Tayland	7	77
Barit	Çin	55	Hindistan	12	Amerika	7	74
Perlit	Avrupa Birliği	54	Amerika	19	Japonya	10	83
Bor	Türkiye	53	Amerika	21	Arjantin	12	86
Florspat	Çin	51	Meksika	17	Avrupa Birliği	7	75
Zirkon	Avustralya	49	Güney Afrika	28	Amerika	10	87
Bentonit	Fas	49	Çin	18	İsrail	4	71
Fosfor	Amerika	44	Avrupa Birliği	24	Rusya	6	74
Vermikulit	Güney Afrika	43	Amerika	22	Ukrayna	14	79
Talk	Çin	37	Avrupa Birliği	16	Amerika	11	64
Manyezit	Çin	32	Türkiye	22	Avrupa Birliği	21	75
Kaolin	Avrupa Birliği	31	Amerika	28	Brezilya	19	78
Elmas (Kıymetlitaşlar)	Rusya	30	Botsvana	24	Kanada	13	67
Potas	Kanada	30	Avrupa Birliği	17	Beyaz Rusya	16	63
Jips	Avrupa Birliği	23	Amerika	18	İran	11	52
Tuz	Avrupa Birliği	22	Amerika	18	Çin	18	60
Sülfür	Amerika	19	Kanada	17	Çin	16	52

2.3. Manyezit

2.3.1. Manyezitin tarihçesi

Manyezit minerali bulunmadan önce 1795 yılında J. E. Delanetherie, Magnezyum Karbonat, Sülfat, Nitrat ve Klorit gibi tuzlara “Manyezit” adını vermiştir. A. Brongmart ise aynı terimi magnezyum karbonat ve silikatlar için kullanmış, 1803 yılında “C. F. Ludwing Moravia”da tabii magnezyum ve 1808 yılında “D.L.G. Karsten” magnezyum karbonata “manyezit” adını vermiştir. Manyezitin, metalurjik işlemlerde refrakter olarak kullanılmasına ait ilk bilgiler, 1866-1868 yıllarına aittir. 1890 yılında manyezit, Avrupa’da Besemel ve açık fırınlarda astar olarak kullanılmaya başlanmış, 1913 yılında Pensilvanya’da (ABD), dolomitten magnezya (MgO) üretimi yapılmış, 1885 yılında Fransa’da deniz suyundan magnezyum hidroksit çökeltilerek, sentetik manyezit elde edilmiştir. M.T.A. Enstitüsü raporlarına göre, Türkiye’de manyezit aramaları ilk olarak 1808 yılında “Fransa Elektore Coulant” firması tarafından Sakarya’da yapılmıştır. İlk manyezit üretimi ise 1929 yılında başlamış, 1962 yılına kadar artarak devam etmiş, 1962 yılından itibaren süratle artmıştır. Kalsine manyezit üretimi 1940 yılında başlamış, 1964 yılına kadar önemli bir artış göstermemiş, bu tarihten itibaren üretimin arttığı gözlenmiştir. 1960’lı yıllarda Eskişehir merkez ilçe Sepetçi köyü ve Margı (Kozlubl) köyünde, Fransız ve Avusturyalılar tarafından Kalsine manyezit üretmek amacıyla bir tesis kurulmasına karşın, günümüzde bu tesisler aktif değildir (DPT 2001; Topak 2006).

2.3.2. Manyezitin tanımı, manyezitin fiziksel ve kimyasal özellikleri

Manyezit; formülü $MgCO_3$ olup, teorik olarak bileşiminde %52,3 CO_2 , %47,7 MgO ve çok az miktarda Fe_2O_3 bulunan, sertliği 3,4-4,5 ppm arasında, özgül ağırlığı 2,9-3,1 gr/cm olan bir mineraldir. Rengi beyaz, sarı veya gri ile kahverengi arasında değişir (Şekil 2.1). Manyezit sert ve kompleks bir mineral olup, serpantin veya benzeri kayaçların bozunma ürünüdür. Doğada kriptokristalin (jel/amorf) ve kristalen (iri kristalli) olmak üzere iki şekilde bulunur. Kriptokristalen manyezit, genellikle saf olarak bulunmakla beraber, bir miktar demir, kireç, alümin ve pek az serbest silis karışımı

içerebilir. Cevherin kalitesi de içerdiği bileşiklerin miktarlarına göre artar ya da azalır (Topak 2006; Çakır 2007).

Kalsit ve dolomit'te olduğu gibi, manyezit ısıtılınca CO₂ içeriğini kaybetmektedir (dekompoze olmaktadır). Manyezit 700 ile 1000°C arasında ısıtılınca kostik kalsine manyezite, 1450-1750°C arasında yapılan ısı işleme ile %0,5 CO₂ ihtiva eden, oldukça yoğun ve sert bir bileşen olan sinter manyezite, %0,1'in altında Fe içeren saf manyezit, elektrik fırınlarında 1700°C'nin üstünde ısı işleme tabi tutulunca, çakmaktaşına benzer yoğun bir madde olan ergitilmiş magnezyum oksite dönüşmektedir. (Özkök 2005; Topak 2006; Çakır 2007).

Magnezyum, gerek metal olarak ve gerekse de bileşik halinde günümüz teknolojisinin önemli bir hammaddesini oluşturur. Magnezyum tüketimi, en çok MgO, MgCl₂, Mg(OH)₂, MgSO₄ vb. magnezyum bileşikleri şeklinde gerçekleşmektedir. Bütün bunların başında toplam dünya tüketiminin %80'ini kapsayan sinter manyezit yüksek ergime noktası nedeni ile refrakter malzeme endüstrisinin en önemli kaynağı durumundadır (Çakır 2007). MgO ve diğer magnezyum bileşiklerinin en önemli kaynağı manyezittir. Manyezit bir magnezyum karbonat minerali olup tabiatta sık rastlanan bileşiklerden birisidir (Sha-Sha *et al.* 2011).

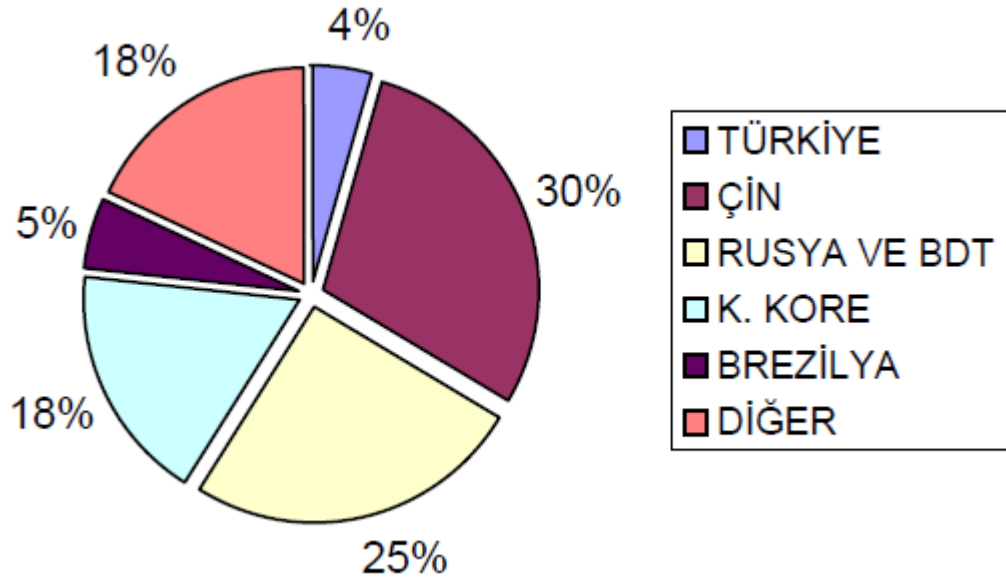


Şekil 2.1. Manyezitin Genel Görünüşü

2.3.3. Türkiye’de manyezit yatakları

Türkiye, manyezit potansiyeli açısından 160 milyon/ton rezervle, dünyada sırasıyla Çin, Kuzey Kore, Eski Sovyetler Birliği Devletleri, Brezilya ve Avusturya gibi ülkelerin ardından 5. sırada bulunur ve dünya toplam rezervinin %4,12’sini içerir (Şekil 2.2). Manyezit madenlerinin, dünyadaki toplam üretiminin %44’ü ise Çin’de yapılmaktadır (Sha-Sha *et al.* 2011).

Ülkemizde, 65 milyon ton ile toplam rezervinin %28’ini içeren, Kütahya-Eskişehir-Bursa Bölgesi’ndeki ocaklar; Balıkesir-Bursa, Bilecik, Afyon, Polatlı ve Kütahya ile sınırlanmış alan içinde kalır. Toplam rezervin %50’sine sahip olan Konya-Güneydoğu Anadolu Bölgesi’ndeki ocaklar; Konya-Fethiye ve Adana-Gaziantep illerini içine alan kısımda bulunur. 10 milyon ton rezerve sahip olan İç Anadolu ve Doğu Anadolu Bölgesi’ndeki ocaklar ise; Erzincan, Erzurum, Çankırı, Çorum ve Yozgat illerinde bulunur (Özkök 2005; Çakır 2007).



Şekil 2.2. Türkiye Manyezit Rezervlerinin Dünyadaki Dağılımı (Özkök 2005).

2.3.4. Manyezitin kullanım alanları

Sinter manyezit, manyezitin 1750°C ısı civarında sinterlenmesi ile elde edilir. Dünyada sinter manyezitin %75'i manyezit mineralinden üretilmektedir. Sinter manyezit üretiminin hemen hemen tamamına yakın kısmı, refrakter endüstrisinde, bazik refrakter tuğla olarak tüketilir. Kostik kalsine manyezit 900°C civarında kalsinasyon işlemiyle elde edilir. Hayvan yeminden, uranyum karbonat liçing sistemlerine kadar geniş bir tüketim alanı vardır (Yıldız ve Erdoğan 1995; DPT 2001; Özkök 2005).

Manyezitin kullanım alanları aşağıda verilmiştir:

- Tarım endüstrisinde, ince dane şeklinde hayvan yemine katkı,
- İri taneli olanlar gübre endüstrisinde, kok oluşturmeyen ince tozlar şeklinde olanlar tozsuzlaştırma malzemesi,
- İnşaat endüstrisinde askı taban, izolasyon inşaat blokları ve hafif yapı elemanı
- İlaç endüstrisi ve tıpta,
- Genel kimya endüstrisinde magnezyum bileşiklerinin üretiminde başlangıç malzemesi olarak,
- Lastik ve plastik endüstrisinde, stabilizatör madde, vulkanizör madde,
- Kağıt endüstrisinde,
- Otomotiv yağlarında, hızlı çalışan motorlar için etkin olarak asitlerin nötrleştirilmesinde katkı maddesi,
- Uranyum cevherlerinden uranyum oksit eldesindeki karbonat devrelerinde, absorbent ve katalizör olarak kullanılmaktadır.

Üretilen manyezit cevherinin, %10 oranındaki ham manyezit ise, magnezyum tuzları ve bazı ilaç yapımı ile çimento, kağıt ve şeker sanayiinde kullanılır (Özkök 2005; Carretero and Pozo 2010).

Magnezyum bileşiklerinin kullanım alanları;

- Magnezyum Karbonat: İzolasyon, lastik, mürekkep, cam, seramik, boya, eczacılık ve kozmetik sanayi.
- Magnezyum Hidroksit: Eczacılık ve şeker rafinasyonu.
- Magnezyum Klorür: Magnezyum metal üretimi, tekstil, kağıt, seramik ve çimento.
- Magnezyum sülfat: Eczacılık, suni gübre sanayi (Yıldız ve Erdoğan 1995; Özkök 2005; Carretero and Pozo 2010).

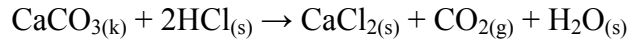
Manyezit mineralinin doğada bu şekillerde kullanılabilir formuna rastlamak oldukça zordur. Çünkü herhangi bir yabancı elementin, manyezit içerisinde %1 oranından az veya çok bulunması, manyezitin bugünkü teknoloji ile ekonomik olarak değerlendirilip, değerlendirilemeyeceğini belirleyebilmektedir. Manyezit içerisinde, bu belirtilen orandan daha fazla bulunan ve madenin ekonomik değerini önemli derecede düşüren kirlenici maddelerden biri ve en önemlisi ise, kalsiyum karbonattır (Yıldız ve Erdoğan 1995; DPT 2001; Çakır 2007).

2.4. Karbonatlı Bileşiklerden Olan CaCO_3 Nedir?

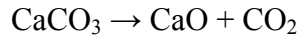
Karbonatlar, yaygın halde bulunan önemli bir mineral grubudur ve karbonik asidin (H_2CO_3) metalik tuzlarıdır. Karbonatlar kristal yapılarına göre bazı alt gruplara ayrılırlar. Kalsit grubu denilen grup, heksagonal kristal yapı gösterir. Bu grubun başlıcaları kalsit [CaCO_3]; dolomit [$\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$]; manyezit [MgCO_3]; siderit [FeCO_3]; rodokrosit [MnCO_3] ve smitsonit [ZnCO_3]’tir. Kalsit; kireçtaşı, mermer ve tebeşir şeklinde önemli kaynaklar hâlinde bulunur ve dolomitte beraber önemli bir yapı malzemesidir. Bütün karbonatlar ihtiva ettikleri metaller için birer cevher durumundadır. Meselâ magnezya, manyezitten elde edilir. Karbonatlar başlıca magnezyum, demir, mangan, çinko, baryum, stronsiyum, kurşun ve kalsiyum karbonatlar olarak bilinmektedir.

Kalsiyum karbonat, halk arasında kireç taşı olarak bilinen, bir tür kimyasal bileşiktir. Bir kalsiyum ve bir karbon, üç oksijen atomu içerir ve bileşik formülü CaCO_3 şeklindedir. Bu bileşik doğada en fazla eski kayalarda ve deniz kabuklarında bulunur. Kalsiyum karbonatın doğada bulunduğu kayalar içinde ise en yoğun bilinenleri, aragonit, kalsit, vaterit, tebeşir, kireç taşı, mermer, traverten ve manyezittir (Annisimov 2012).

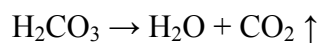
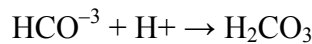
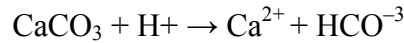
Kalsiyum karbonatın genel görünüşü beyaz bir toz veya taş şeklindedir. Önemli bir karakteristik özelliği de, HCl asit gibi güçlü asitlerle karşılaştığında CO_2 gazını açığa çıkarmasıdır.



Yine 840 °C'ye kadar ısınan kalsiyum karbonat, karbon dioksit açığa çıkarır ve entalpi 178 kJ/mol enerjisiyle kalsiyum oksit ve karbon dioksit oluşur:

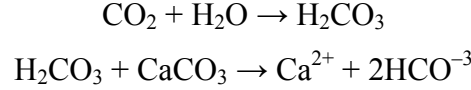


Ayrıca doğada karbonatlar, biyolojik aktivitenin, özellikle mikrobiyolojik aktivite sonucunda da doğrudan ya da dolaylı olarak kolayca parçalanabilmektedir (Golubic and Schneider 1979). Bu kimyasal ayrışımın temeli, asit solüsyonundaki karbonatların kararsız olmalarından kaynaklanmaktadır. Örneğin;



$\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$, CaCO_3 ile karşılaştırıldığında, yüksek çözünürlüğünden dolayı, zayıf asit solüsyonunda bile çözülmeye başlar. CaCO_3 kuvvetli asit çözeltilerinde, hızlı bir şekilde çözünür ve 3. denklemden gösterildiği gibi CO_2 gazının uzaklaştırılması bu

olayın nedenidir. Buradaki biyokimyasal tepkimeler ile çözünemeyen karbonatları çözünebilir hale getirebilme, asit metabolik atıkları üreten, herhangi bir mikroorganizma sayesinde mümkün olmaktadır. Hatta sadece solunum sırasında metabolik olarak üretilen CO₂ de bu etkiye sahip olabilir.



Kalsiyum karbonat, mermer, tebeşir ve kireç taşı gibi farklı malzemelerin üretiminde yoğun olarak kullanılır. Aynı şekilde boya malzemelerinin üretilmesinde yoğun olarak bu bileşikten yararlanılır. PVC üretiminde de kullanılan kalsiyum karbonat, seramik yapımında, çelik ve cam endüstrisinde, kireç, çimento ve harç üretiminde de yararlanılan bir moleküldür (Banks *et al.* 2010; Annisimov 2012).

Tüm bunların yanı sıra kalsiyum karbonatın canlı organizmalarla da ilişkisi bulunmaktadır ve deniz kabukluları, mercanlar, kokolitler ve eksoskeletonların içinde biyomineral olarak yer alır. Buna karşın doğada kireç taşı olarak bulunan kayalardaki kalsiyum karbonatın bozunmasını, sediment ve maden yataklarının oluşmasını da gerçekleştiren organizmalar bulunmaktadır. Bu canlılar özellikle bakteriler, mantarlar, algler, süngerler ve yumuşakçalardır (Kato 2002; Ehrlich and Newman 2009; Gadd 2010)

2.5. Canlı-Çevre İlişkileri

Canlıların çeşitliliğini, yapılarını ve çevre ile ilişkilerini araştırmak, canlı bilimcilerinin en önemli konularını oluşturmaktadır. Canlıların yaşam alanları, onların hem çeşitliliği hem de yapıları üzerine önemli etkiler oluşturmaktadır. Canlıların yaşam alanları ise, biyosfer olarak tanımlanmaktadır. Mikroorganizmalar biyosferde; jeotermal menfezler, mağaralar, buzullar, kaplıcalar, okyanuslar, derin denizler, tuz gölleri, akarsular, bataklıklar, toprak ve madenler olmak üzere birçok alanda kolonize olabilmektedirler (Schlegel 1985; Hasenekoğlu ve Yeşilyurt 2002; Barış 2008; Becerra-Castro *et al.*

2012; Jareonmit *et al.* 2012; Maynaud *et al.* 2012). Günümüzde biyosferin birçok farklı alanlarında, mikrobiyolojik çalışmalar yapılmaktadır (Adıgüzel 2006). Ortam şartlarının ekstrem olduğu bu alanların seçilmesinin sebepleri ise;

- ❖ Bu bölgelerde bulunan mikroorganizmaların önemli adaptasyon yeteneklerine sahip olması,
- ❖ Bu alanların yeterince araştırılmamış olması ve bunun sonucunda da biyolojik çeşitliliği hakkında yeterince bilginin bulunmaması,
- ❖ İzole edilen mikroorganizmaların, metabolizmalarındaki farklılıklar ile enzimlerinin ve metabolik ürünlerinin çeşitli amaçlar için kullanımlarının bulunması olarak sıralanabilir (Satarayana *et al.* 2005; Acar 2009).

Mikroorganizmalar içerisinde, en iyi adaptasyon yeteneğine sahip olan grup ise bakterilerdir. Mikroorganizmalar çıplak gözle görülemeyecek kadar küçük canlılar olup bakteriler, mantarlar, protozoalar, mikroskobik algler ile yine mikroskobik olan, ancak hücre yapısında olmayan, canlı ve cansız arasındaki sınırda kabul edilen virüsleri içerir. Mikroorganizmalar, hayvan ve bitki gibi makroorganizma hücrelerinden farklıdırlar. Bitki ve hayvan hücreleri doğada tek başlarına yaşayamazlar ve hayvanların organ sistemleri veya bitkilerin yapısal kısımlarında olduğu gibi sadece çok hücreli yapıların birer parçası olarak bulunurlar. Aksine, mikroorganizmaların çoğu, aynı veya farklı tip olsun, büyüme, enerji üretimi ve üreme gibi yaşamsal süreçleri diğer hücrelerden bağımsız olarak yerine getirirler. Mikrobiyal hücreler çok hücreli organizmaların hücreleriyle, birçok ortak biyokimyasal özelliğe sahiptir. Gerçekten bütün hücrelerin ortak pek çok özelliği mevcuttur. Üstelik mikrobiyal hücreler laboratuvar kültüründe oldukça yüksek yoğunluklara ulaşabilirler ve biyokimyasal ile genetik çalışmalar için uygundur. Tüm bu özellikler mikroorganizmaları, insan dahil yüksek organizmalarda hücre işlevinin anlaşılması bakımından mükemmel modeller yapmaktadır (Madigan and Martinko 2010).

Mikroorganizmaların birçoğunun, çevremizdeki canlı organizmalar ve kimyasalların dengesinin devamlılığı için hayati katkıları vardır. Suda yaşayan mikroorganizmalar,

okyanusların, göllerin ve nehirlerin besin zincirlerinin temel halkasını oluştururlar. Toprakta yaşayan mikroorganizmalar atıkların parçalanmasına, toprak, su ve havadaki kimyasal elementlerin döngüsüne yardımcı olurlar. Kısaca mikroorganizmaların dünyamızdaki yaşamın devamında çok önemli rolleri vardır. İnsanlar ve birçok hayvan bağırsaklarındaki sindirim için, metabolizmalarının gereksinim duyduğu B vitamini gibi bazı vitaminlerin sentezi için mikroorganizmalara ihtiyaç duyarlar. Mikroorganizmalar, organik asitler, aseton, birçok ilaç ve enzimler gibi kimyasal bileşiklerin sentezinde, sirke, yoğurt, ekmek ve peynir yapımı gibi gıda endüstrisinde de kullanılmaktadır. Buna ek olarak, antibiyotikler veya insan proteinlerinin üretimi gibi pek çok büyük ölçekli endüstriyel işlemler de, mikroorganizmalara dayalıdır (Özkan 2009).

Mikroorganizmalar, dünya üzerinde bitki ve hayvanların ortaya çıkışından milyonlarca yıl önce oluşmuşlardır. Bu nedenle mikroorganizmaların evrimsel çeşitliliği yüksek organizmalarinkinin çok ötesindedir. Bu büyük çeşitlilik, mikroorganizmalara bazı mükemmel özellikler kazandırmaktadır. Örneğin, mikroorganizmalar yüksek organizmalar için uygun olmayan yerlerde yaşayabilmekte ve çeşitli fizyolojik yetenekleri onları, dünyanın en iyi kimyacıları yapmaktadır (Madigan and Martinko 2010).

Yer altı kaynaklarına bakıldığında ise; doğal mikrobiyal biyokütle dağılımı ve mikrobiyal topluluk yapısı büyük ölçüde bilinmemektedir. Mikroorganizmalar, su ile sınırlı olan kırık yüzeylerde yoğunlaşmaktadırlar. Bu bölgelerdeki jeokimyasal farklılıklar da mikrobiyal dağılımı etkilemektedir. Heterojen yapılarda mikroorganizmalar daha fazla oranda yer almaktadır. Yer altı kaynaklarının porozite ve geçirgenliği de mikroorganizmaların hareketini etkilemektedir. Yer altı kaynaklarındaki mikrobiyal özellikler ile bu bölgelerin fiziksel ve kimyasal özellikleri arasındaki ilişki; tabakaların derinlikleri ve jeolojik açıdan ortam sıcaklığının belirli periyotlarla sabit kalmasına bağlıdır. Özellikle Güney Afrika madenleri derin biyosferlerin araştırılması için oldukça önemli kaynaklardır. Bu bölgelerde anaerobik mikrobiyal aktivite önemli ölçüde gerçekleşmektedir. Yer altındaki derin kaya çatlaklarında, kimyasal proseslerden enerjilerini elde eden kemolitotrof mikroorganizmalar da bulunmakta ve pirit-kalsit

minerallerinden sırasıyla sülfür ve karbon kaynakları kullanmaktadırlar. Ayrıca mikroorganizmalar çeşitli madenlerin ticari olarak değerinin artırılmasındaki biyoliç işlemlerinde de kullanılmaktadır. Asidik maden drenajlarından ve yer altındaki sızan sulardan izole edilen çok çeşitli mikroorganizmalar liç ortamlarında bulunmaktadır. (Rawlings and Silver 1995; Onstott 2003; Gabrielsen 2010).

Mikroorganizmalar, biyosferde jeolojik hareketlerde de önemli görevler üstlenmişlerdir. Biyolojik bozunmalar, biyokimyasal döngüler, elementlerin biyotransformasyonları, çözünme olayları, metal ve minerallerin transformasyonları ile toprak-sediment oluşumları gibi süreçler, mikroorganizmalar sayesinde gerçekleşmektedir. Prokaryotik, ökaryotik ve yüksek yapıli organizmalarla ilişki içerisinde olan tüm mikroorganizmalar her türlü jeolojik olaylar için aktif olarak katkı sağlamaktadır. Mikroorganizmalar yer altı ve maden kaynaklarındaki metal ve minerallerin kimyasal ve fiziksel özelliklerini değiştirerek, sürekli etkileşim halinde bulunurlar. Metal ve mineral bileşenler ise, mikrobiyal büyüme, gelişme ve aktivite kaynağını oluştururlar. Jeomikrobiyoloji, jeolojik proseslerde mikroorganizmaların rolü olarak tanımlanabilir. Metal-mineral-mikroorganizma ilişkisinin, temel mikrobiyolojik biyomineralizasyon süreçleri ve jeomikrobiyoloji çerçevesinde önemi oldukça büyüktür. Biyomineralizasyon, jeomikrobiyoloji ile örtüşen disiplinler arası çalışma alanıdır. Mikroorganizmaların etki ettikleri en önemli biyomineraller; kalsiyum karbonatlı bileşikler, silikatlar ve demir oksitler ya da sülfidler olarak bilinmektedir. Yer altı kaynaklarında, toprak ve sedimentlerde ve madenlerdeki mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen metal ve minerallerin, biyokimyasal dönüşümleri biyosferdeki süreçlerin önemli bir parçasını oluşturmaktadır. (Gadd 2010).

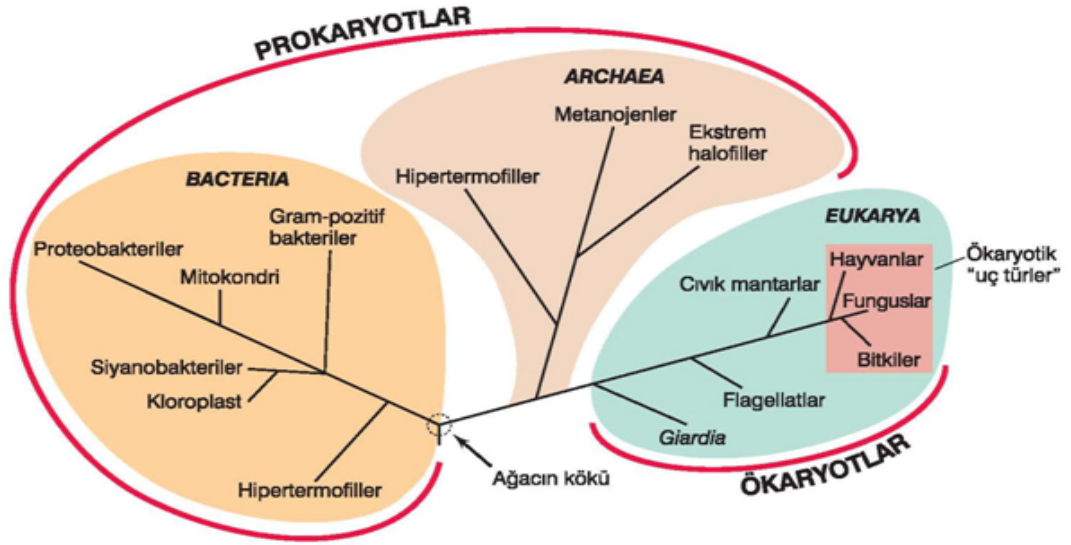
Yapılan araştırmalar, dünya üzerindeki toplam mikrobiyal hücrelerin ve özellikle prokaryotların (bakterilerin) tahmini sayısının 5×10^{30} hücre seviyelerinde olduğunu göstermektedir. Oldukça çok sayısında bulunan bu küçük hücrelerdeki toplam karbon miktarı dünya üzerindeki tüm bitkilerinkine eşittir. Ayrıca, prokaryotik hücrelerdeki toplam azot ve fosfor içeriği, tüm bitki biyokütlesindekinin 10 katından fazladır. Böylece, prokaryotik hücreler küçük olmalarına karşın dünya üzerindeki biyokütlenin

büyük bölümünü oluştururlar ve yaşam için gerekli temel besinlerin anahtar depolarıdır. Benzer çarpıcı bir durum da prokaryotik hücrelerin çoğunun dünyanın yüzeyinde değil, bunun yerine okyanus ve karasal yüzeylerin altında bulduklarının anlaşılmasıdır. Bu habitatlar nispeten keşfedilmemiş olduklarından, mikrobiyologların dünyada baskın olan yaşam formları ile ilgili keşfedecekleri ve öğrenecekleri daha çok şeyin bulunduğunu göstermektedir (Madigan and Martinko 2010).

2.6. İzole Edilen Bakterilerin Tanınması ve Karakterizasyonu

Sistemik; organizmaların, bilimsel bir çalışma çerçevesinde tanılanarak ve karakterize edilerek, düzenli bir şekilde sınıflandırılması veya organizmaların çeşitliliği ve ilişkilerinin incelenmesi olarak tanımlanır. Taksonomi, sistemik terimi ile sinonim olarak kullanılır. Karakterizasyon da, genellikle tanılama ile karıştırılmaktadır. Mikroorganizmaların sınıflandırılarak, taksonomideki yerlerinin belirlenmesine tanı; tanılanmış mikroorganizmaların kendine has özelliklerinin belirlenmesine karakterizasyon, birbirleri ile akrabalık ve benzerlik derecelerinin ortaya konulmasına ise, filogeni denilmektedir (Trüper and Schleifer 2006).

Günümüzde tespit edilen canlılar, rRNA analiz verilerine göre üç domaine ayrılmaktadır (Şekil 2.3). Bunlar; gerçek bakteriler (öbakteriler, Bacteria), antik bakteriler (arkeanlar, Archea) ve Ökaryotlar (Eukaryotes) olarak isimlendirilmektedir. Mikroorganizmaların tanılanmasında kullanılan yöntemler, konvensiyonel ve moleküler yöntemler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Bu yöntemlerden nükleik asitlere (DNA ve RNA) dayalı yöntemler moleküler, diğerleri ise konvensiyonel yöntemleri oluşturmaktadır. Bu iki yöntemin birbirini desteklediği veriler ideal sonuçlar olarak yorumlanmaktadır (Adıgüzel vd. 2009; Madigan ve Martinko 2010).



Şekil 2.3. Karşılaştırmalı rRNA gen dizilemesi ile tanımlanmış filogenetik yaşam ağacı (Madigan ve Martinko 2010).

2.7. Bakteri Sistematığında Kullanılan Konvansiyonel Yöntemler

Mikroorganizmaların tanısı, modern moleküler biyoloji teknikleri gelişinceye kadar, klasik metotlara göre yapılmıştır. Mikroorganizmaların daha çok fenotipik karakterleri hakkında bilgi veren, morfolojik (hücre şekli, büyüklüğü, hareketliliği, flagel oluşturup oluşturmadığı, spor oluşturup oluşturmadığı, hücresel inklüzyonlar, renk, koloni morfolojisi, Gram boyanma özelliği), biyokimyasal, fizyolojik ve patolojik özelliklerinin belirlenmesi konvansiyonel yöntemler olarak adlandırılır. Bitki ve hayvanlarla karşılaştırıldığında, mikroorganizmaların morfolojileri sağlam bir sınıflandırmaya temel oluşturmak ve güvenilir tanılama için oldukça yetersizdir. Bu yöntemlerin; daima alternatif olarak tanı sistemlerine ihtiyaç duyması, fazla işgücüne neden olup uzun zaman alması, daha çok cins düzeyinde bir tanı yapıp, az sayıda fenotipik özellik tespit edilmesi nedeniyle, mikroorganizmalar arasındaki farklılıkları ortaya koymada özellikle tür ve tür altı taksonomik grupları belirlemede yetersiz kalması ve alınan sonuçların farklı yorumlara açık olması gibi birçok dezavantajı vardır (Miller and Joaquim 1993; Koike *et al.* 1999; Hasenekoğlu ve Yeşilyurt 2002; Adıgüzel 2006).

2.7.1. Koloni morfolojisi

Eğer bir bakteri, uygun bir katı besi yerinde ve uygun koşullarda (ısı, süre, rutubet, oksijen, vs.) geliştirilirse, kısa bir zaman içinde gözle görülebilen yığın, küme (koloni) meydana getirir. Bakteri türleri, kendilerine özel, renk, koku, büyüklük ve yapıda koloniler oluştururlar. Bu karakterler, hücrenin genetik kontrolü altındadır. Koloninin büyüklüğü ve şekli, uygun koşullar (besi yerinin bileşimi, oksijen, ısı, vs.) altında türlere özel bir karakter taşır. Bu özellikler organizmaların karakterizasyonunda önemli rol oynamaktadır (Barış 2008; Arda 2012).

2.7.2. Hücre morfolojisi

Bakteri hücresinin şekli, boyutu ve çapı, bakteriyoloji biliminde oldukça önemlidir. Bakteriler oldukça küçük organizmalar olduklarından, bu özellikleri ancak mikroskop altında incelenebilir. Bakteriler, hücre şekilleri bakımından yuvarlak, çomak, sarmal biçimli ve pleomorfik (değişik biçimli) olarak ayrılmaktadırlar ve bu özellikler tanılamada, önemli kriterler arasındadır.

Bakteri hücre boyu ve çapı da oldukça önemli karakterizasyon parametreleridir. Bakterilerin büyüklükleri, morfolojilerine ve ait oldukları cinslere göre değişmekte ve genellikle, mikrometre (μm) ile belirlenmektedir (Arda 2000).

2.7.3. Spor boyama

Özellikle *Bacillus* ve *Clostridium* cinsi bakteriler elverişsiz ortam şartlarında, uzun süre canlı kalabilmek için kurumaya, radyasyona, ısıya, asitlere ve kimyasal dezenfektanlar gibi faktörlere karşı dirençli yapılar üretirler. Bu yapı endospor olarak adlandırılır ve bakteriyal hücre içerisinde gelişir. Endosporlar, eliptik küre biçiminde, bakteri hücresinden daha küçük veya daha büyük olabilirler. Hücre içinde, endospor durumu karakteristiktir ve merkezi, uçta ya da uca yakın bir şekilde lokalize olabilmektedir.

Endospor oluşturabilme, bakteri sistematiginde önemli bir özelliktir. (Harley and Prescott 2002).

2.7.4. Büyüme sıcaklıkları, pH aralıkları ve oksijen ihtiyaçları

Bakteri sistematiginde kullanılan en önemli fizyolojik özellikler, bakterilerin gereksinim gösterdikleri fiziksel olan parametrelerdir. Fiziksel gereksinimler, bakterilerin gelişebildikleri sıcaklık aralıkları, pH aralıkları ve gelişme sırasında oksijene olan ihtiyaçları olarak sistematikte kullanılan önemli kriterlerdir (Dülger 2003).

2.7.5. Gram reaksiyon testi

Bakteriler, fiziksel ve kimyasal olarak birbirlerinden ayrılırlar ve belirli bir boyama işlemi için farklı reaksiyonlar verebilirler. Bu durum diferansiyel boyamanın esasıdır.

Gram boyama yöntemi, ilk olarak 1853-1938 yılları arasında yaşayan, Danimarkalı doktor ve bilim adamı olan Christian Gram tarafından gerçekleştirilmiş ve bakteriyolojide oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Gram boyama bakterileri hücre duvarı özellikleri yönünden, Gram pozitif ve Gram negatif olarak iki gruba ayırmaktadır (Harley and Prescott 2002).

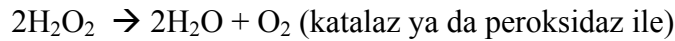
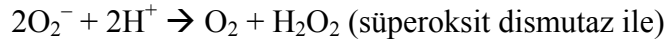
Bakterilerin Gram özelliklerinin araştırılmasında diğer bir yöntem ise, %3'lük KOH ile bakteri hücre duvarlarının muamele edilmesidir. Bu test sonuçlarının yorumlanması ile Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler tespit edilmektedir (Adıgüzel 2006; Barış 2008).

2.7.6. Katalaz, oksidaz, amilaz ve nitrat redüksiyon testleri

Bakteriler, çeşitli biyokimyasal aktivitelerini, (büyüme ve çoğalma) çevrelerinden elde ettikleri besinleri kullanarak gerçekleştirirler. Bakteri hücresinin içinde veya dışında

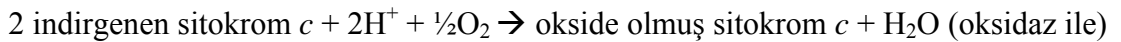
meydana gelen biyokimyasal dönüşümler, biyolojik katalizörler olan enzimler tarafından yönetilir. Bakteriler, bu enzimleri kullanarak karbohidratları, yağları, proteinleri ve çeşitli bileşikleri parçalamaktadırlar. Özellikle bakterilerin gerçekleştirdikleri, biyokimyasal aktiviteler sonucunda, yan ürün 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 süper oksitlerin uzaklaştırılmasında süperoksit dismutaz, hidrojen peroksitin uzaklaştırılmasında ise, katalaz ya da peroksidaz enzimlerini kullanmaktadır. Katalaz aktivitesi reaksiyonu;



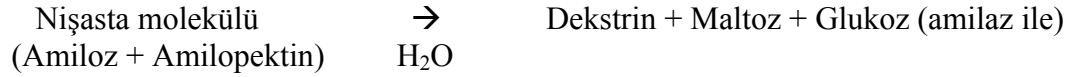
Fakat zorunlu anaerob bakteriler, bu enzimlerden yoksundurlar ve oksijen ürünlerinin yok edilmesini tolere edemezler. Katalaz testi bakterilerin tanı ve karakterizasyonunda önemli bir yere sahiptir.

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).

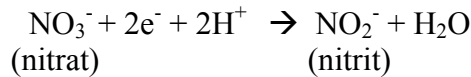
Amilaz testi; Birçok bakteri, organik molekülleri daha küçük moleküllere dönüştüren enzimlere sahiptir. Nişasta molekülü, dallanmamış glukoz polimeri olan amiloz ile daha büyük dallanmış polimer olan amilopektin bileşenlerini içerir. Hem amilopektin hem de amiloz, bakterilerin α -amilaz enzimleri ile dekstrin, maltoz ve glukozu hidrolize edilirler. Amilaz aktivitesi reaksiyonu;



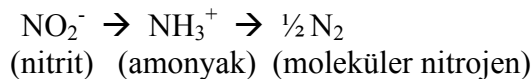
Amilaz testi sayesinde, mikroorganizmaların bu enzime sahip olup olmadıklarının araştırılması, tanılama açısından önemli olup, bu test özellikle *Bacillus* cinsi bakterilerde daha da önemlidir (Harley and Prescott 2002; Barış 2008).

Nitrat redüksiyon testi; Bu test, nitratları redükte edebilen bakterileri belirlemede kullanılır. Bazı bakteriler, nitratları (NO_3^-) redükte ederek nitritlere (NO_2^-) ve hatta daha ileri basamak olan amonyağa (NH_3) ve gaz nitrojene (N_2) kadar ayrıştırabilmektedir (denitrifikasyon). Olay, genellikle anaerobik koşullarda ve redüktaz enzimlerinin katalitik etkisiyle sürdürülür. Bakterilerin bu özellikleri onların tanılanmasında kullanılır (Harley and Prescott 2002).

Nitratın nitrite redüksiyonu;



Nitritin moleküler nitrojene ayrışması;



2.8. Bakteri Sistematikinde Kullanılan Moleküler Yöntemler

Moleküler biyolojideki hızlı gelişmeler, moleküllerin araştırılmasına imkan sağlayan yeni yöntemlerin gelişmesine yardımcı olmuştur. Tanılamada, mikroorganizmaların moleküler içeriklerini esas alan tekniklere, moleküler yöntemler denilmektedir. Moleküler yöntemler, karbohidratları, lipitleri, proteinleri ve nükleik asit (DNA-RNA) materyallerini kabul etmektedir. Bu materyallerin kullanılması ile mikroorganizmaların tanıları yapılmaktadır. Mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesinde klasik olan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal yöntemlerin yanısıra, kullanılan moleküler teknikler arasında PCR tekniği ile gen amplifikasyonu ve genomik parmak izi analizleri (Randomly Amplified Polimorphic Detection = RAPD, Restriction Fragment Length Polymorphism = RFLP, Repetitive Extragenic Palindromic = REP-PCR, Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus = ERIC-PCR, Ribozomal DNA = rDNA-PCR, BOX-PCR, Spesifik PCR vb.), 16S rRNA analizleri, yağ asit profilleri (Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi=MIDI), serolojik teknikler (Aglütinasyon, Immunofluorescence, Dot Immunobinding Assay, Immuno Blot, Radioimmunoassay ve Enzim-Linked Immunosorbent Assay = ELISA), kantitatif DNA hibridizasyonu, gibi yöntemler bulunmaktadır (Eerola 1988; Mosivand *et al.* 2009). Bu teknolojilerin kullanılması ile mikroorganizmalar, tür ve tür altı düzeyde daha güvenilir biçimde tanılabilmektedir. (Gümüsel 2002; Chelius and Moore 2004; Adıgüzel 2006).

Moleküler yöntemlerin her biri, kısa zamanda çok sayıda örnek için tür ve tür altı seviyede tanılamaya olanak sağlamaktadır. Moleküler teknikler, güvenilir olması, kolay uygulanabilirliği, hızlı sonuç vermesi ve çok sayıda mikroorganizmanın tanısına imkân sağlamasından dolayı hemen hemen tüm araştırma ve tanı laboratuvarlarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Durmaz 2001). Bu nedenle moleküler teknikler; mikrobiyal ekolojide, bakterilerin sınıflandırılması ve tanılanmasında büyük öneme sahiptir (Durmaz 2012). Bu amaçla kullanılan bazı moleküler teknikler şunlardır:

2.8.1. PCR tekniği ile gen amplifikasyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR-PCR), DNA ve RNA dizilerinin, uygun primer dizileri kullanarak, termal döngü cihazı ile çoğaltımı esasına dayanan bir yöntemdir. Bu teknikte, kullanılan hedef genetik materyaller, çok az sayıda ve hatta alakasız birçok DNA'lar arasında 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 hüresiz klonlama (cell-free molecular cloning) olarak da adlandırılmaktadır (Saiki vd. 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 vd. 1988; Mueller *et al.* 2001; Rittie and Perbal 2008; Nybo 2009).

PCR tekniği üç aşamadan oluşmaktadır;

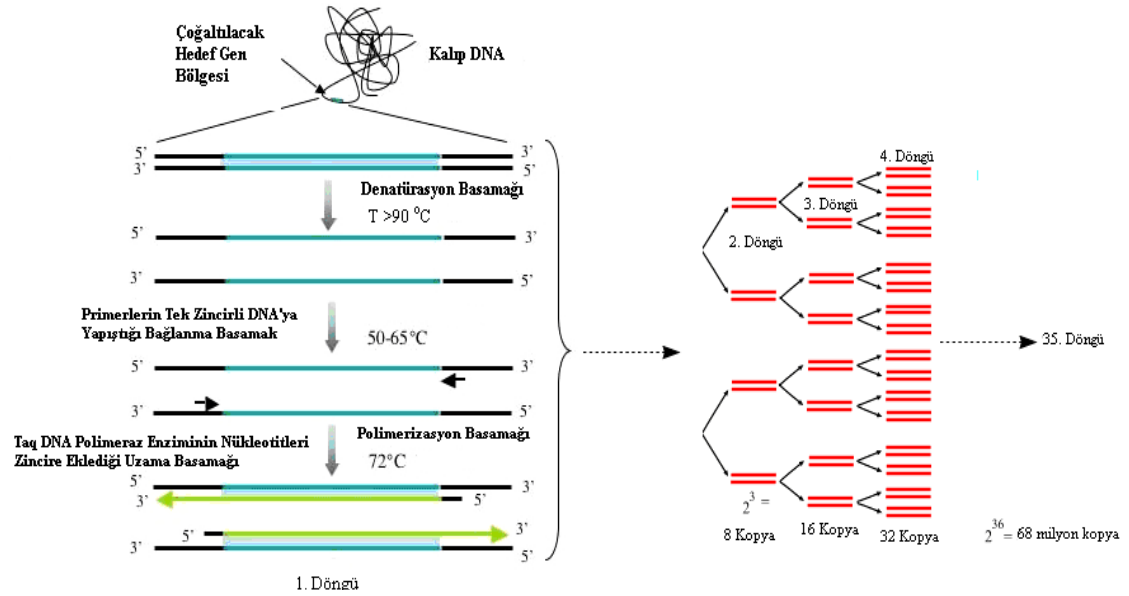
1. DNA çift sarmalının yüksek ısıyla ayrılması (denatürasyon)

2. Homolog DNA ve RNA dizilerine sentetik oligonükleotitlerin bağlanması (primerlerin bağlanması)
3. DNA'nın enzimatik aktivite ile sentezlenmesi (DNA zincirinin uzaması).

Döngü sayısı n ise, teorik olarak çoğaltılan molekül sayısı 2^n 'dir. Böylece her DNA molekülü, 20 döngüde yaklaşık olarak bir milyon DNA molekülü oluşturmaktadır (Mueller *et al.* 2001; Çetinkuş 2007; Nybo 2009).

Hedef DNA dizisinin *in vitro* olarak enzimatik amplifikasyonunu sağlayan PCR yöntemi, birçok araştırma laboratuvarında kullanılan oldukça güvenilir ve büyük öneme sahip moleküler biyolojik bir tekniktir (Görmez 2011). Otomatik termal döngü cihazında gerçekleşen, her reaksiyonda meydana gelen DNA zincirinin çoğaltılması Şekil 2.3'de gösterilmektedir.

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu



Şekil 2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Görmez 2011).

2.8.2. Genomik parmak izi analizleri

Farklı bakteriler arasındaki genetiksel ilişkinin, ortaya konulmasında, yaygın olarak genetik profillerinin belirlenmesi ile genomik parmak izi analiz yöntemleri kullanılmaktadır (Barış 2008). PCR temelli parmak izi analiz yöntemlerine RAPD-PCR, BOX-PCR, ERIC-PCR, REP-PCR, (GTG)₅-PCR gibi örnekler vermek mümkündür. Bu yöntemlerin her birinin, sınırlı bir gruptan, bütün canlıların akrabalıklarını belirlemeye kadar geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır (Khoodoo and Jaufeerally-Fakim 2004; Adıgüzel 2006; 2009).

Bu tekniklerden AP-PCR tek bir primer kullanılarak gerçekleştirilen rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA-polimeraz zincir reaksiyonu (RAPD-PCR) tekniğidir (Adıgüzel 2006).

Yapılan araştırmalar sonucunda, organizmaların büyük bölümünün genomlarında birçok tekrarlı repetitive DNA dizisinin bulunduğu tespit edilmiştir. Hücre bölünmesinde, fonksiyonu olduğu düşünülen bu diziler, zirai, çevresel, endüstriyel, kliniksel bakterilerin tür, alt tür, biovar ve hatta patovar seviyesinde tanısı, sınıflandırılması ve karakterizasyonunda kullanılmakta olup, rep-PCR genomik parmak izi analiz yöntemi olarak adlandırılmaktadır. Bu diziler, tekrarlı ekstrasjenik polindromik (REP), enterobakteriyel tekrarlı intergenik korunmuş diziler (ERIC) ve ilk kez gram pozitif bir bakteri olan, *Streptococcus pneumoniae*'da tanılanan box A, box B, box C alt ünitelerinden oluşan BOX elementleri ve 35-40 bp uzunluğuna sahip GTG₅ sekanslarından oluşmakta olup, bu yöntemlerin tümüne birden rep-PCR adı verilmektedir (Rademaker *et al.* 1997; Bulut 2003; Adıgüzel 2006; Lacıar 2006).

rep-PCR yöntemi ekosistemdeki çeşitliliği araştırmada, izolatlar arasındaki filogenetik ilişkiyi ortaya koymada ve genetiksel olarak birbiriyle yakın olan mikroorganizmaları ayırımında oldukça etkin ve basit bir yöntemdir (Rademaker *et al.* 1998; Adıgüzel 2006; Brujin 2011).

2.8.3. 16S rRNA veya 16S rDNA analizleri

Mikroorganizmalar arasındaki filogenetik akrabalık derecesini belirlemek amacıyla 16S evrensel primerleri kullanılarak, 16S rRNA/rDNA analizleri yapılmaktadır. Taksonomik bir materyal olarak 16S rRNA baz dizisinin kullanılması, kültüre edilmemiş mikroorganizmaların sınıflandırılmasında ve tüm öbakterilerle ilişkili patojenlerin tespitinde, bilim dünyasına büyük avantajlar sağlamıştır. (Adıgüzel 2006;2009; Siala *et al.* 2009).

Bakteri genomunda 16S rRNA geninde, değişen (9 adet) ve değişmeyen (8 adet) bölgeler bulunmakta olup, tür bazındaki teşhislerde değişken bölgeler kullanılmaktadır. (Gray *et al.* 1984). Bu gen yaklaşık olarak 1500 nükleotidden oluşmakta ve her mikroorganizma için belirli bir gen dizisi bulunmaktadır. Bu dizi içindeki 10-15 nükleotidde gözlemlenen farklılık, tür ayırımının yapılabilmesine olanak sağlamaktadır. Prokaryotlarda rRNA (rDNA) operonu (*rrn*); 16S, 23S, 5S rRNA'lar ile sık tekrarlanan çoklu operon bölgelerini içermektedir (Adıgüzel 2006; Ireng and Gala 2012).

Ribozomal RNA ve bununla ilgili olan *rrn* genlerinin, güçlü evrimsel ve biyomarker olarak yaygın bir şekilde kullanılma nedenleri şunlardır:

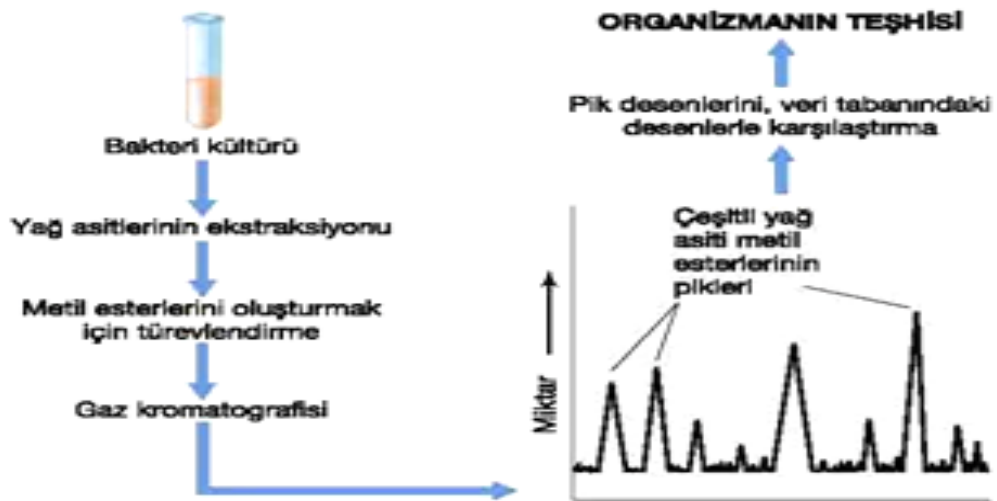
- ❖ Ribozomal RNA'ların, tüm organizmalar için yapısal ve fonksiyonel olarak korunmuş ve protein sentezi için gerekli olması,
- ❖ Ribozomal RNA'ların kolay bir şekilde tespit ve izole edilmeleri,
- ❖ Primer ve sekonder yapılarında, yüksek oranda korunmuş bölgeleri içermeleri,
- ❖ Birçok prokaryotik genlerle yatay gen transferi göstermemeleri ve bundan dolayı rRNA'lar arasındaki ilişkiyi evrimsel olarak yansıtma potansiyelidir.

Mikrobiyal ekoloji çalışmaları için, bu özellikler rRNA'ları sadece yaygın kullanılan biyomarker olarak değil, aynı zamanda oldukça büyük ve keşfedilmemiş karasal ortamlardaki kompleks çeşitliliğin araştırılmasında araç olarak göstermektedir (Head *et al.* 1998). Özellikle 16S rRNA bölgesi üzerinde daha yoğun çalışmalar yapılmakta ve

bakteriyel tanı, tarama uygulamaları ve bir tür içerisindeki izolatların ayırımına yönelik çalışmalarda, büyük ilerlemeler kaydedilmiştir (Barış 2008; Madigan and Martinko 2010).

2.8.4. Yağ asit profilleri (Mikrobiyal Tanılama Sistemi=MIS)

Bakterilerin tanımlanmasında, kısa zincirli yağ asitleri (uçucu yağ asitleri), uzun zamandır yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Mikroorganizmalarda genellikle tek ve çift sayılı karbon (C_{12} - C_{20}) içeren yağ asitleri bulunmaktadır (Seget- Piotrowska and Mrozik 2003). Yağ asitleri ($CH_3-(CH_2)_n-COOH$); mikroorganizmaların hücrelerinde, sitoplazma ve diğer hücrel organellerin çift tabakalı membranlarında; fosfolipid, glikolipid veya lipopolisakkarit formunda bulunan hidrokarbon yapısındaki makro moleküllerdir. Bu metod bakteriyel lipidlerin hidrolizasyonu ve ekstraksiyonuna dayanır. Karboksilik grupların metilasyonu, yağ asitlerinin metil esterlerini (FAME) üretir ve bunlar gaz kromatografisi (GC) ile analiz edilir (Şekil 2.4). Bu teknik yağ asiti metil esterini, FAME şeklinde kısaltılması ile adlandırılır ve patojenlerin veya diğer zararlı bakterilerin rutin olarak teşhisinin yapıldığı klinik tanı, halk sağlığı, gıda ve suları inceleyen laboratuarlarda geniş bir kullanım alanına sahiptir (Sasser 2001; Buyer 2006; Çetinkuş 2007; Madigan ve Martinko 2010).



Şekil 2.5. Bakteri tanılmasında kullanılan yağ asit metil ester analizi (FAME) (Madigan and Martinko 2010).

2.8.5. DNA hibridizasyonu

Nükleik asit hibridizasyonu da bakteriler arasındaki genetik ilişki (yakınlık veya uzaklık) saptanabilir. İlk kez tanısı yapılacak olan bakteri türlerinin tespitinde, en çok faydalanılan parametre, genomlar arasındaki DNA benzerliğidir. Bir bakterinin DNA süspansiyonu yavaş yavaş ısıtılırsa, bazlar arasındaki hidrojen bağları çözülür ve iki polinükleotid iplikçığı birbirlerinden ayrılır (DNA denatürasyonu). Eğer solüsyon yavaş yavaş soğutulursa, bağlar karşılıklı olarak tekrar kurulur ve DNA orijinal çift iplikçikli formuna kavuşur (renatürasyon). Tüm bu aşamalarda, işaretli probalar (spesifik DNA baz çiftlerine bağlanan ve tipik olarak 6-18 baz uzunluğunda küçük bir DNA molekülü) kullanılır ve en son aşamada işaretli molekülün bağlandığı hibridizasyon bölgeleri saptanır. Bu durumdan yararlanılarak, DNA hibridizasyon testi yapılmaktadır. Birbirlerine baz sıraları ne kadar çok yakın ise, DNA+DNA hibridizasyon oranı da o derecede yüksektir. Böyle bir durum, bu iki bakterinin aynı tür veya aynı cinsin iki türü olduğunu kanıtlar. Yapılan birçok çalışma sonucunda, tam olarak tanımlanmış birçok türün strainleri arasında optimum hibridizasyon şartları uygulandığı zaman %70 den fazla bir benzerliğin oluştuğu gözlemlenmiştir. (Özerol 1997; Arda 2000; Dülger 2003; Adıgüzel 2006; Kadayıfçılar 2007).

2.8.6. Serolojik teknikler

Serolojik metotlar; antijen-antikor ilişkisine dayanan testleri içermektedir. Antijen; sıcakkanlı canlıların savunma (bağışıklık) sistemini harekete geçiren, yabancı moleküller (protein, nükleik asitler, polisakkarit, lipid vb.) ya da bu molekülleri taşıyan madde, organ veya mikroorganizmalardır. Antikor; bağışıklık sistemi tarafından, antijenlere tepki olarak üretilmiş ve antijenler ile özgül olarak birleşebilen proteinlerdir (immunoglobulin proteinler) (Şahin 2000; Adıgüzel 2001). Mikroorganizmaların tanısında kullanılan serolojik testler:

Aglütinasyon testi; Antikor içeren antiserum ile antijen, bir süspansiyon içinde karıştırılınca, kendi antijenlerine bağlanan antikorların, büyük kümeler oluşturarak gözle görülür bir biçimde çökmesi esasına dayalı bir testtir (Şahin 2000).

Immunofluorescence (IFA) testi; Bu teknikte ilk önce antijene spesifik antikor, fluorochrome bir boya ile birleştirilmekte ve daha sonra antijen-antikor reaksiyonu, UV ışık mikroskopunda incelenmektedir (Şahin 2000).

Dot Immunobinding Assay (DIA) testi; Membran (nitroselüloz/naylon) üzerine tespit edilen antijenlerin, enzim konjuge edilmiş antikorlar ile muamele edilmesi ile oluşan antijen-antikor kompleksinin incelenmesi esasına dayanmaktadır (Şahin 2000).

Immunoblot testi (Western Blot); Antijen moleküllerinin yapısal protein olması durumunda kullanılan bir tekniktir. Önce, canlı hücreler parçalanarak toplam protein izolasyonu yapılmaktadır. Bu proteinlerin, molekül ağırlıklarına göre poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) birbirlerinden ayrılması sağlandıktan sonra, nitroselüloz membrana aktarılması gerçekleşmektedir. Membran üzerindeki proteinler, işaretlenmiş antikorlarla muamele edilerek sonuçlar yorumlanmaktadır (Şahin 2000).

Radioimmunoassay (RIA) testi; Sert yüzeylere kodlanmış antijenlerin, radyoizotopla işaretlenmiş olan antikorlar ile bağlandıktan sonra GAMA-spektrofotometrede saptanması ilkesine dayanmaktadır (Şahin 2000).

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) tekniği; ELISA plateler üzerine kodlanan antijenlerin, enzim kodlanmış antikorlarla tespit edilerek, substrat ile reaksiyona sokulması sonucu, elde edilen pozitif reaksiyonların, renklenmesinin ardından, okunmasına olanak sağlayan bilgisayar kontrollü bir sistemdir. ELISA; hızlı sonuç vermesi, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olması, çok sayıda örnekle çalışılmaya imkan sağlaması ve ucuz olması gibi nedenlerle, diğer testlerden daha üstün ve çalışmalarda daha çok kullanılan tekniktir (Lelliott and Stead 1987; Güllüce vd 1996; Adıgüzel 2001).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Manyezit Madeni Örneklerinin Alınması

Bu çalışmada, Erzurum-Aşkale sınırları içerisindeki, üç farklı manyezit maden ocağından örnekler (madenin kendisi, madenin çıkarıldığı yerdeki toprak örneği ve madenin yıkamasının yapıldığı su örneği) alınmış ve steril tüpler içerisinde laboratuara getirilmiştir. Bakteri izolasyon çalışması yapıncaya kadar, buzdolabında (+4°C) muhafaza edilmiştir.

3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar

Çalışma esnasında aşağıdaki alet ve cihazlar kullanılmıştır:

İnkübatör (Binder BD53, GERMANY)

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

Mikroskop (Boeco BM 180, GERMANY)

Steril Kabin (Esco AC2-4E1, SINGAPORE)

Çalkalayıcı (Zhicheng ZHWY-200B, CHINA)

Magnetik Karıştırıcı (Daihan Scientific MSH 20A, KOREA)

pH Metre (InoLab pH730 wtw Series, GERMANY)

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

Hassas Terazi (Mettler Toledo AL204, CHINA)

Buzdolabı (Beko BK9470, TÜRKİYE)

Su Banyosu (Memmert WNB14, GERMANY)

Mikrodalga Fırın (Beko MD1505, TÜRKİYE)

Saf Su Cihazı (GFL 2004, GERMANY)

Vorteks (Heidolph Reax Top, GERMANY)

Dikey Tüp Karıştırıcı (GFL 3025, GERMANY)

Santrifüj (Hettich Mikro 22R, GERMANY)

Mikrobiyal Tanılama Sistemi (MIDI, Inc., Newark, GERMANY)
PCR (Corbett Research CG1-96, AUSTRALIA)
Elektroforez Tankı (Yatay) (OWL B2, U.S.A.)
Elektroforez Akım Sağlayıcı (OWL OSP300-2Q, U.S.A.)
Jel Görüntüleme Sistemi (DNR BioImaging Systems MiniBis Pro, ISRAEL)
Buz Makinesi (Scotsman AC45, ITALY)

3.1.2. Kullanılan çözeltiler ve besiyerlerinin hazırlanışı

Araştırma süresince, kullanılan çözeltilerin ve besiyerlerinin hazırlanış şekilleri aşağıdaki gibidir:

- 1. %0,85'lik NaCl çözeltisi:** 8,5 mg NaCl 1 L saf suda çözülerek otoklavda steril edildi.
- 2. Nutrient broth (NB):** 13 g nutrient broth içeriği (Oxoid) 1 L saf su içerisine eklendi. Besiyeri otoklavda steril edildi.
- 3. Trypticase soy broth (TSB):** 30 g tripticase soy agar karışımı (Oxoid) 1 L saf su içerisine ilave edildi. Besiyeri otoklavda steril edildi.
- 4. 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.
- 5. 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.
- 6. Yeast Extract Calcium Carbonate agar (YDC- agar):** 5 g maya ekstrakt, 10 g glikoz, 6 g CaCO₃ ve 10 g agar karışımı 500 ml saf su içerisinde çözülerek, besiyeri

otoklavda steril edildi. 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere döküldü ve katılaşmaya bırakıldı.

7. Magnesium Carbonate agar: 5 g maya ekstrakt, 10 g glikoz, 6 g MgCO₃ ve 10 g agar karışımı 500 ml saf su içerisinde çözülerek, besiyeri otoklavda steril edildi. 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere döküldü ve katılaşmaya bırakıldı. Bu besiyeri YDC-agardan modifiye edilmiştir.

8. Nitrat besiyeri: 1 L distile suya 10 g pepton (Difco), 5 g NaCl, 2 g KNO₃ ve 3 g agar katıldı ve agar çözülünceye kadar karışım kaynatıldı. pH'sı NaOH ile 7'ye ayarlanarak 3 er ml'lik tüplere aktarılıp ağızları pamuk tıkaçlarla kapatıldı. Besiyeri içeren tüpler otoklavda 121°C de 15 dakika steril edildi.

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

10. Nutrient broth + agar (yarı katı nutrient agar): 13 g nutrient broth'a (Oxoid) 6 g agar (Difco) aktılarak 1 L saf su içerisinde eklendi. Besiyeri otoklavda steril edildi. 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril deney tüplerine alınarak katılaşmaya bırakıldı (Arda 2000).

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

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

13. 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).

14. %3'lük KOH çözeltisi: 3 g KOH 100 ml steril saf su içerisinde çözülerek hazırlandı.

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

16. 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).

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

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

19. %5'lik H₂O₂ çözeltisi: 17 ml %30'luk H₂O₂'in hacmi steril saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

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

- 21. 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 (Adıgüzel 2006).
- 22. 5M NaCl çözeltisi:** 29,22 g NaCl'ün 100 ml saf su içerisinde çözülmesiyle hazırlanarak otoklavda steril edildi.
- 23. 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.
- 24. %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.
- 25. Dimetil sülfoksit (DMSO):** %100'lük DMSO (Sigma) 2ml'lik eppendorf tüplere aktarılarak, kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.
- 26. %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.
- 27. Fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) çözeltisi:** 25 ml fenol, 24 ml kloroform ve 1 ml izoamilalkol karıştırılarak hazırlandı. -20°C'de muhafaza edildi.
- 28. Kloroform: izoamilalkol (24:1) çözeltisi:** 24 ml kloroform ve 1 ml izoamilalkol karıştırılarak hazırlandı. -20°C'de muhafaza edildi.
- 29. %70'lik Etil alkol:** 70 ml saf etil alkolün hacmi steril distile su ile 100 ml ye tamamlandı. -20°C'de muhafaza edildi.

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

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

32. 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.

33. 5XTAE Tamponu (pH: 8): 24,2 g Tris, 5,71 ml glacial asetik asit, 10ml 0,5 M EDTA, 500 ml steril distile su içerisinde homojenize edildikten sonra karışımın pH’sı 8 e ayarlandı ve toplam hacim steril distile su ile 1 L’ye tamamlandı.

34. 0,5XTBE Tamponu: 100 ml 5xTBE’nin hacmi steril distile su ile 1 L’ye tamamlanarak hazırlandı.

35. 0,5XTAE Tamponu: 100 ml 5xTAE’nin hacmi steril distile su ile 1 L’ye tamamlanarak hazırlandı.

36. 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.

37. 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.

38. Gitschier tamponu: 200 ml için; 1 M (NH₄)₂SO₄’den 16,6 ml, 1 M Tris-HCl (pH=8,8)’den 67 ml, 1 M MgCl’den 6,7 ml, 0,5 M EDTA (pH=8,8)’nın 1:100’lük dilüsyonundan 1,3 ml ve 14,4 ml β-mercapto-ethanol’un ticari solüsyonundan 2,08 ml alınarak hazırlanan solüsyonun hacmi yaklaşık 106 ml steril distile su ile 200’ml ye

tamamlanarak 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarılıp, kullanılmaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. (Rademaker and Bruijn 1997).

39. Hücre parçalama (saponification) çözeltisi: 150 ml metil alkol (HPLC Grade) ve 150 ml steril saf su 1 L'lik renkli çözelti şişesine ilave edildi ve katı formdaki 45 g sodyum hidroksit (ACS Grade) eklendi. İyice çözülünceye kadar karıştırılarak hazırlandı (MIS 2005).

40. Metilleştirme (methylation) çözeltisi: 325 ml hidroklorik asit (6 N) ve 275 ml metil alkol (HPLC Grade) 1 L'lik renkli çözelti şişesi içerisinde iyice çözülünceye kadar karıştırılarak hazırlandı (MIS 2005).

41. Saflaştırma çözeltisi: 200 ml metil-tert-butil-eter (HPLC Grade) 200 ml hexan (HPLC Grade) üzerine ilave edilerek 1 L'lik renkli çözelti şişesine katıldı. İyice çözülünceye kadar karıştırılarak hazırlandı (MIS 2005).

42. Bazık yıkama (Base Wash) çözeltisi: Katı formdaki sodyum hidroksitten 10,8 g alınarak (ACS Grade), 900 ml steril saf su içerisine eklendi. İyice çözülünceye kadar karıştırıldıktan sonra 1 L'lik renkli çözelti şişesine aktarıldı (MIS 2005).

43. Amfisilin Solüsyonunun Hazırlanması: 20 mg ampisilin (Fluka-10044) tartılarak 1 ml su içerisinde çözüldü. Hazırlanan çözelti 0,22 µm çapındaki bakteriyolojik filtreden geçirilerek steril edildi. Kullanılmaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

44. CaCl₂ Solüsyonunun Hazırlanması: 100 mM olacak şekilde 1,11 g CaCl₂ tartılarak (Sigma-C5670) 100ml saf su içinde çözüldü. Ağzı pamuk tıkaçla kapatılarak otoklavda steril edildikten sonra +4°C de muhafaza edildi.

45. X-gal Çözeltisi: 23,8 mg Xgal, 1 ml saf su içerisinde çözülerek hazırlandı. Çözelti 0,22 µm çapındaki bakteriyolojik filtreden geçirilerek steril edildi. Kullanılmaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

46. IPTG Çözeltisi: 40 mg IPTG tartılarak, 1 ml %100'lük Dimetilformamid 'de (Sigma-D4551) çözüldü. Hazırlanan çözelti ışık almayacak şekilde -20°C'de muhafaza edildi.

47. Kullanılan Kitler: pGEM®-T Easy Vector Sistemi (Promega-A1360), plazmit DNA saflaştırma kiti (Promega-A1330).

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. Manyezit madeni mikroflorasından bakterilerin izolasyonu ve muhafazası

Uygun ortamlardan 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 iki paralel olmak üzere, flora bakterilerinin izolasyonu için, TSA ve NA besiyerlerine yayma ekim yapılarak, 32°C'de bir hafta süreyle etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi içerisindeki 1, 3, 5 ve 7. günlerde, petri plaklarında gözlemlenen farklı kolonilerin, saf kültürleri elde edilmiştir. Her bakterinin 24-48 saatlik saf kültüründen, bir öze dolusu alınarak içerisinde %18 gliserol ve nutrient broth bulunan ependorf tüplere 500'er µl aktarılmış ve karışım vortekslenmiştir. Elde edilen bu stok kültürler kodlanmış (TB1-TB73) ve daha sonraki karakterizasyon işlemlerinde kullanılıncaya kadar -86°C'de saklanmıştır.

3.2.2. İzolatların CaCO₃ üzerine çözücü özelliklerinin araştırılması

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

3.2.3. İzolatların MgCO₃ üzerine çözücü özelliklerinin araştırılması

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

3.2.4. Morfolojik Testler

3.2.4.a. Hücre morfolojisi

Saflaştırılan bakteriler, çizgi ekimle NA besiyerine ekilmiş, 30°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 24-48 saatlik bakteri kültürlerinden öze ile alınan hücreler, lam üzerine ilave edilen bir damla sdH₂O içerisine aktararak lam yüzeyine homojen bir şekilde iyice yayılmış, havada kuruması için bir süre bekletilmiştir (Smear hazırlanmıştır). Aynı preparat, kuruduktan sonra lamın alt yüzü alevden geçirilmek suretiyle bakteriler tespit edilmiştir. Preparat, kristal viyole ile basit boyama yapılarak (1-2 dk) bir süre bekletilmiştir. Süre sonunda, hücre yapıları (yuvarlak, çubuk veya spiral) mikroskop altında bakılarak kaydedilmiştir (Adıgüzel 2006; Harley and Prescott 2002).

3.2.4.b. Hücre boyutlarının belirlenmesi

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

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

3.2.4.c. Gram reaksiyon testi

Bu test ile, bakteri hücre duvarlarındaki farklılığın belirlenmesi gerçekleştirilmekte ve bu amaç ile 2 farklı yöntem kullanılmaktadır. Bu çalışmada izolatların Gram özelliklerini belirlemek amacı ile her iki yöntem de kullanılmıştır.

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; Özkan 2009; Acar 2009).

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 (Farrab and Rebolı 2006; Saygılı vd 2006).

3.2.4.d. Endospor varlığının ve hücre içindeki yerinin belirlenmesi

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

3.2.4.e. Hareketlilik testi

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

3.2.4.f. Kültür özelliklerinin belirlenmesi

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

Katı kültür özelliklerinin belirlenmesi için izolatlar geliştikleri katı besiyerlerine 3-4 faz çizgi ekim şeklinde ekilmiş, inkübasyona bırakılarak koloni meydana getirmeleri beklenmiştir. Oluşan koloniler, mikroskopla incelenerek üstten görünüşleri, yüksekliği, kenar şekilleri ve rengi tespit edilmiştir (Temiz 2000; Barış 2008; Özkan 2009).

Bakteriler sıvı besiyerlerinde ise üstte 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 (Arda 2000; Barış 2008).

3.2.5. Fizyolojik testler

3.2.5.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, minimum ve optimum büyüme sıcaklıkları belirlenmiştir (Harley and Prescott 2002; Barış 2008).

3.2.5.b. İzolatların gelişebildikleri pH aralıklarının belirlenmesi

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

3.2.6. Biyokimyasal testler

3.2.6.a. Katalaz testi

Elde edilen bakteri izolatlarının, katalaz enzimine sahip olup olmadıkları bu test ile belirlenmiştir. Bu enzim, elektron transfer zincirinin sonunda açığa çıkan hidrojen peroksit (H₂O₂)'i parçalayıp, H₂O ve O₂ gazına dönüştür ve O₂ gazının oluşumu,

kabarcıklar şeklinde gözlenebilir. Aerobik solunum yapan veya fakültatif olan mikroorganizmalarda bu enzim vardır. Bundan dolayı NA'da geliştirilen 24-48 saatlik bakteri kültüründen, bir öze dolusu alınarak lam üzerine konulmuş ve üzerine bir damla %5'lik H₂O₂ damlatılmıştır. Kabarcık oluşumu katalaz pozitif; oluşmaması ise katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Arda 2000; Harley and Prescott 2002).

3.2.6.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; Acar 2009).

3.2.6.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).

3.2.6.d. Nitrat redüksiyon testi

Bu test, nitrat içeren bir besiyerinde (Nitrat besiyeri) anaerobik bir ortamda nitrifikasyon yapabilen obligat aerop bakterilerin ortamdaki nitratı kullanıp nitrit ve N₂'ye indirilmesi ile gelişmeleri, nitrifikasyon yapamayanların ise gelişmemeleri esasına dayanır (Adıgüzel 2006). NA'da geliştirilen 24-48 saatlik bakteri kültüründen steril çubuk öze ile tek bir koloni alınarak, nitrat besiyeri içeren tüplere saplama ekim yapılmış, üzerine 1 ml otoklavda sterilize edilerek sıcaklığı 50°C'ye düşürülmüş %3'lük su agarı dökülmüş ve 25°C'de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. Ortamın oksijenle ilişkisi kesilmiş olduğundan, nitrifikasyon yapabilen bakterilerin besiyerindeki nitratı faydalanarak gelişmeleri pozitif, nitrifikasyon yapamayanların gelişmemeleri negatif olarak değerlendirilmiştir (Harley and Prescott 2002; Adıgüzel 2006; Ignjatov *et al.* 2007). Ayrıca bakterilerin gelişim gösterdiği bölgeye bağlı olarak fakültatif aerop ve fakültatif anaerop olarak kaydedilmiştir.

3.2.7. Moleküler Testler

3.2.7.a. Bakteri izolatlarının yağ asit profillerinin belirlenmesi

Saf kültür olarak -86°C'de stoklanan bakteri izolatlarından, yağ asit metil ester ekstraksiyonu (FAME), izolasyonu, saflaştırılması ve analizi sistemin kullanma klavuzunda verilen protokole göre yapılmıştır. Bilgisayar kontrollü gaz kromatografi sistemi olan Mikrobiyal Identifikasyon Sistemi (MIDI, Inc., Newark, DE) ile kültüre alınan izolatların yağ asit profilleri belirlenmiş, test izolatları tanılanmaya çalışılmıştır. (Adıgüzel 2006; Kotan vd 2009).

1. Tanılanacak bakterilerin standart besiyerinde (TSA) geliştirilmesi

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

2. Yağ asidi metil esterlerinin saflaştırılması

Bakterilerin yağ asitlerini saf olarak elde edebilmek için 4 farklı çözelti kullanılmıştır (Şahin 1999). Hazırlanan 4 çözelti ile izolatların yağ asit metil esterlerinin saflaştırılması metodu aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir.

1- Standart besiyerlerinde geliştirilen izolatların genç kültürleri steril bir platin öze ile toplanılarak steril cam test tüplerine (5ml) aktarıldı. Tüpler etiketlenerek ağızları sıkıca kapatıldı.

2- Her bir test tüpüne 1 ml çözelti 1'den ilave edildikten sonra 5-10 saniye çalkalandı ve 5 dakika 100°C'lik su banyosunda bekletildi. Tekrar 5-10 saniye çalkalanan test tüpleri 25 dakika boyunca 100°C'lik su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Bu işlem ile canlı hücreler parçalanarak, yağ asitlerinin serbest kalması sağlandı.

3- Test tüplerine 2 ml çözelti 2 eklendi ve 5-10 saniyelik bir çalkalamadan sonra 80°C'de 10 dakika süreyle su banyosunda bekletildi ve hemen ardından 2 dakika süreyle buz veya soğuk su içerisinde hızlı bir şekilde soğutuldu. Bu uygulama ile serbest yağ asitlerine ester bağları ile metil eklenerek ve yağ asitlerinden yağ asit metil esterleri elde edildi. Bu durum yağ asitlerine yüksek sıcaklıklarda uçuculuk özelliği kazandırır.

4- Soğutululan tüplere 1,25 ml çözelti 3 eklendi ve 10 dakika süreyle çalkalandı. Bu aşamada tüp içerisinde alt kısmında inorganik, üst kısmında da organik sıvı fazları olmak üzere iki ayrı faz oluşmuştur. Yağ asit metil esterleri asidik fazdan ayrılarak organik faz bölgesinde toplandı. Bu nedenle pastör pipeti kullanarak tüplerin alt kısmındaki asidik faz atıldı ve organik faz muhafaza edildi.

5- En son aşamada her tüpe 3 ml çözelti 4 ilave edilip, 5 dakika süreyle çalkalandıktan sonra 10 dakika süreyle oda sıcaklığında bekletildi. Çözelti 4, bazik bir çözelti olduğundan, serbest yağ asit metil esterlerini daha saf elde etmemize yardımcı oldu.

6- Tüp içerisinde yine iki ayrı faz oluştu. Üst fazda toplanan ve yağ asit metil esterleri içeren faz pastör pipeti ile alınarak 2 ml'lik gaz kromatografisi tüplerine transfer edildi. Ağızları sıkıca kapatılan bu tüpler MIS cihazı üzerindeki örnek depolama tepsisine yerleştirildi. Daha sonra MIS cihazı çalıştırılarak, sistem kılavuzunda belirtildiği gibi örnekler analiz edildi ve yüzde olarak en yüksek tanı sonucu verenler değerlendirildi (MIS 2005).

3.2.7.b. İzolatların 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.

1. DNA'sı izole edilecek olan bakteriler NA besiyerine 3 faz halinde ekilerek petriler 28-32°C'ye ayarlı inkübatörde 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.
2. 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.
3. Tüpler 2500 rpm'de vortekslenerek homojenize olmaları sağlanmıştır.
4. 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.

5. 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.

6. 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.

7. 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.

8. 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.

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

10. 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.

11. 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.

12. 65°C'ye ayarlı su banyosunda tüpler 15 dak bekletilmiştir.
13. Tüplere eşit hacimde 24:1 kloroform:izoamilalkol eklenmiş ve tüpler 15 dak oda sıcaklığında, çalkalayıcı çalkalanmıştır.
14. Tüpler tekrar 16 000 rpm'de 15 dak santrifüj edilmiş, santrifüj sonrası oluşan üst faz yine yeni steril bir ependorfa alınmıştır.
15. Tüpler üzerine 0,6 hacim izopropanol (DNA'yı bağlayarak, iplikcikler halinde çökmesini sağlar) eklenmiştir.
16. Tüpler -20°C'de 1 gece boyunca bekletilmiştir.
17. Buzdolabından çıkartılan tüpler 15 000 rpm de 15 dak santrifüjlenmiştir.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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 (µg/ml)

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

DNA çalışma solüsyonunun konsantrasyonu ise; İstenen Konsantrasyon (100ng/µl) \times 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 (Adıgüzel 2006).

4. BOX PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi

Test izolatlarının parmakizi analizlerinin belirlenmesi için, test izolatlarından saflaştırılan genomik DNA'lardan, BOX-PCR yöntemi ile evrensel primer kullanılarak istenilen gen bölgeleri çoğaltılmıştır.

Reaksiyonun hazırlanması

PCR yapılacak her bir örnek için; 5 µl 5X Gitschier Buffer, 2.5 µl DMSO, 1.25 µl BSA, 1.25 µl dNTP (deoksinükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP 10mM), 4 µl primer BOX A1R (CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G), 0.3 µl 5 unit/µl Taq DNA polimeraz ve 14.2 µl sdH₂O ile 27 µl lik reaksiyon karışım hazırlanarak karışıma son olarak 3 µl kalıp DNA (50 ng/µl) eklenmiş ve son hacim 30 µl'ye tamamlanmıştır (Adıgüzel 2006).

PCR programı

Master mix ve kalıp DNA'yı içeren ependorf tüplere buharlaşmayı önlemek amacıyla 15 µl mineral yağ ilave edilmiştir. Örnekler thermal döngü cihazına konarak; denatürasyon basamağında 95°C'de 7 dakika ve bunu takip eden denatürasyon için 94°C'de 1 dakika bağlanma basamağında 53°C'de 1 dakika ve uzama basamağında 65°C'de 8 dakika olmak üzere, bu üç basamak için toplam 35 tekrar olacak şekilde programlanmıştır. Son tekrardaki ise uzama basamağı 65°C'de 16 dakika olacak şekilde programlanarak, istenen DNA bölgeleri çoğaltılmıştır (Adıgüzel 2006).

BOX 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 beklenerek 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. Analiz sonucuna göre, farklı profil sergileyen bakteri izolatları tür seviyesinde teşhis edilmek için klonlama prosesine tabi tutulmuştur.

5. 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 (Adıgüzel vd 2009).

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 (deoksinükleotidtrifosfatlar: 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 denetürasyon, 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.

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 beklenerek 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 klonlanması, sekans analizi ve gen bankasındaki verilerle karşılaştırılması

16S rRNA PCR yöntemi ile çoğaltılan 16S rRNA gen bölgesi, pGEM-T Easy Klonlama Kiti kullanılarak, pGEM-T Easy klonlama vektörüne firmanın önerdiği uygun konsantrasyonlar ve şartlarda klonlanmıştır. Daha sonra klonlama sonucunda pozitif sonuç veren kolonilerden plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Adıgüzel vd. 2009). Bu plazmitlerden istenilen parçayı taşıyanlar belirlenerek klonların baz dizileri analizi, Hollanda'da bulunan MacroGen firmasına gönderilerek yapılmıştır. Elde edilen 16S rRNA dizileri Gen Bankasında (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) var olan diğer bakteriyal dizilerle karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucu aralarındaki benzerlik oranları tespit edilmiş ve gen bankası kabul numaraları alınmıştır (Acar 2009).

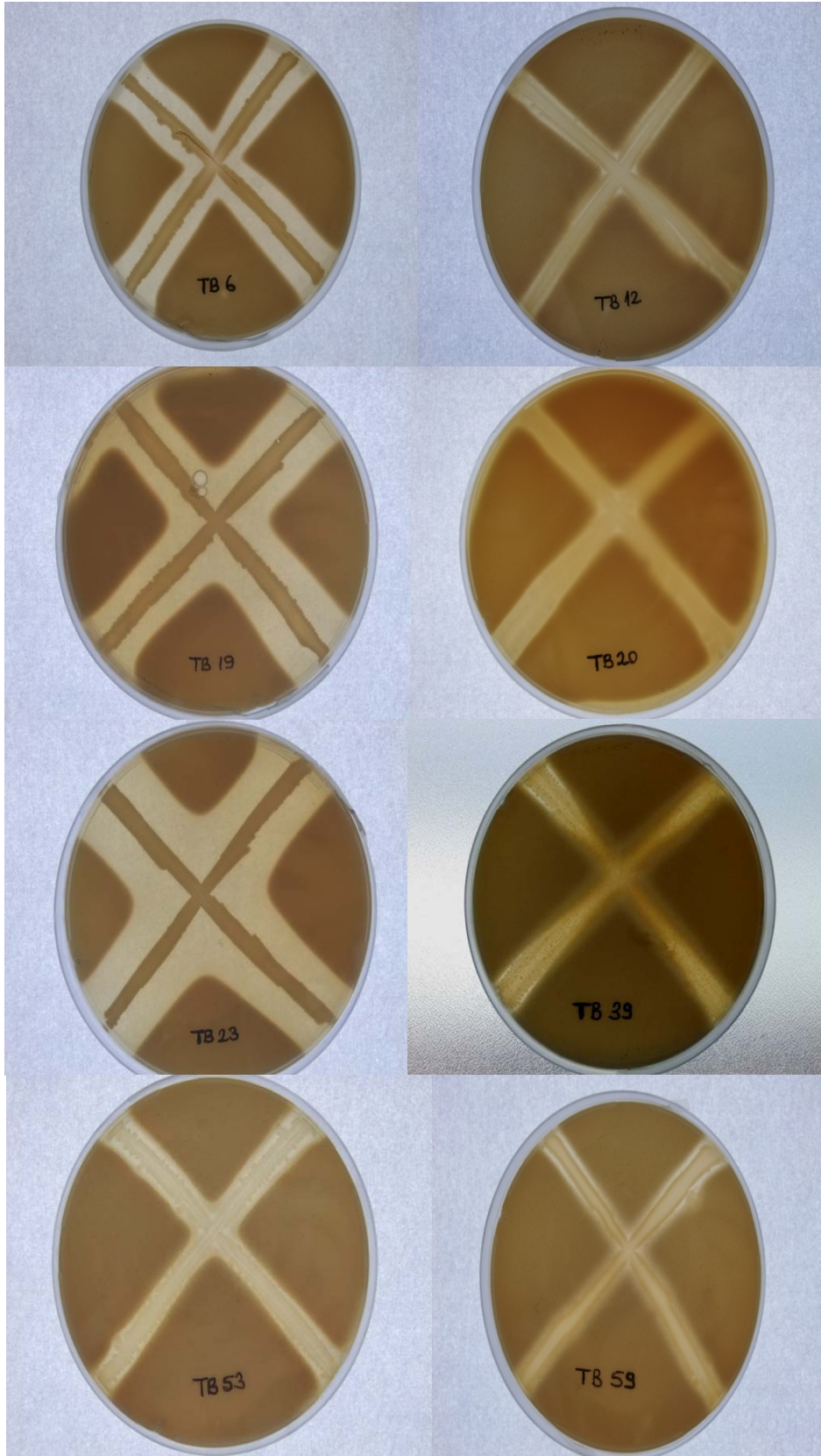
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Bakteri izolasyonu sonuçları

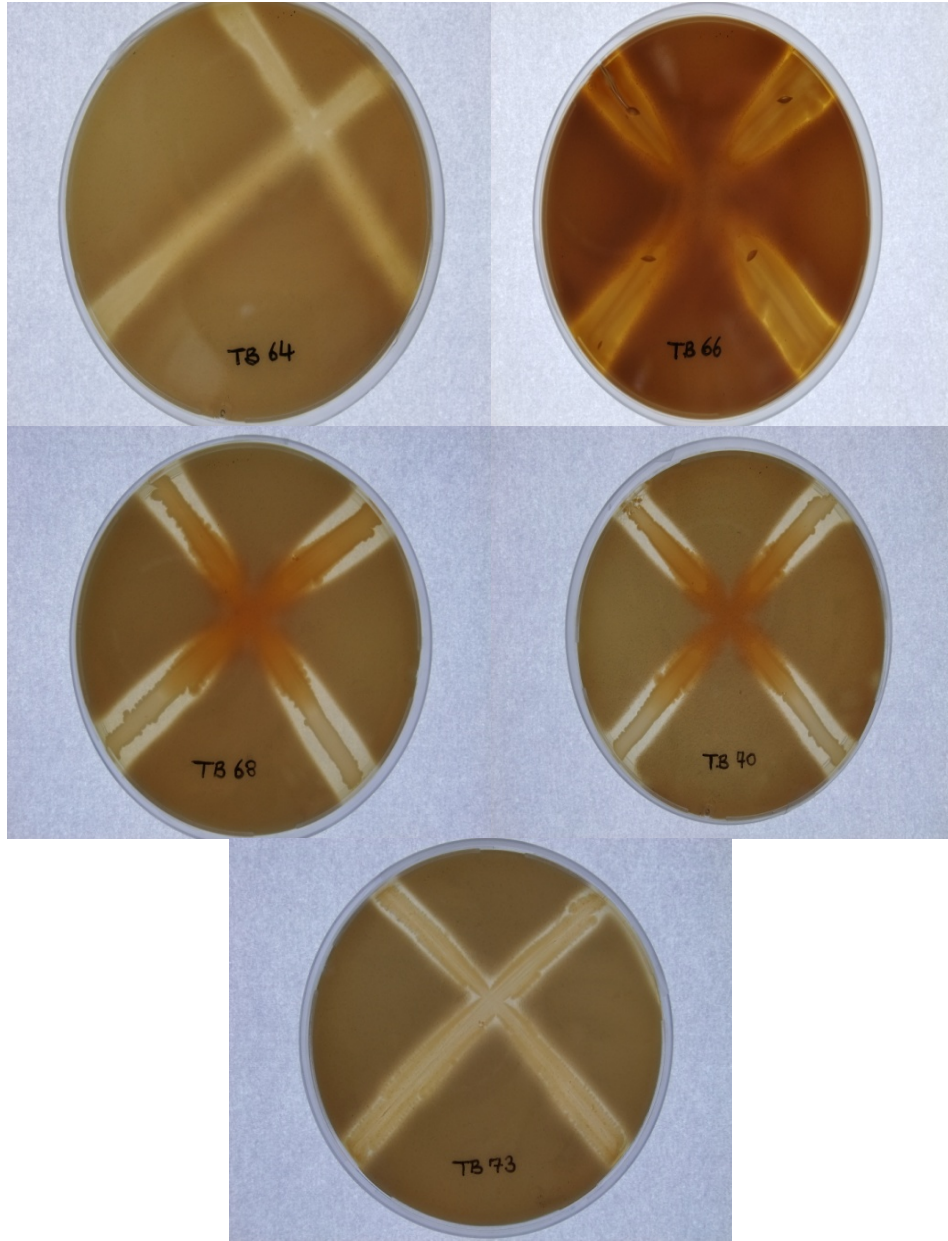
Çalışmanın odağını teşkil eden Erzurum-AŞkale sınırları içerisinde yer alan u farklı manyezit madeni ocağından alınan örnekler, genel besiyerlerine karıŐık kültürler olarak ekilmiŐtir. Besiyerlerinde gelişen bakteriyal kolonilerden farklı olduğu tespit edilen toplam 73 adet bakteri izole edilmiş ve ‘‘TB’’ Şeklinde kodlanmıŐtır.

4.2. İzole edilen bakterilerin CaCO₃ zerine çözücü özelliklerinin sonuçları

Besiyerlerinde gelişen bakteriyal kolonilerden izole edilen 73 bakterinin her biri, YDC-agar besiyerine çizgi ekim yöntemiyle ekilmiş ve *in vitro* olarak CaCO₃'ı çözme potansiyelleri araştırılmıştır. Petri plakları, kurumayı engellemek amacıyla parafilm ile kaplanmış ve 2 hafta süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda YDC besiyerinde zon oluşturan 13 adet bakteri izolatu (TB6, TB12, TB19, TB20, TB23, TB39, TB53, TB59, TB64, TB66, TB68, TB70 ve TB73) ŐeilmiŐ ve çalıŐmaya bu izolatlarla devam edilmiştir. Zon oluŐumunu gösteren görüntüler Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. YDC-agar besiyerinde zon oluşturan 13 izolatın fotoğrafları



Şekil 4.1. YDC-agar besiyerinde zon oluşturan 13 izolatın fotoğrafları

4.3. İzolatların $MgCO_3$ Üzerine Çözücü Özelliklerinin Sonuçları

$CaCO_3$ 'ü çözebilen 13 izolatın her biri, YDC besiyerinden modifiye edilen $MgCO_3$ agar besiyerine çizgi ekim yöntemi ile ekilmiş ve izolatların *in vitro* olarak $MgCO_3$ 'ü çözme potansiyelleri araştırılmıştır. Petri plakları, kurumayı engellemek amacıyla parafilm ile

kaplanmış ve 1 hafta süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Yapılan incelemeler sonucunda hiçbir izolatın $MgCO_3$ 'ü çözemediği görülmüştür.

4.4. İzolatların Morfolojik Test Sonuçları

$CaCO_3$ 'ü çözdüğü belirlenen bakterilerin bazı morfolojik (hücre şekli, boyutları, Gram özelliği, endospor durumları, hareketlilik, katı ve sıvı kültürleri) özellikleri belirlenerek sonuçlar Çizelge 4.1. ve Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. İzolatların morfolojik özellikleri

İzolatın Kodu	Hücre Morfolojisi	Boyutları μ		Gram Özelliği	Endospor		Hareket
		Çapı	Boy		Durumu	Yeri	
TB6	Kok	1		+	-	-	+
TB12	Çubuk	0,5-1	3-5	+	+	Merkezi	++
TB19	Kok	1-1,2		+	-	-	+
TB20	Çubuk	0,5-1	2-5	+	+	Uca yakın	++
TB23	Çubuk	1		+	-	-	-
TB39	Kısa çubuk	1	1-2	+	-	-	-
TB53	Kok	1-1,2		-	-	-	+
TB59	Kısa çubuk	1-1,2	1-2	+	-	-	-
TB64	Kısa çubuk	1-1,5	1-2	+	-	-	-
TB66	Çubuk	1,5	1,5-2	-	-	-	+
TB68	Kısa çubuk	1-1,5	1-2	+	-	-	-
TB70	Kısa çubuk	1-1,5	1-2	+	-	-	-
TB73	Kısa çubuk	1-1,5	1-2	+	-	-	+

* ++: Güçlü pozitif

Çizelge 4.2. İzolatların katı ve sıvı kültür özellikleri

İzolatın Kodu	Katı Kültür			Sıvı Kültür
	Koloni Rengi	Koloni şekli	Koloni Kıvamı	
TB6	Krem	Düzenli	Cıvık krem kıvamlı	Bulanık
TB12	Mat krem	Düzenli	Tereyeğ kıvamında	İpliksi kitle
TB19	Krem	Düzenli	Cıvık krem kıvamlı	Bulanık
TB20	Krem	Düzenli	Tereyeğ kıvamında	İpliksi kitle
TB23	Krem	Düzenli	Cıvık krem kıvamlı	Bulanık
TB39	Açık turuncu	Düzenli	Krem kıvamında	İpliksi kitle
TB53	Krem	Düzenli	Cıvık krem kıvamlı	Üstte pelikül
TB59	Açık turuncu	Düzenli	Krem kıvamında	İpliksi kitle
TB64	Açık turuncu	Düzenli	Krem kıvamında	İpliksi kitle
TB66	Krem	Düzenli	Krem kıvamlı	Bulanık
TB68	Açık turuncu	Düzenli	Tereyağ kıvamında	Bulanık
TB70	Açık turuncu	Düzenli	Krem kıvamında	Bulanık
TB73	Açık turuncu	Düzenli	Krem kıvamında	İpliksi kitle

4.5. İzolatların Fizyolojik Test Sonuçları

Seçilen izolatların maksimum, minimum ve optimum büyüme sıcaklıkları ve büyüyebildikleri pH aralıkları ile oksijen istekleri Çizelge 4.3'de verilmiştir. Tüm izolatların minimum 8°C'de, maksimum 45 ile 50°C'de ve optimum ise genellikle 32°C'de geliştiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. İzolatların fizyolojik özellikleri

İzolatın Kodu	Sıcaklık (°C)			O ₂ İsteği	pH Aralığı
	Minimum	Optimum	Maksimum		
TB6	8	32	50	Aerob	4-9
TB12	8	37	45	Aerob	4-9
TB19	8	32	50	Aerob	4-9
TB20	8	37	45	Aerob	4-9
TB23	8	32	50	Aerob	4-9
TB39	8	32	45	Aerob	4-9
TB53	8	32	45	Aerob	4-9
TB59	8	32	45	Aerob	4-9
TB64	8	32	45	Aerob	4-9
TB66	8	32	50	Fakültatif	4-9
TB68	8	32	50	Aerob	4-9
TB70	8	32	50	Aerob	4-9
TB73	8	32	45	Aerob	4-9

4.6. İzolatların Biyokimyasal Test Sonuçları

Seçilen izolatların biyokimyasal test (katalaz, amilaz, oksidaz ve nitrat redüksiyon testleri) sonuçları Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.4. İzolatların biyokimyasal test sonuçları

İzolatın Kodu	Katalaz Testi	Oksidaz Testi	Amilaz Testi	Nitrat Redüksiyon testi
TB6	++	-	-	Z ⁺
TB12	+	Z ⁺	+	-
TB19	++	-	-	Z ⁺
TB20	+	Z ⁺	+	-
TB23	++	-	-	Z ⁺
TB39	++	-	+	-
TB53	Z ⁺	Z ⁺	+	-
TB59	++	-	+	Z ⁺
TB64	++	-	+	Z ⁺
TB66	+	-	-	+
TB68	++	-	+	-
TB70	++	-	+	-
TB73	++	-	+	-

* Z⁺: Zayıf pozitif ++: Güçlü pozitif

4.7. İzolatların Yağ Asit Profillerine Göre Analiz ve Tanı Sonuçları

İzolatların yağ asidi profillerinin analizleri sonucunda; bazıları hiç, bazıları ise düşük yüzde oranında tanı sonucu vermiştir. Test bakterilerinin % tanı sonuçları ile yağ asidi profilleri sırasıyla Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.5. İzolatların yağ asit profilleri esas alınarak Sherlock 6.0 kütüphanelerine göre tanı sonucu ve yüzde tanı değerleri

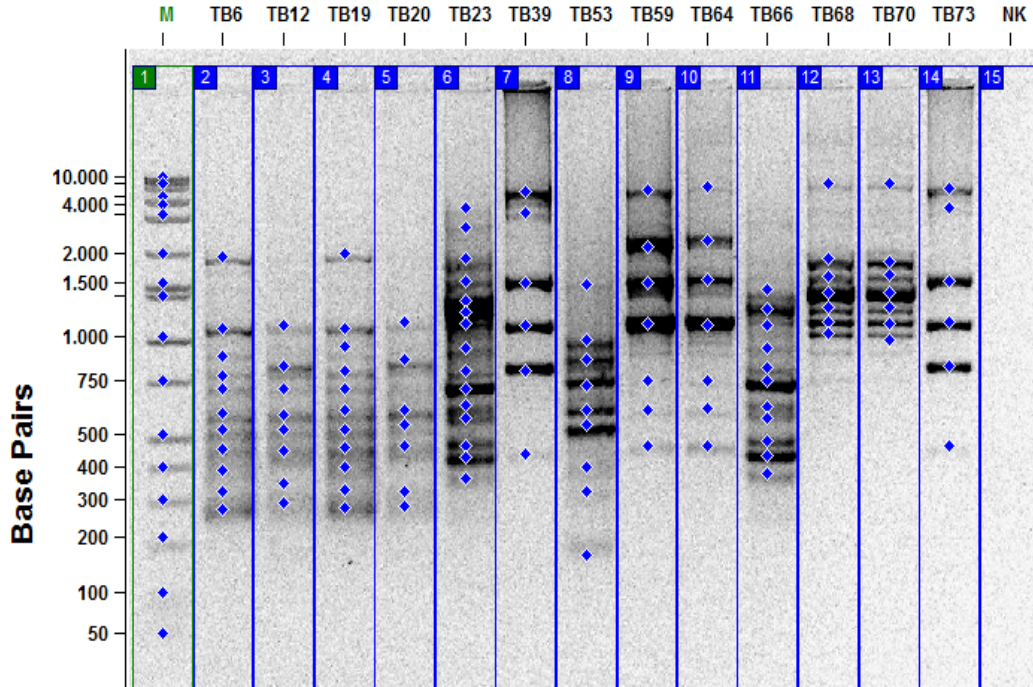
İzolatin Kodu	İzolatin Tanısı	Tanı Yüzdesi
TB6	<i>Staphylococcus arlettae</i> - GCsubgroup A	37
TB12	<i>Bacillus lentus</i>	38
TB19	<i>Staphylococcus equorum</i>	48
TB20	Eşleşme Bulunamadı	-
TB23	<i>Staphylococcus cohnii cohnii</i>	60
TB39	Eşleşme Bulunamadı	-
TB53	<i>Vibrio fischeri</i>	51
TB59	Eşleşme Bulunamadı	-
TB64	Eşleşme Bulunamadı	-
TB66	<i>Enterobacter intermedius</i>	86
TB68	Eşleşme Bulunamadı	-
TB70	Eşleşme Bulunamadı	-
TB73	Eşleşme Bulunamadı	-

Çizelge 4.6. Sherlock 6.0 kütüphanelerine göre izolatların yağ asit profilleri

İzolatlar	<i>Staphylococcus arlettae</i> - GCsubgroup A	<i>Bacillus lentus</i>	<i>Staphylococcus equorum</i>	<i>Staphylococcus cohnii cohnii</i>	<i>Vibrio fischeri</i>	<i>Enterobacter intermedius</i>	Eşleşme Vermeyen Gr(+) ES(+)	Eşleşme Vermeyen Gr(+) ES(-)						
								TB6	TB12	TB19	TB23	TB53	TB66	TB20
10:0							0.38							
11:0iso								1.17	0.92	0.56	0.80		1.44	
12:0 iso								5.35	4.16	3.63	2.49	2.29	5.93	
12:0 3OH							2.63							
12:0	8.35	2.26		3.80	6.29	4.12	6.31	2.03	1.45	0.25			1.40	
13:0 iso		0.76					0.99	24.00	18.56	15.12	22.68	23.28	24.88	
13:0 anteiso							0.33	23.40	20.19	17.92	16.07	16.12	25.99	
14:0 iso	1.75	7.75	2.75				7.55	0.76	0.72	0.82	1.81	1.88	0.76	
14:0	1.70			0.85	4.11	8.03	2.06	0.82	0.63	0.46	1.05	1.48	0.61	
15:0 iso	16.02	17.08	14.25	15.16	1.23		13.31	13.16	13.41	13.38	20.57	21.42	13.09	
15:0 anteiso	36.29	38.41	53.88	46.60			27.58	1.30	1.35	1.46	2.84	2.92	1.25	
15:0 iso 3OH					1.17									
15:0														
16:1 w7c A		0.71					0.66	1.24	1.95	2.05	0.94		1.37	
16:1 iso H									0.34	0.38	0.62			
16:0 N Alcohol							1.26	0.49	0.29	0.23			0.46	
16:0 iso		5.47					2.37	1.17	1.21	1.75	1.32	1.66	1.08	
16:0 anteiso									0.32	0.21			0.25	
16:1 w11c		5.19					3.34	4.91	6.82	5.68	2.21	2.51	4.56	
16:1 w5c									0.29	0.30	0.72			
16:0	5.94	13.29	3.84	4.66	14.74	26.08	8.48	4.28	2.73	3.32	2.84	3.33	3.00	
17:1 iso w10c								5.90	10.71	12.29	4.02	4.56	5.83	
17:0 iso	7.18	1.44	7.34	6.92			0.62	6.92	6.36	10.76	5.93	6.36	5.78	
17:0 anteiso	6.01	4.24	7.69	11.75			1.54	1.11	1.26	2.14	1.03		0.97	
17:0 cyclo						8.50								
18:3 w6c (6,9,12)							2.29	0.41					0.32	
18:0 iso										0.37				
18:1 w9c							4.23	0.68	0.74	0.87			0.41	
18:0	10.43	0.57	5.56	5.00			0.41	0.32		0.32				
19:0 iso	2.21		2.39	1.37										
19:0 anteiso				1.47										
20:0	4.11		2.30	0.82										
15:1 iso H/13:0 3OH									1.38	1.19	6.03	5.66		
12:0 aldeyde?					7.42	8.83	0.56							
16:1 w7c/16:1 w6c		0.46		1.62	56.08	27.68	12.61		1.40	1.37	3.10	3.46		
17:1 isol/anteiso B								0.58	2.27	2.86	2.94	3.07	0.63	
18:1 w7c					7.09	16.77	0.48		0.25	0.31				
16:0 10-methyl					1.22									

4.8. BOX PCR Amplifikasyon Sonuçları

Test edilen izolatların BOX PCR amplifikasyon sonuçları TotalLab TL 120 programında değerlendirilmiş ve yapılan analiz sonuçlarına göre birbirleriyle benzerlik gösteren suşlar düzenlenerek aşağıda özetlenmeye çalışılmıştır. Buna göre; **TB6** ve **TB19** kodlu izolatlar 275 ile 1.950 bç arasında 11 bant, **TB12** ve **TB20** kodlu izolatlar 285 ile 1.140 bç arasında 8 bant, **TB23** kodlu izolat 360 ile 3.450 bç arasında 15 bant, MIS tanı sonucuna göre eşleşme vermeyen **TB39** ve **TB73** kodlu izolatlar 450 ile 5.500 bç arasında 6 bant, **TB53** kodlu izolat 165 ile 1.520 bç arasında 9 bant, MIS tanı sonucuna göre eşleşme vermeyen **TB59** ve **TB64** kodlu izolatlar 460 ile 5.500 bç arasında 7 bant, TB66 kodlu izolat 360 ile 1.420 bç arasında 11 bant, MIS tanı sonucuna göre eşleşme vermeyen **TB68** ve **TB70** kodlu izolatlar ise 1000 ile 6.000 bç arasında 7 bant vermiştir. Ayrıca TB12-TB20, TB39-TB73, TB59-TB64, TB68-TB70 kodlu izolatların aynı genotipik profil sergiledikleri görülmüştür. (Şekil 4.2).



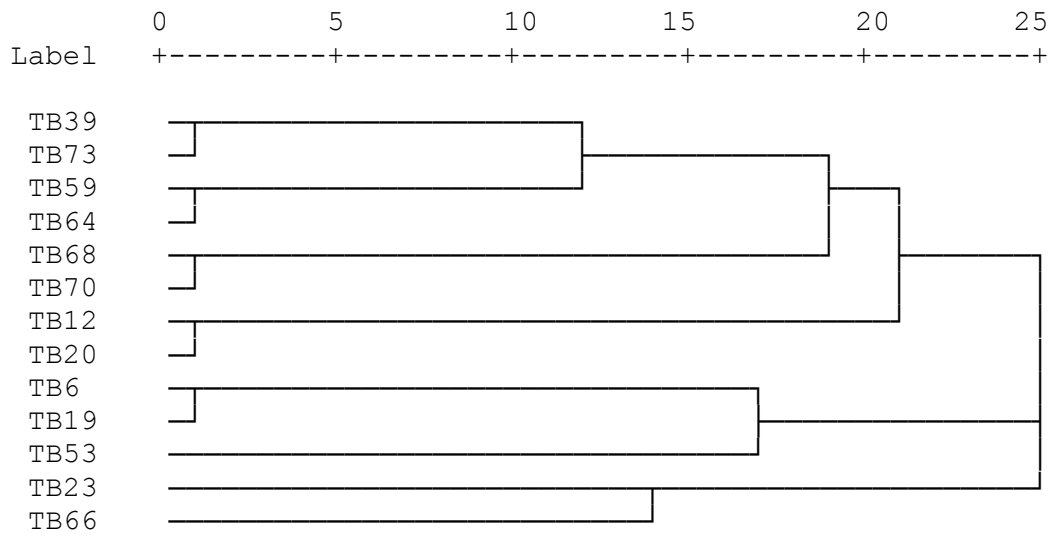
Şekil 4.2. Bakteri izolatlarının BOX PCR elektroforez sonuçları

NK: Negatif Kontrol, Yüklenen jel sırası; Marker, TB6, TB12, TB19, TB20, TB23, TB39, TB53, TB59, TB64, TB66, TB68, TB70, TB73 ve NK. Marker bant uzunluğu: 50, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000, 1400, 1500, 2000, 3000, 4000, 6000, 8000, 10000.

4.9. BOX PCR Sonuçlarına Göre Cluster Analizi

Elde edilen bakteri izolatlarının SPSS (Statistical Package for Social Sciences)'in Windows Release 16.0. (SPSS. Inc.) sürümü kullanılarak cluster analizleri yapılmıştır (Çizelge 4.7).

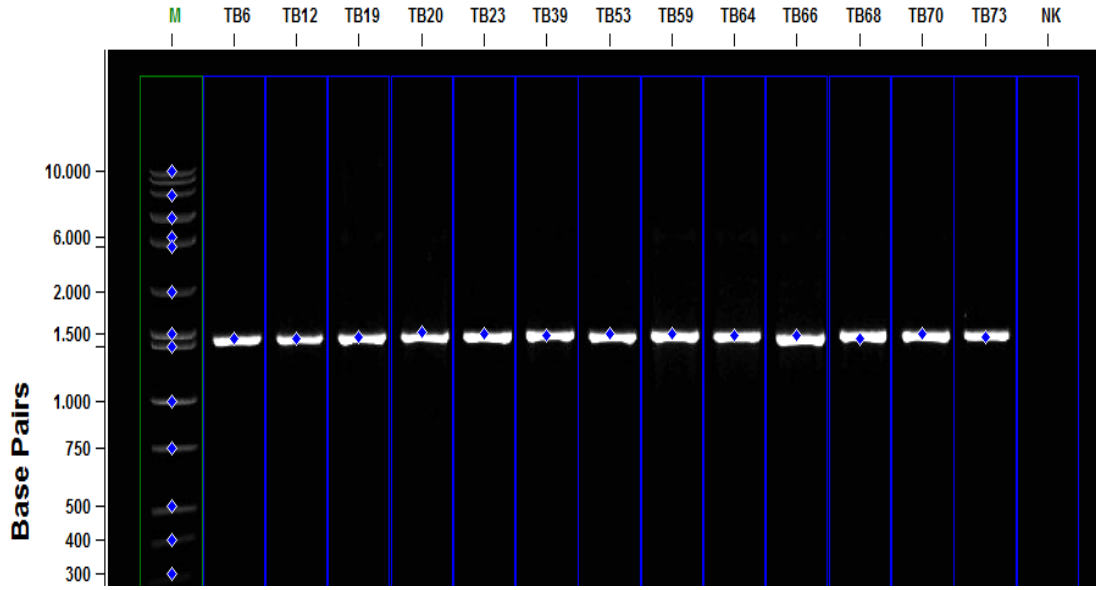
Çizelge 4.7. BOX PCR sonuçlarına göre cluster analizi*



Yapılan Cluster analizleri sonucunda, seçilen izolatların 3 ana cluster'a ayrıldığı belirlenmiştir. 1. clusterın; TB12, TB20, TB39, TB73, TB59, TB64, TB68 ve TB70'den, 2. clusterın; TB6, TB19 ve TB53'den, 3. clusterın ise; TB23, TB66 izolatlarından oluştuğu ve her bir clusterında kendi içerisinde 2 alt cluster'a ayrıldığı görülmüştür. Organizmalar arasındaki benzerliğin ise %75-%96 arasında değiştiği tespit edilmiştir.

4.10. 16S rRNA PCR amplifikasyon sonuçları

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



Şekil 4.3. Bakteri izolatlarının 16S rRNA PCR elektroforez sonuçları

NK: Negatif Kontrol, Yüklenen jel sırası; Marker, TB6, TB12, TB19, TB20, TB23, TB39, TB53, TB59, TB64, TB66, TB68, TB70, TB73 ve NK. Marker bant uzunluğu: 50, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000, 1400, 1500, 2000, 3000, 4000, 6000, 8000, 10000.

4.11. İzolatların 16S rRNA gen bölgelerinin baz dizileri

CaCO₃'ü çözebilen 13 bakteri izolatından BOX-PCR cluster analiz sonucuna göre her gruptan seçilen toplam 9 adet 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 Çizelge 4.8’de verilmiştir. Ayrıca bu izolatların 16S rRNA gen bölgelerinin baz sıraları da EK 1-9’da verilmiştir.

Çizelge 4.8. İzole edilen bakterilerden elde edilen 16S rRNA gen dizileri ile gen bankasındaki 16S rRNA gen dizilerinin karşılaştırılması

İzolat Kodu	Gen Bank Numarası	Nükleotit Sayısı*	Benzerlik Oranı**	En Yakın Filogenetik
TB6	JX188081	1426	99%	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
TB12	JX188082	1427	99%	<i>Bacillus sp.</i>
TB20	JX188083	1427	99%	<i>Bacillus sp.</i>
TB23	JX188084	1426	99%	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
TB53	JX188085	1421	92%	<i>Shewanella baltica</i>
TB59	JX188086	1437	99%	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>
TB66	JX188087	1417	99%	<i>Klebsiella oxytoca</i>
TB68	JX188088	1438	99%	<i>Exiguobacterium sibiricum</i>
TB73	JX188089	1440	99%	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>

* Eşleştirme için kullanılan 16S rRNA nükleotit sayısı

** En yakın filogenetik türün 16S rRNA dizisi ile benzerlik oranı

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Maden kaynakları yönünden zengin ülkeler arasında yer alan Türkiye'nin önemli cevherlerinden birisi de manyezittir. Manyezit, magnezyum karbonat mineralidir ve yapısında bulunan magnezyum oldukça kıymetli bir hammadde durumundadır. Bundan dolayı bu materyalin elde edilebilmesi için yapılan zenginleştirme çalışmaları, ekonomik değerinin artırılması açısından oldukça önemlidir.

Manyezit zenginleştirme çalışmaları, cevherin yapısında bulunan ve kirletici nitelik taşıyan, başta CaCO_3 olmak üzere SiO_2 ve Fe_2O_3 gibi bileşenlerin uzaklaştırılmasını hedeflemektedir. Bu güne kadar manyezitin zenginleştirilmesine yönelik birçok fiziksel ve kimyasal yöntem geliştirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda bu yöntemlerin önemli dezavantajlarının olduğu gözlemlenmiştir (Liu *et al.* 2003; Sever 2006). Bu durum göz önüne alındığında bilim insanları, biyoteknolojik çalışmaların gelişimine paralel olarak madencilikte, biyolojik kazanım tekniklerini uygulamaya başlamışlardır. Özellikle de sülfürlü cevherlerin zenginleştirilmesinde kullanılan biyoliç uygulamaları bu teknikler arasındadır (Pathak *et al.* 2009; Chan *et al.* 2009; Schippers *et al.* 2010). Fakat biyoliç yöntemi, manyezit bünyesinde yer alan CaCO_3 'ün tamponlama özelliğinden dolayı bu madene uygulanamamaktadır.

Yapılan çalışmalar sonucunda manyezitin zenginleştirilmesinde; fiziksel ve kimyasal yöntemlerin önemli dezavantajlar oluşturduğu, biyoliç yönteminin ise uygulanabilirliğinin olmadığı tespit edilmiştir. Bu durum karşısında düşük kaliteli manyezit madenlerinin zenginleştirilmesinde kullanılabilecek yeni, etkili ve daha düşük maliyetli süreçlerin uygulanabileceği yöntemler araştırılmıştır. Özellikle ülkemiz madenlerinde kullanılabilecek, Türkiye orjinli mikroorganizmaların belirlenmesi ve manyezit zenginleştirilmesinde kullanılması, yerel kaynaklarımızın değerlendirilmesi bakımından önemli olacağı düşünülmüştür. Mikrobiyal dünyada her geçen gün yeni türler izole edilmekte, biyoteknolojik ve endüstriyel uygulama alanları oldukça önem kazanmaktadır (Madigan and Martinko 2010).

Daha önce farklı maden zenginleştirme işlemlerinde kullanılmak üzere mikroorganizmalar madenin asıl kaynağından izole edilmişlerdir. Bunun nedeni, mikroorganizmaların oldukça farklı ve ekstrem koşullarda yaşayabilmeleridir (Liu *et al.* 2008; Pathak *et al.* 2009; Chan *et al.* 2009; Schippers *et al.* 2010). Bir mikroorganizmanın bir ortamda yaşayabiliyor olması, o mikroorganizmanın bulunduğu ortamdaki maddeleri kullanabilme yeteneğinde olduğunun göstergesidir. Örneğin, demir madeninin biyoliçinde görevli mikroorganizmalar, *Sulfolobus sp.*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* bakterileri olup, demirin yanında elementer sülfür ve sülfür bileşiklerini de oksitlemektedirler (Sever 2006; Sertkaya 2007; Arslan 2008). Bu mikroorganizmalar maden kaynağı dışında farklı kaynaklardan da izole edilebilmektedirler. Ancak bakteri izolatlarının, buldukları farklı çevre koşullarına, uyum sağlayacak adaptasyonlar kazandıkları düşünülürse, maden kaynağından izole edilmiş bakterilerin madene adaptasyonunun, diğer kaynaklardan elde edilen bakterilere göre daha yüksek olması, beklenen bir sonuçtur ve bu bakteriler tek başlarına fazla etkili değildirler (Sever 2006). Bu bilgiler ışığında, bu çalışmada bir magnezyum karbonat bileşiği olan manyezit madeninin florasında bulunan izolatların da, madenin bünyesinde bulunan magnezyum veya kalsiyumu çözme yeteneğine sahip olabileceği düşüncesiyle, manyezit madeninin kendi florasından bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Yapılan literatür çalışmaları sonucunda manyezit madeninin biyoliçiyle ilgili literatürde sadece 2 tane yayına rastlanmıştır. Mıshra ve arkadaşları (1986) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, manyezit madeninin kendi florasından izole edilen *Bacillus sp.*'nin silis biyoliçinde kullanımının, Mohanty ve arkadaşları (1993) ise, manyezit madeninin kendi florasından izole ettikleri *Bacillus licheniformis*'in silisin uzaklaştırılması üzerine olan etkilerini ortaya koymuşlardır.

Ülkemiz manyezit maden kaynakları açısından değerlendirme yapıldığında ise bu çalışmalar, manyezit hammadde ihtiyacına karşılık vermemektedir. Çünkü Türkiye'de bulunan manyezit madenleri daha öncede belirtildiği gibi silis kirliliğinden çok kalsiyum karbonat kirliliği nedeniyle kullanılamamaktadır. Bu nedenle, yapılan çalışmada, çalışmanın odağını manyezit madenlerindeki tüm bakterilerin izolasyonu ve

tanısından çok kalsiyum karbonatı çözen bakterilerin izolasyonu ve tanısı teşkil etmiştir. Kalsiyum karbonatı çözen organizmalarla ilgili daha önce yapılan çalışmaların amacı ise; bu organizmaların sedimentlerin yüzeyindeki kalsiyum karbonatın parçalanmasında, damla sulama sistemlerindeki kirecin uzaklaştırılmasında ve topraktaki mikroçevrenin iyileştirilmesinde kullanılmasıdır (Dittert and Henrich 2000; Volbers and Henrich 2002; Lian *et al.* 2006; Eroğlu vd. 2012). Bu nedenle, yapılan çalışma sadece ülke literatürü açısından değil, aynı zamanda dünya literatürü açısından da bir ilktir.

Bu çalışma ile Erzurum-Aşkale sınırları içerisinde yer alan manyezit madeni ocaklarından örnekler alınarak, bu yapılar üzerinden mikroorganizmalar izole edilmiştir. Elde edilen toplam 73 bakteri izolatının her birinin, CaCO_3 'ün biyolojik olarak çözünmesindeki etkileri araştırılmıştır. CaCO_3 içeren YDC-agar besiyerlerine yapılan inkübasyonlar sonucunda, toplamda 13 bakteri izolatının CaCO_3 'ü çözdüğü gözlemlenmiştir. Bu izolatlar çeşitli konvensiyonel ve moleküler tekniklerle tanılanmaya çalışılmış, aralarındaki akrabalık ilişkileri belirlenmiştir.

CaCO_3 'ün uzaklaştırılmasında rol oynayan bu bakteri izolatları, yapılan konvensiyonel teknikler ile morfolojik ve kültür özelliklerinin belirlenmesi için ilk olarak katı ve sıvı besiyerlerine inoküle edilmiştir. Oluşan genç kültürlerin, boyamalar yapılarak morfolojik özellikleri ortaya konulmuştur. Elde edilen veriler sonucunda TB6, TB19, TB53 ve TB66 kodlu bakterilerin hücre şeklinin kok, diğerlerinin ise çubuk formunda olduğu tespit edilmiştir. TB12 ve TB20 kodlu bakterilerin endospor oluşturabildikleri ve oldukça hareketli oldukları gözlemlenmiştir.

İzolatların fizyolojik özelliklerinden sıcaklık, oksijen ve pH istekleri belirlenmiştir. 8°C 'den başlayarak 50°C 'ye kadar devam eden sıcaklıklar kullanılmıştır. Örneklerin tamamı 8°C 'de çok yavaş da olsa gelişebilmektedir. TB12, TB20, TB39, TB53, TB59, TB64 ve TB73 kodlu izolatlar 45°C 'nin üzerindeki sıcaklıklarda gelişmemiştir. Fakat TB6, TB19, TB23, TB66, TB68 ve TB70 kodlu diğer izolatların ise maksimum geliştikleri sıcaklık 50°C olarak belirlenmiştir. Çubuk şeklinde olan TB12 ve TB20 kodlu bakterilerin optimum gelişebildikleri sıcaklık 37°C , diğerlerinin ise 32°C olduğu

tespit edilmiştir. Yapılan pH aralıklarının belirlenmesine yönelik çalışmalarda ise tüm izolatların 4-9 pH aralığında gelişim gösterdikleri, oksijen istekleri yönünden TB66 kodlu bakterinin fakültatif, diğerlerinin ise aerop oldukları da tespit edilmiştir.

Elde edilen izolatların bazı biyokimyasal özelliklerine bakıldığında ise; TB53 ve TB66 kodlu izolatların Gram negatif, diğerlerinin Gram pozitif; tüm izolatların katalaz pozitif; TB12, TB20 ve TB53 kodlu izolatların oksidaz pozitif, diğerlerinin ise oksidaz negatif olduğu belirlenmiştir. Özellikle Amilaz testi bazı *Bacillus* türlerini birbirinden ayırmak amacıyla doğrulama testi olarak kullanılmıştır (Slepecky and Hemphill 2006). Sonuçlar incelendiğinde TB6, TB19, TB23 ve TB66 dışındaki tüm izolatlar amilaz pozitif, TB6, TB19, TB23, TB59, TB64 ve TB66 kodlu izolatların nitrat üretiminde pozitif sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Buraya kadar yapılan tüm konvensiyonel test sonuçlarına göre, izolatların sahip olduğu özellikler, literatür verileriyle uygunluk göstermektedir (Wieser and Busse 2000; Brettar *et al.* 2002; Frühling *et al.* 2002; Rodrigues *et al.* 2006; Louboudy *et al.* 2007; Cai *et al.* 2008; Chamkha *et al.* 2011; Görmez 2011).

Çalışmamızda, izolatların tanı ve karakterizasyonu amacıyla uygulanacak olan konvensiyonel testlerin identifikasyonda tek başına yeterli olmamasından dolayı (Adıgüzel 2006;2009), bu testlere ek olarak moleküler yöntemler kullanılmıştır. Bu amaçla uygulanan ilk yöntem, rutin çalışmalarda da sıklıkla tercih edilen mikrobiyal identifikasyon sistemidir. MIS, çok küçük moleküllerin ayrılmasına olanak sağlayan, basit ve hızlı bir tekniktir. Bu tekniğin uygulanabilmesi için kullanılan örneğin, uçucu olması ve yüksek sıcaklık derecelerine (200-250°C) dayanması gerekmektedir. Bu nedenle de bu yöntem ancak uçucu ya da uçucu türevi hazırlanabilen moleküllerin ayırımında kullanılmaktadır (Şahin vd. 1999; Görmez 2011). Doymuş, doymamış, hydroxy, cyclopropone, iso ve anteiso yağ asitlerini içeren 200'den fazla yağ asidi çeşidinin bakteriyel suşların tanısında ayırt edici özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir (Adıgüzel 2006).

Bu çalışmada elde edilen izolatlar, MIS kütüphanesinde yeterli düzeyde temsil edilemediği için ya düşük tanı sonucu vermiş veya hiç eşleşme vermemiştir. MIS tanı

sonucuna göre izolatların yağ asit profilleri incelendiğinde; C_{16:0} yağ asidi içeriğinin tüm izolatlarda bulunduğu ve oranının %2,84 ile %26,08 arasında değiştiği, C_{15:0 iso} yağ asidinin TB66 izolatu dışında diğer tüm izolatlarda bulunduğu ve oranının %1,23 ile %21,42 arasında değiştiği, C_{15:0 anteiso} yağ asidinin ise TB53 ve TB66 kodlu izolatlar dışında hepsinde bulunduğu ve oranının %1,25 ile %53,88 arasında olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmalarımız sonucunda *Staphylococcus arlettae*- GCsubgroup A (TB6), *Bacillus lentus* (TB12), *Staphylococcus equorum* (TB19), *Staphylococcus cohnii cohnii* (TB23) ve tanılanamayan TB20 izolatlarında; C_{15:0 iso} ve C_{15:0 anteiso}'nun temel yağ asidi olarak bulunduğu ve literatür verileriyle uygunluk gösterdiği tespit edilmiştir (Wieser and Busse 2000; Adıgüzel *et al.* 2009; 2012). Ayrıca Wieser and Busse (2000) yapmış oldukları çalışmada, *Staphylococcus* cinsine ait organizmalarda bu major yağ asitlerine ek olarak, yüksek oranda C_{17:0 iso} ve C_{17:1 anteiso} yağ asitlerinin de bulunduğunu göstermişlerdir. Bu veriler çalışmamızda elde ettiğimiz analiz sonuçlarıyla örtüşmektedir.

Vibrio fischeri (TB53), *Enterobacter intermedius* (TB66)'da C_{16:0} ve C_{16:1 w7c/16:1 w6c} yağ asitlerinin, tanı sonucu vermeyen TB39, TB59, TB64, TB68, TB70 ve TB73 kodlu izolatlarda ise C_{13:0 iso} ve C_{13:0 anteiso} yağ asitlerinin diğerlerine göre daha yüksek oranda bulunduğu belirlenmiştir. Yine TB6, TB12, TB19, TB23, TB53 ve TB66 kodlu organizmalar MIS tanılama sistemine göre sırasıyla *S. arlettae*- GCsubgroup A, *B. lentus*, *S. equorum*, *S. cohnii cohnii*, *V. fischeri* ve *E. intermedius* olarak tanı sonucu verirken, aynı organizmalar 16S rRNA gen dizisi analizine göre ise; *S. epidermidis*, *Bacillus sp.*, *S. haemolyticus*, *Shewanella baltica*, *Klebsiella oxytoca* olarak tanı sonucu vermiştir. Elde edilen MIS verileri ile sekans analiz sonuçları tam anlamıyla bir uyum göstermemektedirler. Ayrıca MIS sonucuna göre TB20, TB39, TB59, TB64, TB68, TB70 ve TB73 kodlu izolatlar kütüphane ile eşleşme vermeyerek tanılanamamıştır. Bu izolatların 16S rRNA gen dizisi analiz sonuçlarına göre ise *Bacillus sp.*, *Exiguobacterium aurantiacum* ve *Exiguobacterium sibiricum* olarak tanı sonucu verdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bağlamında, MIS tekniğinin, test izolatlarının tür

düzeyinde tanılanmasında yeterli olmadığı, cins düzeyinde ise yeterli olabileceği düşünülmektedir. Yapılan literatür taraması sonucunda da, benzer bulgular elde edilmiştir (Kaneda 1967; Wieser and Busse 2000; Brettar *et al.* 2002; Frühling *et al.* 2002; Rodrigues *et al.* 2006; Louboudy *et al.* 2007; Cai *et al.* 2008; Pepi *et al.* 2008; Adıgüzel *et al.* 2009; Chamkha *et al.* 2011).

Çalışmamızda kullandığımız bir diğer moleküler yöntem ise rep-PCR'dır. Bu teknik, ekosistemdeki çeşitliliği, suşlar arasındaki filogenetik ilişkiyi ortaya koymada ve genetiksel olarak birbiriyle yakın olan mikroorganizmaları tür ve tür altı seviyede ayırmada oldukça etkin ve basit bir yöntem olarak bilinmektedir (Adıgüzel *et al.* 2012). Yapılan bu çalışmada BOX-PCR yönteminin organizmalar arasındaki genetik polimorfizmi ortaya koymada, literatür veriyle paralel olarak oldukça başarılı olduğu tespit edilmiştir (Adıgüzel 2006; Adıgüzel *et al.* 2009;2012).

Genomik parmak izi analizleri, elde edilen izolatların birbirleriyle olan akrabalık ilişkileri hakkında fikir vermesine rağmen, tür bazında tam bir teşhisin gerçekleştirilebilmesi için ilave bir teste ihtiyaç duymaktadır. Son yıllarda sistematik çalışma gerçekleştiren bilim insanları, bakterilerin familya, cins ve tür düzeyinde tanılanması için, 16S rRNA'yı da içeren makromolekül bölgelerinin analizinden yaygın bir şekilde faydalanmaktadırlar (Acar 2009; Adıgüzel *et al.* 2009; 2011; Adıgüzel *et al.* 2012). Bunun nedeni, 16S rRNA evrimsel süreçte mutasyona kapalı olan korunmuş bir bölgedir. Ancak, bazı çalışmalarda aynı cinse ait türlerin 16S rRNA genlerinin dizin analizleri arasındaki benzerliğin %97'den az olduğu, aynı türe ait suşların ise 16S rRNA genleri baz dizilimi açısından %97'den daha fazla benzer olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, aralarında 16S rRNA gen dizisi açısından %95'ten daha fazla benzerlik gösteren bakterilerin aynı cinse ait türler olduğu bilinmektedir (Madigan and Martinko 2010).

Bu çalışmada organizmaların tanı ve karakterizasyonu amacıyla, son olarak 16S rRNA dizi analiz yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla izolatların 16S rRNA bölgeleri PCR yardımıyla çoğaltılmış, uygun bir klonlama protokolü (Adıgüzel *et al.* 2011) kullanılarak klonlanmış ve sekans analizleri yaptırılmıştır. Analiz sonucunda; TB6,

TB12, TB20, TB23, TB59, TB66, TB68 ve TB73 kodlu izolatların %99 oranında, sırasıyla; *S. epidermidis*, *Bacillus sp.*, *S. haemolyticus*, *E. aurantiacum*, *K. oxytoca*, *E. sibiricum*, *E. Aurantiacum* bakterilerine benzediği görülmüştür. Fakat %92 oranında *Shewanella baltica*'ya benzerlik gösteren TB53 izolatının ise bu türe hatta cinse ait bir mikroorganizma olmadığı ve yeni bir cins olarak taksonomiye kazandırılması gerektiği düşünülmektedir. Çünkü aynı cinse ait olan türlerin 16S rRNA genlerinin baz dizileri arasındaki benzerliğin %95-97 arasında olduğu, farklı cinse ait olan organizmalar arasındaki benzerliğin ise %95'den daha az olduğu bilinmektedir. (Sezgin 2007; Madigan and Martinko 2010).

Yapılan tüm bu çalışmalar sonucunda, moleküler metotların her birisinin tanı için tek başına yeterli olmadığı, tanı ve karakterizasyon için birden fazla metodun bir arada kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır (Chelius and Moore 2004; Adıgüzel 2006;2011). Özellikle tanıda doğru sonuca varabilmek için moleküler tanı yöntemlerinin mutlaka yapılması gerektiğine kanaat getirilmiştir. Moleküler metodlar içerisinde de birden fazla metodun kullanılmasının sonuçların güvenilirliğini arttırdığı ve bir metotla tespit edilemeyen özelliğin diğer yöntemle belirlenebildiği gözlemlenmiştir.

Ayrıca bu çalışmada, kalsiyum karbonatı çözen mikroorganizmalar izole edilmesine karşın, bu bakterilerin hangi mekanizmayla bu işlemi gerçekleştirdiğine yönelik herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Doğada karbonatların, mikrobiyolojik aktivite sonucunda doğrudan ya da dolaylı olarak kolayca parçalanabildiği bilinen bir gerçektir (Golubic and Schneider 1979). Daha önce yapılan birçok çalışmada, kireç taşının bozunmasında *Bacillus mycoides*, *B. megaterium* ve *B. mesentericus* gibi spor oluşturan, Gram değişken veya Gram negatif, çubuk veya kok forma sahip birçok bakterinin rol oynayabileceği gösterilmiştir (Ehrlich and Newman 2009). Bu olay, genellikle mikroorganizmalar tarafından üretilen organik ve inorganik asitlerin bir sonucudur. Yapılan çalışmalarda karbonatların çözünmesi ve mikroorganizmalar arasındaki ilişki hakkında çok fazla araştırma bulunmamaktadır (Lüttge and Conrad 2004).

Kalsiyum karbonatı çözen bir başka mekanizmanın ise mikroorganizmaların salgıladıkları karbonik anhidraz enzimi olduğu bilinmektedir. Karbonik anhidraz (CA), bütün organizmalarda bulunan Zn^{+2} iyonlu bir metaloenzimdir (Karbonat Hidroliyz E. C. 4.2.1.1). İlk olarak, sığır eritrositlerinde keşfedilen karbonik anhidraz canlılarda CO_2 molekülünün hidratasyonu ve HCO_3^- iyonunun dehidratasyonunu katalizleyen bir enzimdir. Karbonik anhidrazlar, omurgalılar, yüksek bitkiler ve siyanobakterilerin yanı sıra başta bakteriler olmak üzere prokaryotlarda da bulunur. *Neisseria spp.*, *E.coli*, *Synechocystis spp.*, *Asetobacterium woodi*, *Anabaena variabilis* ve *Rhodospirillum rubrum*'da; patojenik bakteri olan *Helicobacter pylori* ve *Neisseria gonorrhoeae*'da karbonik anhidraz varlığı keşfedilmiştir (Smith and Ferry 2000; Supuran *et al.* 2003; Işık 2008).

Prokaryotlarda CO_2 taşınması ve fotosentez gibi önemli fonksiyonlara sahip olduğu saptanan karbonik anhidrazın, manyezit madenine yapısal benzerlik gösteren ve yüksek oranda kalsiyum karbonat içeren kireçtaşı ve dolomitin çözünmesinde de aktif rol alabileceği, daha önce yapılan bir kaç bilimsel çalışmayla kanıtlanmıştır (Zaihua 2001; Li *et al.* 2005).

Bu tez kapsamında, izole edilen bakteriler endüstriyel ve biyoteknolojik uygulama alanlarında oldukça büyük öneme sahiptirler. İleriye dönük çalışmalarda, manyezit cevheri bünyesinde bulunan ve büyük sorun teşkil eden kalsiyum karbonatın çözünmesinde bu izolatların geniş oranda kullanımının sağlanması ve manyezit yataklarının bu çevre dostu yeni teknoloji ile değerinin arttırılarak ekonomiye kazandırılması düşünülmektedir. Yine bakterilerin kalsiyum karbonatı hangi mekanizmayla çözdüğüne dair herhangi bir bilgi bulunmadığından, çalışmamızın devamı olarak, izolatların etki mekanizmalarının aydınlatılması, bu bakterilerin biyoteknolojik uygulamalarda kullanılırken, ihtiyaç duydukları optimal koşulların tespit edilmesi planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abalı, Y., Çopur M., Yavuz M., 2006. Determination of the optimum conditions for dissolution of magnesite with H₂SO₄ solutions. *Indian Journal of Chemical Technology*, 13, pp, 391-397.
- Acar, S., 2009. Hasanabdal Köyü Termal Tesislerinden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Adıgüzel, A., 2001. Erzuruma bağlı bazı köylerden toplanan süt örneklerinde brucella abortus antikorlarının ELISA ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Adıgüzel, A., 2006. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Adıgüzel, A., Ozkan, H., Baris, O., Inan, K., Gulluce, M., Sahin, F., 2009. Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *J Microbiol Methods*, 79(3), 321-8.
- Adıgüzel, A., Inan, K., Sahin, F., Tulin Arasoğlu, T., Gulluce, M., Belduz, A.O., Baris, O., 2011. Molecular diversity of thermophilic bacteria isolated from Pasinler hot spring (Erzurum, Turkey). *Turk J Biol*, 35, 267-274.
- Adıgüzel, G., Gulluce, M., Bozoglu, C., Yanmis, D., Gormez, A., Atasever, M., Adıgüzel, A., 2012. Molecular Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail beef in Erzurum, Turkey. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 6(3) (In press).
- Akçıl A, Çiftçi H, 2003. Küre Bakır Cevherinin Bakteriyel Liçi, *Madencilik*, 42(4), 15-25.
- Akkoyun, Ö., Ünver B., 2001. Küçük Ölçekli Manyezit İşletmelerinde Üretim Veriminin Arttırılması İçin Öncelikle Ne Yapılabilir? - Bir Örnek. *Türkiye 17. Uluslararası Madencilik Kongresi ve Sergisi*, Tumaks. Smith, S.E., 2012. What is Calcium Carbonate.
- Annisimov, M., 2012. What is Calcium Carbonate?. wiseGEEK, <http://www.wisegeek.com>, (15.07.2012).
- Anonim., 2012. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Maden>, (01.06.2012).
- Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi No: 46, 548s.
- Arda, M., 2012. Temel Mikrobiyoloji. Veterinerlik Fakültesi, Ankara, <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?>, (10.06.2012).
- Arslan, V.İ., 2008. Biyoliç Yöntemiyle Endüstriyel Hammaddelerden Safsızlıkların Uzaklaştırılmasının Araştırılması. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Bağırsakçı, S., 2000. Dünya’da ve Türkiye’de Madencilik Sektörü (Tarihi Gelişimi, Politikalar, Sorunlar ve Çözüm Önerileri), Türkiye Ve Orta Doğu Amme İdaresi Enstitüsü Kamu Yönetimi Lisans Üstü Uzmanlık Programı, Ankara, 197s.
- Banks, E.D., Taylor, N.M., Gulley, J., Lubbers, B.R., Giarrizo, J.G., Bullen, H.A., Hoehler, T.M., and Barton H.A., 2010. Bacterial Calcium Carbonate Precipitation in Cave Environments: A Function of Calcium Homeostasis. *Geomicrobiology Journal*, 27, 444–454.

- Barış, Ö., 2008. Erzurum İlindeki Mağaralarda Damlatışı Oluşumunda Etkili Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Tanısı. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Bayrak, B., Laçın, O., Hanifi, Saraç H., 2010. Kinetic study on the leaching of calcined magnesite in gluconic acid solutions. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 16, 479–484.
- Becerra-Castro, C., Monterroso, C., Prieto-Fernández, A., Rodríguez-Lamas, L., Loureiro-Vinas, M., Acea, M.J., Kidd, P.S., 2012. Pseudometallophytes colonising Pb/Zn mine tailings: A description of the plant–microorganism–rhizosphere soil system and isolation of metal-tolerant bacteria. *Journal of Hazardous Materials*, 217–218, 350–359.
- Bonaventura, M., Gallo, M., Cacchio, P., Ercole, C., Lepidi, A., 2010. Microbial Formation of Oxalate Films on Monument Surfaces: Bioprotection or Biodeterioration?. *Geomicrobiology Journal*, 16(1), 55-64
- Brettar, I., Christen, R., and Hofle, M.G., 2002. *Shewanella denitrificans* sp. nov., a vigorously denitrifying bacterium isolated from the oxic–anoxic interface of the Gotland Deep in the central Baltic Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 2211–2217.
- Bruijn de, F.J., 2011. *Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches*. Wiley-Blackwell, 763, New Jersey.
- Bulut, Ç., 2003. Isolation and Molecular Characterization of Lactic Acid Bacteria from Cheese. Master of Science, Izmir Institute of Technology, İzmir.
- Buyer, J. S., 2006. Rapid and sensitive FAME analysis of bacteria by cold trap injection gas chromatography. *Journal of Microbiological Methods*, 67, 187–190.
- Cai, J., Wang, Z., Cai, C., and Zhou, Y., 2008. Characterization and identification of virulent *Klebsiella oxytoca* isolated from abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*) postlarvae with mass mortality in Fujian, China. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97, 70–75.
- Carretero, M.I. and Pozo, M., 2010. Clay and non-clay minerals in the pharmaceutical and cosmetic industries Part II. Active ingredients. *Applied Clay Science*, 47, 171–181.
- Chamkha, M., Trabelsi, Y., Mnif, S., and Sayadi, S., 2011. Isolation and characterization of *Klebsiella oxytoca* strain degrading crude oil from a Tunisian off-shore oil field. *Journal of Basic Microbiology*, 51, 580–589.
- Chan, B.K.C., Bouzalakos, S., Dudeney A.W.L., 2009. Cemented products containing waste from mineral processing and bioleaching. *Minerals Engineering*, 22, 1326-1333.
- Chang, J.S., Kim, Y.H., Kim, W.K., 2008. The ars genotype characterization of arsenic-resistant bacteria from arsenic-contaminated gold–silver mines in the Republic of Korea *Appl Microbiol Biotechnol*, 80, 155–165.
- Chelius, M.K. and Moore J.C., 2004. Molecular Phylogenetic Analysis of Archaea and Bacteria in Wind Cave, South Dakota. *Geomicrobiology Journal*, 21, 123–134.
- Chou, L., Garrels, R.M., Wollast, R., 1989. Comparative study of the kinetics and mechanism of dissolution of carbonate minerals. *Chemical Geology*, 78(3-4), 269-282.
- Çakır D., 2007. Asidik Ortamda Manyezit Artığından Magnezyumun Özütlemeesi, Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

- Çetinkuş, K., 2007. Çamaltı Tuzlası Halofilik Mikroorganizmalarının İzolasyonu Ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Demir, F., and Dönmez, B., 2008. Optimization of the dissolution of magnesite in citric acid solutions. *Int. J. Miner. Process.* 87, 60–64.
- Dittert, N., and Henrich, R., 2000. Carbonate dissolution in the South Atlantic Ocean: evidence from ultrastructure breakdown in *Globigerina bulloides*. *Deep-Sea Research I* 47, 603-620.
- Dönmez B., Demir F., Laçın O., 2009. Endüstri Mühendisliği ve Kimya, 2009 Dergisi 15(6), 865-869.
- DPT, Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı., 2001. Madencilik ve Özel İhtisas Komisyonu Raporu Endüstriyel Hammaddeler Alt Komisyonu Toprak Sanayii Hammaddeler II (Refrakter Killer ve Şiferton-Manyezit-Dolomit-Olivin-Zirkon-Disten-Sillimanit Andaluzit) Çalışma Grubu Raporu Ankara.
- DPT, 2007. Dokuzuncu Kalkınma Planı Madencilik Özel İhtisas Komisyonu Raporu (2007-2013), Ankara.
- Durmaz, R., 2001. Moleküler Epidemiyolojinin Prensipleri. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji (2. Baskı), Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şirketi, 139-147, İstanbul.
- Durmaz R., 2012. 1983'ten Günümüze Moleküler Tanı Testlerinde Gelişmeler. 7. Ulusal Tanısal ve Moleküler Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara.
- Dülger, S., 2003. Gönen, Kestanbol ve Diyadin kaplıcalarından termofilik bakterilerin izolasyonu, moleküler yöntemlerle karakterizasyonu ve tanımlanması. Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Dülger, S., 1997. Ayder kaplıcasından Termofilik Bakteri İzolasyonu ve Teşhisi. Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Johnston, C, G., Vestal, R, J., 1993. Biogeochemistry of oxalates in the Antarctic cryptoendolithic lichendominated community. *Microb Ecol*, 25, 305-319.
- Eerola, E and Olli-Pekka Lehtonen, O.,P., 1988. Optimal Data Processing Procedure for Automatic Bacterial Identification by Gas-Liquid Chromatography of Cellular Fatty Acids. *Journal Of Clinical Microbiology*, 26(9), 1745-1753.
- Ehrlich, H.L., and Newman, D.K., 2009. *Geomicrobiology* 5.ed. Taylor & Francis Group, 607p, USA.
- Erdoğan N., Birici B., Topal U., Şahbaz O., 2004. Manyezit Ara Ürünün Kalsinasyon Manyetik Ayırma Yöntemleriyle Zenginleştirilmesi, J. Endüstriyel Hammaddeler Sempozyumu, İzmir, Türkiye.
- Erdoğan, S., 2008. Maden, Anadolu Madenciliği Medeniyetlere Öncülük Etmiştir. İşveren, 4p.
- Eroğlu, S., Şahin, Ü., Tunç, T., and Fikrettin Şahin, F., 2012. Bacterial application increased the flow rate of CaCO₃-clogged emitters of drip irrigation system. *Journal of Environmental Management*, 98, 37-42.
- Farrab, W.E. and Rebolli, A.C., 2006. The Genus *Bacillus*—Medical. Dworkin, M.(Editor-in-Chief), *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria*. Third Edition. Springer Science, 609–630, New York, USA.
- Frühling, A., Schumann, P., Hippe, H., Straubler, B., and Stackebrandt, E., 2002. *Exiguobacterium undae* sp. nov. and *Exiguobacterium antarcticum* sp. nov.

- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52, 1171–1176.
- Gadd, G.M., 2010. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, 156, 609–643.
- Gabrielsen, P., 2010. Mining for Microbes: Life Beneath the Surface of the Earth. Paydirt, New Mexico, <http://infohost.nmt.edu/~paydirt/j/index.php/archives/152-microbes>, (16.06.2012).
- Gırı, M, S.,2009. Morphological And Molecular Variability Of *Xanthomonas Axonopodis* Pv. *Punicae* (Hingorani And Singh) Vauterin *Et Al.* Causing Bacterial Blight Of Pomegranate, Master Thesis, Department Of Plant Pathology College Of Agriculture, Dharwad University Of Agricultural Sciences Dharwad, p, 74.
- Gray, M. W., Sankoff, D., Cedergren, R. J., 1984. On the Evolutionary Descent of Organisms and Organelles: A Global Phylogeny Based on a Highly Conserved Structural Core in Small Subunit Ribosomal RNA, *Nucleic Acids Research*, 12, 5837- 5852.
- Görmez, A., 2011. Erzurum İlinde Kayısı Ağaçlarından izole Edilen *Pseudomonas* Türlerinin Tanısı, Karakterizasyonu ve Çeşit Reaksiyonları. Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum
- Güllüce, M., Adıgüzel A., ve Algur Ö.F., 1996. Erzurum Bölgesinde Temin Edilen Çeşitli Peynir Örneklerinde *Brucella* Antijenlerinin ELISA ile Saptanması. *Türk Mikrobiyol Cem Dergisi*, 33, 356-360.
- Gümüşel, F., 2002. Biyoteknoloji, Genetik ve Sağlık Sektörü. Kocaeli sanayi için teknolojik öngörü raporu, s. 73-135.
- Golubic, S, Schneider, J., 1979. Carbonate dissolution. In: Trudinger PA, Swaine DJ, eds. *Biogeochemical Cycling of Mineral-Forming Elements*. Amsterdam: Elsevier, 107–129.
- Harley, J.P. and Prescott, L.M., 2002. *Laboratory Exercises in Microbiology*, Fifth Edition New York: The McGraw–Hill Companies, 466p.
- Hasanekoğlu, İ. ve Yeşilyurt, S., 2002. Mikrobiyoloji. Erzurum.
- Haselip, J., 2006. Section 3: Mining In The Developing World. *Journal of Cleaner Production*, 14, 374-375.
- Head, I.M., Saunders, J.R., and Pickup, R.W. 1998. Microbial Evolution, Diversity, and Ecology: A Decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganisms. *Microbial Ecology* 35, 1–21.
- Ignjatov, M., Milosevic, M., Nikolic, Z., Vujakovic, M and Petrovic D., 2007. Characterization Of *Pseudomonas Savastanoi* Pv. *Glycinea* Isolates From Vojvodina, The Polish Phytopathological Society, 45: 43-54.
- Işık, S., 2008. Maya Karbonik Anhidrazının Ekspresyonu, Saflaştırılması, Elektroforetik ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Balıkesir Üniveristesesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- Ireng, L.M., and Gala, L., 2012. Rapid detection methods for *Bacillus anthracis* in environmental samples: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, 93, 1411–1422.
- Jabeen, R., İftikhar, T and Huma Batool, H., 2012. Isolation, Characterization, Preservation And Pathogenicity Test Of *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* Causing Blb Disease In Rice, *Pak. J. Bot*, 44(1), 261-265.

- Jareonmit, P., Mehta, M., Sadowsky, M.J., Sajjaphan, K., 2012. Phylogenetic and phenotypic analyses of arsenic-reducing bacteria isolated from an old tin mine area in Thailand. *World J Microbiol Biotechnol*, 28, 2287–2292.
- Kadayıfcılar, P., 2007. Klinik Tanıya Yönelik Dna Hibridizasyonuna Dayalı Elektrokimyasal Genosensör Tasarımı. Doktora tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Kaneda, T., 1967. Fatty Acids in the Genus *Bacillus* I. Iso- and Anteiso-Fatty Acids as Characteristic Constituents of Lipids in 10 Species. *Journal Of Bacteriology*, 93(3), 894-903.
- Kato, T., Sugawara A., and Hososda, N., 2002. Calcium Carbonate- Organic Hybrid Materials. *Advanced Materials*, 14(12), 869-877.
- Khiyami, M.A., Serour, E.A., Shehata, M.M., Bahklia, A.H., 2012. Thermo-aerobic bacteria from geothermal springs in Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology*, 11(16), pp. 4053-4062.
- Khoodoo, M. H. R. and Jaufeerally-Fakim, Y., 2004. RAPD-PCR fingerprinting and Southern analysis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* strains isolated from different aroid hosts and geographical locations. *Plant Disease*, 88, 980-988.
- Kıran, F., 2006. Hücre Duvarı Protein Profilleri Ve Pilazmid İçeriklerine Göre Laktik Asit Bakterilerinin Moleküler Tanısı. Yüksek lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kocadağıştan, M.E., 2007. Çayeli Yötresi Bakır Cevherlerinin Biyoliçi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Koike, S.T., Barak, J.D., Henderson, D.M. and Gilbertson, R.L., 1999. Bacterial blight of leek: a new disease in California caused by *Pseudomonas syringae*. *Plant Dis.*, 83, 165-170.
- Kotan, R., Karagöz, K ve Şahin F., 2009. *Erwinia amylovora* Strainlerinin Streptomisin Sülfata Karşı Duyarlılıkları ve Strainlerin Yağ Asidi Metil Esterleri ile Antibiyotiğe Duyarlılıkları Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi. *Atatürk Üniversitesi Ziraat fakültesi Dergisi*, 40 (1), 1-7.
- Külekçi, G., 2012. Anaerob Bakterilerin Tanımlanmasında Moleküler ve Diğer Yöntemler. 7. Ulusal Tanısal ve Moleküler Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara.
- Lacıar, A., Vaca, L., Lopresti, R., Vega, A., and Mattana, C., 2006. Dna Fingerprinting By Eric-Pcr For Comparing *Listeria* Spp. Strains Isolated From Different Sources İn San Luis, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 38, 55-60.
- Lelliott, R. A. and Stead D. E., 1987. *Methods for The Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. Blacwell Scientific Publications. p216.
- Leveille S.A., 2000. Identification of Bacteria Recovered from Acide Mine Environments by Reverse Sample Genom Probing (*Thiobacillus acidophilus*, *Thiobacillus thiooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Thiobacillus ferrooxidans*). MSc Thesis, Laurentian Univ. of Sudbury, Canada.
- Li, W., Yu, L., Yuan, D., Yun Wu, Y., and Xian-dong Zeng, X., 2005. A study of the activity and ecological significance of carbonic anhydrase from soil and its microbes from different karst ecosystems of Southwest China. *Plant and Soil*, 272, 133–141.

- Lian, B., Hu, Q., Chen, J., Ji, J., and Teng, H.H., 2006. Carbonate biomineralization induced by soil bacterium *Bacillus megaterium*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70, 5522-5535.
- Liu, H.L., Chiu, C.W., and Cheng, Y.C., 2003. The Effects of Metabolites From the Indigenous *Acidithiobacillus thiooxidans* and Temperature on the Bioleaching of Cadmium From Soil. Wiley Periodicals, Inc., 638-645.
- Liu, Y.G., Zhou, M., Zeng, G.M., Wang, X., Li, X., Fan, T., Xu, W.H., 2008. Bioleaching of heavy metals from mine tailings by indigenous sulfur-oxidizing bacteria: Effects of substrate concentration. *Bioresource Technology*, 99(10), 4124-4129.
- Louboudy, S.S., Bayoumi, R.A., El-Sahrawey, M.H., and Abd-El-Baseer, M.A., 2007. Isolation, Purification, Characterization and Physiological Behavior of Drinking Water-Borne Pathogenic Bacteria. *N. Egypt. J. Microbiol.*, 17, 105-120.
- Lüttge A., Conrad G. P., 2004. Direct Observation of Microbial Inhibition of Calcite Dissolution. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (3), 1627-1632.
- Madigan, M., T., Martinko, J., M., 2010. *Brock Biology of Microorganisms*. Southern Illinois University Carbondale, 992p.
- Madrid, V.M., Taylor, G.T., Scranton, M.I., and Chistoserdov, A.Y., 2001. Phylogenetic Diversity of Bacterial and Archaeal Communities in the Anoxic Zone of the Cariaco Basin. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1663-1674.
- Maynaud, G., Willems, A., Soussou, S., Vidal, C., Maure, L., Moulin, L., Cleyet-Marel, J.C., Brunel, B., 2012. Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating *Anthyllis vulneraria* in mine tailings, and proposal of *Aminobacter anthyllidis* sp. nov., the first definition of *Aminobacter* as legume-nodulating bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 35, 65– 72.
- Mesci, K. A., Sevim F., 2006. Dissolution of magnesia in aqueous carbon dioxide by ultrasound. *International Journal of Mineral Processing*, 79(2), 83-88.
- MIS, 2005. *MIS Operating Manual*. 125 Sandy Dr. Newark, DE.
- Mishra, A.K., Mahapatra, S.S.R., Roy, P., Mohanty, B.K., Majumdar, S. and Ray, P.K., 1986. Bioleaching of Silica From Magnesite Ore. *Indian Journal of Technology*, 24(12), 770-772.
- Miller, I., and Berger, T., 1985. Bacteria identification by gas chromatography of whole cell fatty acids. *Hewlett-Packard Gas Chromatography Application Note*, Hewlett-Packard Co., Alto, CA., 228-238.
- Mohanty, B.K., and Mishra, A.K., 1993. Scanning Electron Micrograph Study of *Bacillus Licheniformis* During Bioleaching of Silica From Magnesite Ore. *Journal of Applied Bacteriology*, 74(3), 284-289.
- Mosivand, M., Rahimian, H. and Shams-Bakhsh, M., 2009. Phenotypic and genotypic relatedness among *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains isolates from strains isolates from sugarcane, stone fruits and wheat. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 45 (1), 75-85.
- 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.
- Onstott, T.C., Moser, D.P., Pfiffner, S.M., Fredrickson, J.K., Brockman, F.J., Phelps, T.J., White, D.C., Peacock, A., Balkwill, D., Hoover, R., Krumholz, L.R., Borscik, M., Kieft, T.L., and Wilson, R., 2003. Indigenous and contaminant microbes in ultradeep Mines. *Environmental Microbiology*, 5(11), 1168–1191.
- Önal, G., 2004. “Ülke Kalkınmasında Madencilikğin Önemi”, Park Grup Çalışma Raporu. Ankara.
- Özerol, İ.H., 1997. İnfeksiyon Hastalıklarının Tanısında Kullanılan DNA Probları ve Nükleik Asit Çoğaltma (Amplifikasyon) Yöntemleri. *Journal of Turgut Özal Medical Center*, 4(3), 329-344.
- Özkan, H., 2009. Erzurum Çevresinde Biyolojik Bozulmaya Neden Olan Heterotrofik Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Tanısı. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Özkök, M.A., 2005. Stratejik Hammaddeler Ve Türkiye. Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Gebze.
- Pathak, A., Dastidar, M.G., Sreekrishnan, T.R., 2009. Bioleaching of heavy metals from sewage sludge: A review. *Journal of Environmental Management*, 90, 2343-2353.
- Pepi, M., Heipieper, H.J., Fischer, J., Marcella Ruta, M., Margherita Volterrani, M., and Focardi, S.E., 2008. Membrane fatty acids adaptive profile in the simultaneous presence of arsenic and toluene in *Bacillus* sp. ORAs2 and *Pseudomonas* sp. ORAs5 strains. *Extremophiles*, 12, 343–349.
- Perry, T.D., Duckworth, I.V., McNamara, O.W., Martin, C.J., Mitchell, S.T.R., 2004. Effects of the biologically produced polymer alginic acid on microscopic calcite dissolution rates. *Environ. Sci. Technol.* 38, 3040–3046.
- Rademaker, J. L. W., and F. J. de Bruijn. 1997. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. DNA markers: protocols, applications and overviews. *In* G. Caetano-Anolle's and P. M. Gresshoff (ed.), John Wiley and Sons, Inc., New York, N.Y., 151-171.
- Raschman, P., Spakova, M., Fedorockova, A., 2010. Effect of hydrochloric acid concentration on the selectivity of leaching of high-calcium dead-burned magnesite. *Acta Montanistica Slovaca Rocnik*, 15(3), 232-237.
- Rawlings, D.E., and Simon-Silver, S., 1995. Mining with Microbes *Nature Biotechnology*, 13, 773 – 778.
- Rittie, L., and Perbal B., 2008. Enzymes used in molecular biology: a useful guide. *J. Cell Commun, Signal*, 2, 25–45.
- Rodrigues, D.F., Goris, J., Vishnivetskaya, T., Gilichinsky, D., Thomashow, M.F., Tiedje, J.M., 2006. Characterization of *Exiguobacterium* isolates from the Siberian permafrost. Description of *Exiguobacterium sibiricum* sp. nov. *Extremophiles*, 10, 285–294.
- 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.
- Sasser, M., 2001. Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids. MIDI Technical Note, 508, 1-6.

- Saygılı, H., Sahin, F. ve Aysan Y., 2006. Fitobakteriyoloji, Meta Basım Matbaacılık, İzmir, Türkiye, pp 550.
- Satarayana, T., Raghukumar, C. and Shivaji, S., 2005. Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current Science*, 89(1), 78-90.
- Seget-Piotrowska, Z., and Mrozik, A., 2003. Signature Lipid Biomarker (SLB) Analysis in Determining Changes in Community Structure of Soil Microorganisms. *Polish Journal of Environmental Studies*, 12(6), 669-675.
- Sertkaya, G., 2007. Kolemanit Atıklardan Biyoliç Yöntemi İle Borik Asit Eldesi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Üniversitesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Adana.
- Sezgin, A., 2007. 16S rDNA Analysis Of Microbial Communities In Anoxic Marine Sediments Of The Marmara Sea. Master of Science, Bogaziçi University, Environmental Sciences, İstanbul.
- Schippers, A., Breuker, A., Blazejak, A., Bosecker, K., Kock, D., Wright, T.L., 2010. The biogeochemistry and microbiology of sulfidic mine waste and bioleaching dumps and heaps, and novel Fe(II)-oxidizing bacteria. *Hydrometallurgy*, 104(3-4), 342-350.
- Schlegel, H.G., 1985. *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany. Sixth Edition pp. 587.
- Sever, E., 2006. İskenderun Demir Çelik Fabrikası Atıklarına Biyoliç Uygulaması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, Türkiye.
- Sha-Sha, F., Pei-Jun, L., FENG Qian, F., Xiao-Jun, L., Peng, L., Yue- Bing, S., and Yang, C., 2011. Soil Quality Degradation in a Magnesite Mining Area. *Pedosphere*, 21(1), 98-106.
- Siala, M., Gdoura, R., Fourati, H., Rih, M., Jaulhac, B., Younes, M., Sibilja, J., Baklouti, S., Bargaoui, N., Sellami, S., 2009. Broad-range PCR, cloning and sequencing of the full 16S rRNA gene for detection of bacterial DNA in synovial fluid samples of Tunisian patients with reactive and undifferentiated arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 11(4), 102.
- Slepecky, R.A. and Hemphill, H.E., 2006. The Genus *Bacillus*—Nonmedical. Dworkin, M. (Editor-in-Chief), *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria*. Third Edition. Springer Science, 4, 530-562, New York, USA.
- Smith, K.S., and Ferry, J.G., 2000. Prokaryotic carbonic anhydrases. *FEMS Microbiological Reviews* 24, 335-366.
- Supuran, C. T., Scozzafava, A., Casini, A., 2003. "Carbonic Anhydrase Inhibitors". *Medicinal Research Reviews*, 23(2), 146-189.
- Şahin, F., 1999. Mikroorganizmaların yağ asitleri profillerine göre tanısı (Microbial Identification System). Uygulamalı Moleküler Biyoloji Teknikleri Kursu. Atatürk Üniversitesi Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, 66, Erzurum, Türkiye.
- Şahin, F., 2000. Moleküler Teknikler Kullanılarak mikroorganizmaların Tanı ve Teşhisi. II. Uygulamalı Moleküler Biyoloji Teknikleri Kursu. Atatürk Üniversitesi Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, 70, Erzurum-Türkiye.
- TBMM Araştırma Komisyonu Raporu., 2010. Madencilik Sektöründe Sorunların Araştırılarak Alınması Gereken Önlemlerin Belirlenmesi, Ankara, 781 s.

- Tejerina, A., Tarta, R., and MacDougald, A., 2008. Mining In Turkey. Engineering & Mining Journal, 61-85.
- Temiz, A., 2000. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatipoğlu Yayınevi, Ankara.
- TMMOB Maden Mühendisleri Odası, Madencilik Sektörü Ve Politikaları Raporu., 2011. "Doğal Kaynakların Gerçek Sahibi Halktır", 47s.
- Topak, Y., 2006. Yukarıtirtar-Aşağıtirtar Köyleri (Isparta Kuzeydoğusu) Arasında Gözlenen Manyezit Yatağının Oluşumu Ve Kökeni, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi. Adana, 117s.
- Torun, M., ve Avşaroğlu, N., 2008. Dünya Madenciliğinin Son On Yılında (1998-2008) Metal Fiyatlarındaki Değişmeler ve Nedenleri. <http://www.belgeler.com>, (15.07.2012).
- Trüper, H., G., and Schleifer, K-H., 2006. The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria. Third Edition. Springer Science, 7000 p (7-volume-set), New York, USA.
- 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.
- Türkyılmaz, S., ve Esendal, M.Ö., 2002. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Mikrobiyolojide Kullanım Alanları. Kafkas Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 8(1), 71-76.
- Urzi C, Lisi S, Criseo G, Penrice A. 1991. Adhesion to and decomposition of marble by a *Micrococcus* strain isolated from it. Geomicrobiology J, 9, 81–90.
- Volbers, A.N.A., and Henrich, R., 2002. Present water mass calcium carbonate corrosiveness in the eastern South Atlantic inferred from ultrastructural breakdown of *Globigerina bulloides* in surface sediments. Marine Geology, 186, 471-486.
- Weatherstone, N., 2008. Standards for reporting of mineral resources and reserves status, Outlook and Important Issues. 21st World Mining Congress & Expo, Krakow.
- Wieser, M.,and Busse, H.J., 2000. Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50, 1087–1093.
- Yıldız, R., ve Erdoğan, N., 1995, Manyezit ve Bazik Refrakter Malzeme Teknolojisi, Kütahya.
- Zaihua, L., 2001. Role of Carbonic Anhydrase as an Activator in Carbonate Rock Dissolution and Its Implication for Atmospheric CO₂ Sink. Acta Geologica Sinica, 75(3), 275-278.
- Zhang, R.B., Wei, M.M., Ji, H.G., Che, X.H., Qiu, G.Z., Zhou, H.B., 2009. Application of real-time PCR to monitor population dynamics of defined mixed cultures of moderate thermophiles involved in bioleaching of chalcopyrite. Applied Microbiology and Biotechnology, 81(6), 1161-1168.
- Zhang, W., Huang, Z., He, L., and Sheng X., 2012. Assessment of bacterial communities and characterization of lead-resistant bacteria in the rhizosphere soils of metal-tolerant *Chenopodium ambrosioides* grown on lead–zinc mine tailings. Chemosphere, 87, 1171–1177.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Sivas'ta doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Antalya'da tamamladı. 2004 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden 2009 yılında mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine ve daha sonra 2011 yılında, aynı üniversite ve enstitünün Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.