

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN *BACILLUS* TÜRLERİNİN
BİYOKALSİFİKASYON ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Hazırlayan
Fatma EROĞLU**

**Danışman
Doç. Dr. Fatma ÖZTÜRK KÜP**

Yüksek Lisans Tezi

**Haziran 2016
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN *BACILLUS* TÜRLERİNİN
BİYOKALSİFİKASYON ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

**Hazırlayan
Fatma EROĞLU**

**Danışman
Doç. Dr. Fatma ÖZTÜRK KÜP**

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
FLY 2014-5560 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Haziran 2016
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

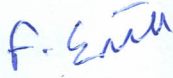
Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

F. Eroğlu

Fatma EROĞLU

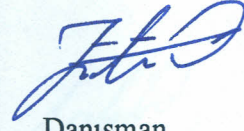
YÖNERGEYE UYGUNLUK

“Topraktan İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Biyokalsifikasyon Özelliklerinin Belirlenmesi ” adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.



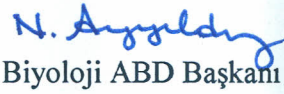
Tezi Hazırlayan

Fatma EROĞLU



Danışman

Doç. Dr. Fatma ÖZTÜRK KÜP



Biyoloji ABD Başkanı

Prof. Dr. Nusret AYYILDIZ

Doç. Dr. Fatma ÖZTÜRK KÜP danışmanlığında **Fatma EROĞLU** tarafından hazırlanan “**Toprakta İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Biyokalsifikasyon Özelliklerinin Belirlenmesi**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

08.06.2016

JÜRİ:

Başkan : Doç. Dr. Fatih DUMAN

Üye : Doç. Dr. Zeliha LEBLEBİCİ

Üye : Doç. Dr. Fatma ÖZTÜRK KÜP

Fatih Duman
Zeliha Leblebici
Fatma Öztürk Küp

ONAY:

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulunun 21/06/2016 tarih ve 2016/28-18.. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

21/06/2016

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Mehmet AKKURT Y.

M. T. Sencel

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca farklı bakış açıları ve bilimsel katkılarıyla beni aydınlatan, yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve bu günlere gelmemde en büyük katkı sahibi sayın hocam Doç. Dr. FATMA ÖZTÜRK KÜP'e teşekkürü bir borç bilirim.

Deneysel çalışmalarım sırasında karşılaştığım zorlukları aşmamda yardımlarından dolayı Arş. Gör. Mithat GÜLLÜ' ye teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasına maddi destek veren Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: FLY 2014-5560) teşekkür ederim.

Ayrıca; çalışmalarım süresince sabır göstererek beni daima destekleyen aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Fatma EROĞLU

Kayseri 2016

TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN *BACILLUS* TÜRLERİNİN BİYOKALSİFİKASYON ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Fatma EROĞLU

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi, Haziran 2016

Danışman: Doç. Dr. Fatma ÖZTÜRK KÜP

ÖZET

Çalışmada üreaz aktivitesine sahip *Bacillus* türlerinin topraktan izolasyonu, morfolojik ve moleküler tanımlanmaları ve kireç biriktirme (biyokalsifikasyon) özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. İnşaat alanlarından alınan toprak ve çimento örneklerinden *Bacillus* ve *Staphylococcus* türlerine ait toplam 14 bakteri izole edilmiştir. İzolatların tanımlanması 16S rRNA dizi analizi ile yapılmıştır. Yapılan tanımlama sonucuna göre 3 izolatın *Staphylococcus pasteurii*, 11 izolatın ise *Bacillus* cinsine ait olduğu belirlenmiştir. İzolatların üreaz aktiviteleri fenol-hipoklorid metoduna göre gerçekleştirilmiştir. CaCO₃ birikimi katı ve sıvı besiyerinde belirlenmiştir. CaCO₃ kristalleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir.

Bacillus ve *Staphylococcus* türlerine ait izolatların üreaz enzim aktiviteleri kontrol grubu *Sporosarcina pasteurii* karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda F1, F2 ve F3 olarak kodlanan *Staphylococcus pasteurii* türlerinin spesifik üreaz aktivitesi sırasıyla 9,2848 ±0,00, 9,0933±0,00 ve 9,0859 U/mg olarak tespit edilmiştir. *Bacillus* cinsine ait olan türler arasında en yüksek aktiviteye sahip olan tür 8,50999±0,00 U/mg değeri ile F10 (*Bacillus mycoides*) izolatı olarak belirlenmiştir. *Bacillus* türleri içerisinde en düşük spesifik aktiviteye sahip olan bakterinin ise 2,7510±0,04 U/mg değeri ile F14 (*Bacillus thuringiensis*) izolatı olduğu tespit edilmiştir. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri sonucunda izolatların kalsit birikimi gerçekleştirdiği gözlemlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Biyokalsifikasyon, *Bacillus*, 16S rRNA, üreaz aktivitesi

DETERMINATION OF BIOCALCIFICATION FEATURES OF *BACILLUS* SPECIES ISOLATED FROM SOIL

Fatma EROĞLU

Erciyes University, School of Natural and Applied Sciences

M. Sc. Thesis, June 2016

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Fatma ÖZTÜRK KÜP

ABSTRACT

This study aimed to determine isolation of *Bacillus* species having urease activity from soil, morphological and molecular identification and on lime deposition (biocalcification) features.

Total 14 bacteria belong to *Bacillus* and *Staphylococcus* species were isolated samples of soil and cement from construction sites. Identification of the isolates was carried out with 16S rRNA sequencing analysis. According to the identification results were identified as 3 strains *Staphylococcus pasteurii* and 11 strains belong to the genus *Bacillus*. Urease activity of the isolates was carried out according to the phenol-hypochlorite method. CaCO₃ accumulation was determined in solid and liquid media. CaCO₃ crystals were analyzed in the scanning electron microscope (SEM).

Urease enzyme activity of the isolates were compared to with control group *Sporosarcina pasteurii*. According to results, specific urease activity of F1, F2 and F3 were detected as 9,2848±0,00, 9,0933±0,00 ve 9,0859±0,04 U/mg respectively. F10 (*Bacillus mycoides*) was determined as species having the highest activity among the species belonging to the genus *Bacillus* with specific urease activity 8,50999±0,00 U/mg. The bacterium having the lowest specific activity was determined F14 (*Bacillus thuringiensis*) with specific urease activity 2,7510±0,04 U/mg value. Result images of scanning electron microscope (SEM) was observed that the accumulation calcite of isolates.

Key Words: Biocalcification, *Bacillus*, 16S rRNA, urease activity

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
GİRİŞ	1
1. BÖLÜM	
GENEL BİLGİLER	
1.1 <i>Bacillus</i> Cinsi	3
1.2 Biyominerilizasyon ve Biyoçimentasyon	5
1.2.1 Mikrobiyolojik Olarak Uyarılan Kalsiyum karbonat birikimi (MICP).....	6
1.2.2 Biyoçimento Oluşumu İçin Uygun Olan Mikroorganizmalar	6
1.3. Biyoçimentolaşma Mekanizması.....	9
1.3.1.Üre Hidrolizi İle Mikrobiyolojik Kaynaklı Kalsiyum Karbonat Çökmesi....	9
1.3.1.1.Biyoçimentolaşma İçin CaCO₃ Çökmesini Düzenleyen Temel Parametreler	10
1.3.1.2. Üreaz Kaynağı	11
1.3.2.Biyoçimento Oluşum Mekanizması	12
1.4. LİTERATÜR ÖZETİ	14
2. BÖLÜM	
GEREÇ VE YÖNTEM	
2.1 MATERYAL	20
2.1.1. Toprak örnekleri	20
2.1.2. Bakteri örnekleri	20
2.1.3. Besiyerleri	20

2.1.4. Çözeltiler	20
2.2. Metot.....	20
2.2.1. Toprak örneklerinin alınması	20
2.2.2. Bakterilerin izolasyonu	21
2.2.3. Bakterilerin Moleküler Tanımlanması	21
2.2.4. Üreaz Aktivitesinin Belirlenmesi:	22
2.2. 5. Biyokalsifikasyon Özelliklerinin Belirlenmesi.....	23
2 2.5. 1. Katı besiyerinde CaCO ₃ (Kalsiyum karbonat) birikiminin gözlenmesi	23
2 2.5.2. Sıvı besiyerinde CaCO ₃ (Kalsiyum karbonat) birikiminin gözlenmesi	23
2.2.6. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve Enerji Dağılımlı X Işını Analizi .	23

3. BÖLÜM BULGULAR

3.1. <i>Bacillus</i> İzolatlarının İzolasyonu	26
3.2. İzolatların Moleküler Tanımlanması	27
3.3. İzolatların Üreaz Aktivitesinin Belirlenmesi	55
3.4. İzolatların Biyokalsifikasyon Özelliklerinin Belirlenmesi.....	58
3.4.1. Katı besiyerinde Biyokalsifikasyonun belirlenmesi	58
3.4.2. Sıvı Besiyerinde Biyokalsifikasyonun Belirlenmesi	60
3.5. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analiz Sonuçları.....	63
3.6. Enerji Dağılımlı X-Işını Kırınımı (EDX) Analiz Sonuçları.....	70

4. BÖLÜM TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER	86
KAYNAKLAR	93
ÖZGEÇMİŞ.....	99

KISALTMALAR VE SİMGELER

<u>Sembol</u>	<u>Anlamı</u>
bp	Baz çifti
°C	Santigrad derece
gr	Gram
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
Mbp	Mega baz çifti
rpm	Devir sayısı
%	Yüzde
mM	Milimolar
M	Molar
N	Normal
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
L	Litre
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
EDX	Enerji Dağılımlı X-Işını Kırınımı
EPS	Hücre Dışı Polimerik Bileşikler
AFB	Anoksigenik Fototrofik Bakteri
MKÇ	Mikrobiyal Karbonat Çökeltimi
CBR	Kaliforniya Taşıma Oranı
ATCC	American Type Culture Collection
ERNAM	Erciyes Üniversitesi Nanoteknoloji Araştırma Merkezi

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.1. Biyoçimento oluşumuna katılan kemotrofik gruplar	7
Tablo 3.1. İzolatların üreaz aktivitesi, Gram boyama özellikleri ve izole edildikleri toprak örnekleri	26
Tablo 3.2. 16S rRNA dizi analizi ile tanımlanan izolatlar	28
Tablo 3.3. F1 izolatının <i>Staphylococcus pasteurii</i> ATCC 51129 (NR_024669.1) suşu ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları	28
Tablo 3.4. F2 izolatının <i>Staphylococcus pasteurii</i> ATCC 51129 (NR_114435.1) suşu ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları	30
Tablo 3.5. F3 izolatının <i>Staphylococcus pasteurii</i> ATCC 51129 (NR_024669.1) suşu ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları	32
Tablo 3.6. F4 izolatının <i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792 (NR_114581.1) suşu ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları	34
Tablo 3.7. F6 izolatının <i>Bacillus subtilis</i> JCM 1465 (NR_113265.1) suşu ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları	36
Tablo 3.8. F7 izolatının <i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792 (NR_114581.1) suşu ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları	38
Tablo 3.9. F8 izolatının <i>Bacillus macroides</i> LMG 18474 (NR_114920.1) suşu ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları	39
Tablo 3.10. F9 izolatının <i>Bacillus macroides</i> LMG 18474 (NR_114920.1) suşu ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları	41
Tablo 3.11. F10 izolatının <i>Bacillus mycoides</i> NBRC 101228 (NR_113990.1) suşu ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları	42
Tablo 3.12. F11 izolatının <i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792 (NR_114581.1) suşu ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları	44
Tablo 3.13. F12 izolatı <i>Bacillus macroides</i> LMG 18474 (NR_114920.1) suşu ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları	46
Tablo 3.14. F13 izolatı <i>Bacillus macroides</i> LMG 18474 (NR_114920.1) suşu ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları	47
Tablo 3.15. F14 izolatı <i>Bacillus thuringiensis</i> Bt407 (NR_102506.1) suşu ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları	49
Tablo 3.16. F15 izolatı <i>Bacillus mycoides</i> NBRC 101228 (NR_113990.1) suşu ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları	51

Tablo 3.17. İzolatları ait üreaz aktivitesi, protein miktarı ve spesifik aktivite değerleri	56
Tablo 3.18. Bakteriler tarafından oluşturulan zon çaplarının artışı	58
Tablo 3.19. İzolatlara ve kontrol şusuna ait sıvı besiyerinde biriken CaCO ₃ miktarları	61
Tablo 3.20. F1 izolatının EDX analizine göre element miktarları.....	71
Tablo 3.21. F2 izolatının EDX analizine göre element miktarları.....	72
Tablo 3.22. F3 izolatının EDX analizine göre element miktarları.....	73
Tablo 3.23. F4 izolatının EDX analizine göre element miktarları.....	74
Tablo 3.24. F6 izolatının EDX analizine göre element miktarları.....	75
Tablo 3.25. F7 izolatının EDX analizine göre element miktarları.....	76
Tablo 3.26. F8 izolatının EDX analizine göre element miktarları.....	77
Tablo 3.27. F9 izolatının EDX analizine göre element miktarları.....	78
Tablo 3.28. F10 izolatının EDX analizine göre element miktarları.....	79
Tablo 3.29. F11 izolatının EDX analizine göre element miktarları.....	80
Tablo 3.30. F12 izolatının EDX analizine göre element miktarları.....	81
Tablo 3.31. F13 izolatının EDX analizine göre element miktarları.....	82
Tablo 3.32. F14 izolatının EDX analizine göre element miktarları.....	83
Tablo 3.33. F15 izolatının EDX analizine göre element miktarları.....	84
Tablo 3.34. <i>S. pasteurii</i> bakterisinin EDX analizine göre element miktarları	85

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. <i>Bacillus</i> cinsine ait bakterilerin görüntüsü.....	3
Şekil 1.2. Üreaz tarafından ürenin hidrolizi	12
Şekil 1.3. Çimento oluşumu	12
Şekil 1.4. Yüksek Ca^{2+} iyonu konsantrasyonunda $CaCO_3$ birikiminde üreolitik bakterilerin rolünü gösteren şema	13
Şekil 1.5. Bakteri hücre duvarında $CaCO_3$ oluşumu.....	14
Şekil 3.1. İzolatlara ait 16S rRNA gen bölgesinin agaroz jel görüntüsü	27
Şekil 3.2. 16S rRNA gen bölgesine göre izolatlar ve Gen bankasındaki örnekler ile oluşturulan filogenetik ağaç	54
Şekil 3.3. NH_3 standart grafiği	55
Şekil 3.4 Bradford yöntemine göre protein standart grafiği	56
Şekil 3.5. Üre seçici besiyerinde bakterilerin görüntüsü.....	57
Şekil 3.6. Bakteriler tarafından oluşturulan zon çapları.....	59
Şekil 3.7. Bazı izolatlara ve kontrol şuşuna ait sıvı besiyerinde $CaCO_3$ birikimi.....	62
Şekil 3.8. F1 izolatının elektron mikroskop görüntüsü	63
Şekil 3.9. F2 izolatının elektron mikroskop görüntüsü	64
Şekil 3.10. F3 izolatının elektron mikroskop görüntüsü	64
Şekil 3.11. F4 izolatının elektron mikroskop görüntüsü	65
Şekil 3.12. F6 izolatının elektron mikroskop görüntüsü	65
Şekil 3.13. F7 izolatının elektron mikroskop görüntüsü	66
Şekil 3.14. F8 izolatının elektron mikroskop görüntüsü	66
Şekil 3.15. F9 izolatının elektron mikroskop görüntüsü	67
Şekil 3.16. F11 izolatının elektron mikroskop görüntüsü	67
Şekil 3.17. F12 izolatının elektron mikroskop görüntüsü	68
Şekil 3.18. F13 izolatının elektron mikroskop görüntüsü	68
Şekil 3.19. F14 izolatının elektron mikroskop görüntüsü	69
Şekil 3.20. F15 izolatının elektron mikroskop görüntüsü	69
Şekil 3.21. <i>S. pasteurii</i> nin elektron mikroskop görüntüsü	70
Şekil 3.22. F1 izolatının EDX analiz grafiği.....	71
Şekil 3.23. F2 izolatının EDX analiz grafiği.....	72
Şekil 3.24. F3 izolatının EDX analiz grafiği.....	73
Şekil 3.25. F4 izolatının EDX analiz grafiği.....	74

Şekil 3.26. F6 izolatının EDX analiz grafiği.....	75
Şekil 3.27. F7 izolatının EDX analiz grafiği.....	76
Şekil 3.28. F8 izolatının EDX analiz grafiği.....	77
Şekil 3.29. F9 izolatının EDX analiz grafiği.....	78
Şekil 3.31. F11 izolatının EDX analiz grafiği.....	80
Şekil 3.32. F12 izolatının EDX analiz grafiği.....	81
Şekil 3.33. F13 izolatının EDX analiz grafiği.....	82
Şekil 3.34. F14 izolatının EDX analiz grafiği.....	83
Şekil 3.35. F15 izolatının EDX analiz grafiği.....	84
Şekil 3.36. <i>S. pasteurii</i> bakterisinin EDX analiz grafiği.....	85

GİRİŞ

Mikrobiyal çimento üretim teknolojisi doğal kumtaşı oluşumunu taklit eden bir proses olup, uygun mikroorganizma ve ortam seçimi ile istenen yüzeylerde kalsit oluşumu prensibine dayanmaktadır. Mikroorganizma ortamda bulunan partikülleri birleştirici bir mekanizmayla kalsit oluşumunu gerçekleştirmekte ve sentetik çimentodan daha güçlü bir yapı oluşturmaktadır [1]. Biyokalsifikasyon, özellikle üreaz aktivitesine sahip organizmalar tarafından toprakta ya da içyapılarda gerçekleştirilen kireç birikimi olarak bilinen işlemdir. Mikroorganizmaların metabolik prosesleri sayesinde karbonat birikimine sebep olarak ve kalsiyum varlığında karbonat ile birleşerek, kalsiyum karbonat şeklinde çökeltmesiyle gerçekleşmektedir [2] ve toprak mikroorganizmalarının büyük bir kısmı bu olaya katkıda bulunmaktadır [3].

Mikrobiyal kalsit birikimini gerçekleştiren (i) CO₂'i indirgeyen siyanobakteri ve algler gibi fotosentetik organizmalar, (ii) sülfatı indirgeyen bakteriler, (iii) azot döngüsünde etkili ürenin hidrolizi ile ilgili çeşitli organizmalar olmak üzere 3 ana grup organizma vardır [4,5,6].

Mikrobiyal kalsit birikimi üre hidrolizi, fotosentez ve sülfat indirgenmesi gibi mikrobiyal metabolik olayların bir yan ürünü olarak oluşur. Bu farklı metabolik olaylar ortam bazikliğini (pH ve çözünmemiş inorganik karbon miktarı) artırır ve bazı negatif yüklü gruplar ve hücre duvar yapısının özel fonksiyonel grupları iki değerlikli iyonların (Ca⁺² ve Mg⁺²) bağlanmasını kolaylaştırır. Böylece mikroorganizmalar kristal çekirdeklenme bölgesi oluştururlar ve kalsiyum karbonatı çökeltmesi için uygun hale getirirler [7].

Tiyol bakımından zengin olan üreaz enzimi (EC 3.5.1.5) ürenin hidrolizini katalizleyen bir enzimdir. Bu enzim bitkilerde, alglerde, funguslarda ve bakterilerde bulunmaktadır [8].

Bacillus cinsi bakteriler, antibiyotik, enzim ve toksin üretimi gibi metabolik özellikleri ile endüstriyel öneme sahip olmaları ve kolay üretilebilmeleri sebebiyle dikkat çeken mikroorganizmalardır [9,10]. Ayrıca, sporlanma kabiliyetleri ve metabolizma faaliyetlerinin çeşitliliği, geniş bir çevreye yayılmalarında önemli avantajlar sağlamaktadır [10].

Bacillus cinsinin bazı türleri yapılarında kalsiyum karbonat biriktirebilir ve üreyi karbondioksit ve amonyağa dönüştürebilirler. Özellikle önceden *Bacillus pasteurii* olarak isimlendirilen *Sporosarcina pasteurii* kalsiyum karbonat çökmesine neden olan bir toprak bakterisidir. *Bacillus pasteurii* hücre kuru ağırlığının % 1'i civarında hücre içi üreaz enzimi üretir [11]. *Bacillus pasteurii* dışında *Bacillus sphaericus* ve *Bacillus lentus*'un da biyokalsifikasyon özelliğine sahip olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir [12].

Kalsifiye edici özelliğe sahip bakteriler tarafından kalsit kristallerinin biyolojik ortamda üretiminin bozulan kalkerli anıtların restorasyonu ve yapılardaki açıklıkların ve çatlaklıkların iyileştirilmesi için büyük bir değeri vardır. Çatlak ve yarıkların onarılmasında bu bakterilerin önemine rağmen çok az sayıda bakteri bu konuda çalışılmıştır [13].

Bu çalışmada, farklı topraklardan alınan örneklerden izole edilen *Bacillus* türlerinin morfolojik ve moleküler yöntemlere göre tanımlamaları yapılarak üreaz aktivitelerinin ve biyokalsifikasyon özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1 *Bacillus* Cinsi

Bacillus cinsi bakteriler, antibiyotik, enzim ve toksin üretimi gibi metabolik özellikleri ile endüstriyel öneme sahip olmaları ve kolay üretilibilmeleri nedeniyle dikkat çeken mikroorganizmalardır [9,10]

Bacillaceae ailesine ait olan *Bacillus* cinsi, çubuk şekilli, endospor oluşturan, aerob veya fakültatif anaerob bakterilerden oluşur. Vejetatif hücreler, tek başına veya zincir şeklinde bulunabilir. Yuvarlak veya köşeli şekilde olan hücrelerin büyüklükleri 0,5x1,2 µm' den 2,5x10 µm' ye değişmektedir. Hücreler, Gram-pozitif boyanır, ancak bazıları kültürün yaşına bağlı olarak Gram- negatif reaksiyon verebilirler [9,14].



Şekil 1.1. *Bacillus* cinsine ait bakterilerin görüntüsü [15].

Termofilik, mezofilik ve psikrofilik türleri bulunmaktadır. Çok yüksek ısı derecelerinde bile canlı kalabilirler. Genellikle 30- 40 °C' de ve pH 7 civarında ürerler.

Optimum büyüme sıcaklıkları 25 °C ile 37 °C’ de arasında değişmektedir. Ancak termofilik ve psikofilik türleri 75 °C’ den daha yüksek ve 3 °C’ den daha düşük sıcaklık derecelerinde büyüebilme yeteneğine sahiptirler. Bazı türleri 2 ile 10 arasında değişen alkali ve asidik ortamlarda gelişebilirler [15].

Bacillus türlerinin koloni özellikleri çevresel şartlara bağlı olarak değişmektedir. Besiyeri çeşidi, koloninin yaşı gibi özelliklere göre, yarı şeffaf, opak, düzgün ya da pürüzlü koloniler görülebilir. Koloni renkleri, kreme yakın beyazdan sarıya doğru olabilir. Çoğu *Bacillus* türü pigment oluşturmaz, ancak bazı türler farklı besi yerlerinde sarı, yeşil, mavi-siyah v.b pigmentler üretebilirler [9,14].

Genellikle aerobik koşullar altında ortamda gıda maddelerinin tam olarak sarf olmadığı veya gıda maddelerinin (mineral maddeler, üreme faktörleri, nitrojen, karbon ve enerji kaynakları) azaldığı ve çevresel koşulların değiştiği durumlarda olgun basiller içerisinde spor oluşmaktadır. Sporilizasyon işlemi bakteri üremesinin duraksama fazında gerçekleşmektedir. Sporlar genellikle oval veya yuvarlak şekilde olup, hücrenin çeşitli yerlerinde bulunabilirler. Normal fiziksel faktörlere (ısı, ışık, donma, kuruma, radyasyon, vs), kimyasal maddelere (dezenfektanlar, vs) ve mekanik tesirlere karşı vejetatif formlarından çok daha fazla dayanıklıdırlar [9,16].

Bacillus bakterilerinin hücrelerinde genelde sitoplazmik membran üzerinde bir veya birkaç aniyonik polimer ve birkaç peptidoglikan tabaka ile sarılmış hücre duvarı bulunmaktadır. Bazı *Bacillus* türleri hücre duvarından ayrı olarak ve hücre duvarının dışında jelatinöz, viskoz, elastik veya mukoid karakterde olan kapsül içermektedirler. *Bacillus anthracis*’de bulunan kapsül virülens etkiye sebep olmaktadır [9, 14, 16].

Ayrıca, bazı *Bacillus* türünde ince, uzun, dalgalı, fleksibilitesi fazla, sarmal yapıda ve hareketi sağlayan “flagellum” organeli bulunmaktadır. *B. anthracis*’de hiç flagellum bulunmazken *B. cereus* ve, *B. subtilis* bakterilerinde fazlaca flagellum bulunmaktadır [9, 14, 16].

Bacillus bakterileri karbon kaynağı olarak organik asit, şeker, alkol ve nitrojen kaynağı olarak amonyum içeren besiyerlerinde iyi gelişirler. Gelişimleri sıvı ve katı besiyerlerinin üst kısımlarında olmaktadır. Katı besiyerlerinde kenarları ve üzeri pürüzlü, granüller yapıda olan koloniler meydana getirirler [16,17].

Bacillus'lar özellikle spor oluşturdıkları için hemen her yerde örneğin toprak, toz, saman, gıda, su, deniz ve tatlı su sedimentleri, balık ve su ürünleri, inek gübresi, bitki rizosferi, bazı böceklerin larvaları ve bazı canlıların bağırsak sistemlerinden izole edilebilirler [9, 17, 18].

Bacillus türlerinin çeşitli besinlerde bulduklarında besin maddesinin dönüşümü ve bozulmasına sebep olmaktadır. *B. cereus* pastörize süt ve süt ürünlerinde kontaminant olan önemli bir türdür [19]. *Bacillus* cinsi bakteriler kolay üretilebilmeleri, endüstriyel öneme sahip olmaları (antibiyotik, enzim, toksin, biyoplastik gibi) ve patojeniteleri sebebiyle bakteriler dünyasında dikkat çeken ve üzerinde geniş çalışmaların yapıldığı mikroorganizmalar grubuna girer [9].

Bacillus bakterileri tarafından üretilen subtilisin, protez, amilaz gibi endüstriyel enzimler deterjan, besin, eczacılık gibi birçok endüstri alanında kullanılmaktadır [9,20].

Bulaşıcı hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin üretiminde de *Bacillus* bakterilerinden yararlanılmaktadır. Örneğin *B. polymyxa* polimiksini, *B. subtilis* subtilini ve *B. licheniformis* basitrasini üretmektedir. Ayrıca *Bacillus* bakterilerinin çeşitli böceklere karşı insektisit etkileri bulunmaktadır [9].

1.2 Biyominerilizasyon ve Biyoçimentasyon

Mikroorganizmalar toprak, su, gıda ve hayvan sindirim sisteminde yaşadıkları gibi kayalar, buzullar, kaplıcalar ve derin deniz bölgeleri gibi ekstrem ortamlarda da yaşayabilirler. Mikrobiyal habitatların geniş dağılımı populasyonlarda genetik varyasyon ve doğal seleksiyon yoluyla ortaya çıkan biyokimyasal ve metabolik özelliklerinin çeşitliliğini yansıtmaktadır [21].

Genom çalışmaları ile etkin olan mikrobiyal biyoteknoloji yeni endüstriyel katalitik ve fermantatif organizmaların ve tarımsal atıklar ile kirlenen suyun ve toprağın temizlenmesi için yeni mikrobiyal ajanların gelişmesine imkân sağlamaktadır. Mikrobiyal genomik ve mikrobiyal biyoteknoloji çalışmaları gıda güvenliği, insan beslenmesi ve fonksiyonel gıdalar, bitki ve hayvan koruma gibi konularda bilgiler sağlamaktadır. Çok sayıda farklı bakteri türleri toprak, jeolojik oluşumlar, tatlı su biyofilm tabakası, okyanuslar ve tuzlu göller dahil olmak üzere çeşitli doğal ortamlarda, mineral karbonat birikimine katılırlar. Son zamanlarda, beton zeminlerin özelliklerini

iyileştirmek için bazı özel mikroorganizmaların metabolik faaliyetlerinden kaynaklanan mikrobiyal mineral birikimi önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir. Yapılan çalışmalar ile zemini iyileştirecek yeni malzemelerin bulunması sağlanmıştır. Bakteriyel beton, betonda oluşan yarıklar ve çatlakları düzeltmek için kendi kendini onarmada kullanılan bir malzeme olarak karşımıza çıkmaktadır [21].

1.2.1 Mikrobiyolojik Olarak Uyarılan Kalsiyum karbonat birikimi (MICP)

Biyosferdeki bakteriler maddelerin konsantrasyonunu artıran jeokimyasal ajanlar olarak görev yapabilirler. Bu durum ilginin giderek arttığı bir araştırma alanı olan biyomineralizasyon olarak bilinen özel mineral oluşumunu indüklemektedir [22].

Biyomineralizasyon canlı organizmalar tarafından minerallerin çökeltilmesi işlemidir. Hem ökaryotik hemde prokaryotik organizmalar mineralleri depo ederler. Yapraklarda sitolit üreten bitkiler, kemikler, dişler ve kabukları oluşturan hayvanlar gibi ökaryotik organizmalar ve kalsitler, karbonatlar, fosfatlar, oksitler, sülfidler, silikatlar, gümüş ve altın gibi mineralleri biriktirme yeteneğine sahip olan bakteriler gibi prokaryotik organizmalar örnek olarak verilebilir [22].

Biyoçimento biyoçimentasyon olarak isimlendirilen biyoproses teknolojisinden gelişen yeni bir üründür. Biyoçimento kalsiyum iyonu açısından zengin bir ortamda mikroorganizma faaliyeti sonucunda oluşan CaCO_3 anlamına gelmektedir [6].

Mikrobiyal olarak uyarılan çökeltme işleminde kalsiyum karbonat mikroorganizmalar tarafından çökeltir. Burada karbonat, mikrobiyal üre hidrolizinden dolayı kalsiyum iyonları kalsiyum karbonat oluşturur ve fazlası çökeler [23].

Biyoçimento araştırmacılar tarafından mikrobiyel işlemlerin sonucunda partikül bağlayıcı maddelerin üretimi yoluyla toprak kayma direncinin artırılması ve esas olarak geçirgen bir toprak içindeki üreaz üreten mikroorganizmaların üre ile birlikte kalsiyum iyonlarını ürettiği esaslı yenilikçi bir teknoloji olarak tanımlanmaktadır [6].

1.2.2 Biyoçimento Oluşumu İçin Uygun Olan Mikroorganizmalar

Biyoçimento oluşturma potansiyeli olan farklı mikroorganizmalar bulunmaktadır. Bunlar arasında sülfatı indirgeyen bakteriler, üre hidrolizini sağlayan bakteriler ve demiri indirgeyen bakteriler yer almaktadır [24, 3, 25, 26].

Kemotrofik prokaryotlar tipik olarak 0,5 ile 2 µm büyüklükte olmaları, toprak içinde çoğalma yeteneğine sahip olmaları ve çok büyük fizyolojik çeşitlilik göstermeleri nedeniyle biyoçimento oluşumu için en uygun olan gruplardır. Tablo 1.1 de ekolojik köken olarak gruplandırılmış biyoçimento oluşumunda yer alan kemotrofik gruplar gösterilmektedir [24].

Tablo 1.1. Biyoçimento oluşumuna katılan kemotrofik gruplar [24].

Ekolojik kökeni	Oksijen ilgisi ve enerji üretim tipi			
	Anaerobik fermentasyon yapan prokaryotlar	Anaerobik solunum yapan prokaryotlar	Fakültatif anaerobik ve mikroaerofilik prokaryotlar	Aerobik solunum yapan prokaryotlar
Su kökenli prokaryotlar	Bacteroides Prevotella	Desulfobacter Geobacter Wolinella	Escherichia Shewanella Beggiatoa	Pseudomonas Acinetobacter Nitrosomonas
Karasal kökenli prokaryotlar	Clostridium Peptococcus Eubacterium	Desulfotomaculum Desulfitobacterium Bacillus infernus	Microthrix Nocardia Streptococcus	Bacillus Arthrobacter Streptomyces
Ekstrem ortam kaynaklı prokaryotlar (Arkealar)	Desulfurococs Thermosphaa Pyrodictium	Methanobacterium Thermococcus Haloarcula	Metallosphaera Acidianus Haloferox	Picrophilus Ferroplasma Sulfolobus

Arkealar çok ekstrem koşullarda yaşadıklarından inşaat alanı şartlarına uygun olmadıkları için biyoçimento oluşumu için uygun olmayan gruplardır. Anaerobik fermentasyon yapan bakteriler Ca, Mg ya da Fe iyonlarının varlığında toprak partiküllerinin çimentolaşmasında yer alabilir. Bu çimentolaşma üre ve atık proteinlerin

eklenmesiyle toprakta karbondioksitin üretimi ve amonifikasyondan kaynaklı pH artışı nedeniyle olabilmektedir [4, 27, 28, 5, 29].

Anaerobik bakteriler ekstraselüler polimerlerin sentezi ile toprak gözenekleri yapıştırılmaz çünkü fermentasyonda çok düşük verimlilikte biyolojik enerji ürettikleri için büyük miktarlarda çimento oluşumu gerçekleştiremezler [30].

Polisakkaritler ve monosakkaritlerden organik asit, hidrojen ve alkol üreten anaerobik fermentatif bakteriler anaerobik solunum yapan bakteriler için elektron vericisi olarak kullanılabilirler. Örneğin demir indirgeyen bakteriler, çözünmeyen Fe (III) bileşiklerini indirgeyerek çözülmüş Fe (II) iyonlarının üretimi için elektron vericisi olarak fermentasyon ürünlerini kullanır [31,32] demirin mikrobiyolojik olarak indirgenmesi atıksuların ve yeraltı sularının temizlenmesi için çevre biyoteknolojisinde kullanılır ve varsayımsal olarak da toprak çimentolanması içinde kullanılabilir [33, 34, 35, 36]. Biyotıkanma ve biyoçimentolamada kullanılacak anaerobik solunum yapan bakterilere bir diğer örnek sülfat indirgeyen bakterilerdir. Bu bakteriler elektron verici olarak organik asitleri, hidrojeni ya da alkolleri ve elektron alıcısı olarak ta sülfatı kullanarak hidrojen sülfür üretirler. Sülfid demir ve diğer metal katyonları ile reaksiyona girer çözülmeyen sülfid metalleri toprak partiküllerini birbirine bağlar ve toprak gözeneklerini tıkar. Ancak, sülfidler tarafından oluşturulan toprak sıkıştırılması stabil değildir çünkü aerobik koşullarda sülfatlar kimyasal ya da biyolojik olarak sülfürik asite okside edilebilmektedir [24].

Nitrat ve nitritin azota indirgenmesi prosesi olan denitrifikasyon işlemi biyoçimento üretimi için uygun değildir. Çünkü bakterilerin çok büyük hacimlerde azot üretmesi gerekecek ve elektron alıcı olarak çok fazla miktarda nitrata ihtiyaçları olacaktır. Bu durum toprak ıslah çalışmaları için maliyetli olacaktır. Fakültatif anaerobik bakterilerin çoğu biyoçimento oluşumu için uygun olan biyoajanlar olarak kabul edilebilir, çünkü birçok türü hücre agregat oluşumunu teşvik eden büyük miktarlarda ekzopolisakkaritler üretirler. Ayrıca hem oksijenli hemde oksijensiz ortamlarda gelişebilirler. Bu gruba *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Nocardioides*, *Myxococcus*, *Flexibacter*, *Cytophaga* ve *Caulobacter* cinsleri örnek verilebilir [37, 38, 39].

Aerobik toprak bakterileri toprak partiküllerini biyobağlanması, biyotıkanması ve biyoçimentasyonu için uygun olabilir. Çünkü birçok türü balçık form zincirleri ve filamentleri büyük miktarda üretir, pH değerini yükseltir ve farklı organik ve inorganik maddeleri okside eder.

Gram-pozitif bir grup bakteri olan aktinomisetes hücreleri bir şekilde partikülleri bağlayıcı misel ve toprakta balçık bağlama parçacıkları üretir [40, 41].

Bu bakteriler, aerobik toprak biyotıkanması ve biyoçimentasyonu için en muhtemel olan biyobağlayıcılardır. Her iki fakültatif, aerobik ve aerobik olmayan bakterilerin doğrudan dahil olduğu örneklere üre ilave edilerek toprakta amonifikasyon ve karbondioksit üretiminin neden olduğu pH artış nedeniyle Ca, Mg ya da Fe iyonları varlığında toprak partiküllerini bağlayabilirler [29].

Çözünmeyen karbonatlar ve metal hidroksitleri pH değerini yükseltir böylece toprak partiküllerinin birleştirilmesini ve toprak gözeneklerinin tıkanmasını sağlar. Toprağın üst tabakasında oksijenin varlığı nedeni ile oksijene karşı hassas olan anaerobik bakterilerin kullanımı zor olabilir. Toprak tıkanması veya çimentasyon için alternatif olarak kullanılan aerobik bakterilerde önemli bir teknolojik sorun toprak içerisindeki hava kaynağıdır.

Havalandırma ve difüzyon yoluyla toprağa karışan oksijen kaynağı oranı yeterli değilse anaerobik katman veya bölgeler oluşacaktır ve bu bölgelerde aerobik bakteriler aktif olmayacaktır. Bu nedenle teknolojik ve biyolojik açılardan toprak biyotıkanması ve biyoçimentasyonu için en uygun fizyolojik grup, aerobik ve anaerobik koşulların her ikisi altında aktif olan fakültatif anaerobik bakterilerdir [42].

1.3. Biyoçimentolama Mekanizması

Doğal olarak biyomineralizasyon işlemi kireçtaşı oluşumu, kumtaşı vb gibi jeolojik kat üzerinde çok yavaş bir hızda gerçekleşir. Biyobeton çok daha kısa bir zaman ölçeğinde elde edilir [27,2].

1.3.1. Üre Hidrolizi İle Mikrobiyolojik Kaynaklı Kalsiyum Karbonat Çökmesi

Üre, nitrojen içeren bileşiklerin parçalanması sonucu büyük miktarlarda oluşan bir üründür. 3.6 yıllık bir yarılanma ömrüne sahip olan üre kendiliğinden bozulabileceği

gibi nikel ihtiva eden üreaz (E.C. 3.5.1.5 aminohidrolaz üre) enzimi ile 1014 kat daha hızlı bir şekilde hidrolize olur. Ürenin hidrolizi sonucunda amonyak ve karbamat oluşur, daha sonra kendiliğinden katalizlenen ikinci bir reaksiyonla amonyak ve karbonata parçalanır [43].

Üre hidroliz yolu ile mikrobiyolojik kaynaklı kalsiyum karbonat çökmesinde üreaz enzimi üreyi katalize eder ve amonyumun varlığında karbonat iyonlarını çöktürür. Ortamda kalsiyum iyonlarının bulunması durumunda bu karbonat iyonları kolaylıkla CaCO_3 şeklinde çökerler. Üre hidrolizi kullanılan bakteriye bağlı olarak gerçekleşen metabolik olayın bir sonucu olarak gerçekleşir [44].

1.3.1.1. Biyoçimentolama İçin CaCO_3 Çökmesini Düzenleyen Temel Parametreler

(i) Kalsiyum Karbonat Konsantrasyonu

Kalsiyum ve karbonat konsantrasyonu bakteriler tarafından üretilen CaCO_3 'ün birikim oranı ve/veya inhibitör etkisi üzerine olumlu ya da olumsuz olabilir. Üre hidrolizi ile 1:1 M oranında karbonat iyonları üretilir. Bu nedenle artan üre ile, karbonat konsantrasyonları CaCO_3 doygunluğunu sağlamak için arttırılabilir.

(ii) Ortamın pH Değeri

Ortamın pH'sı bakteriler tarafından gerçekleştirilen CaCO_3 birikimi oranı üzerinde negatif ya da pozitif etkiye sahip olabilir.

(iii) Çekirdeklenme Bölgesinin Oluşumu

Çekirdeklenme bölgesinin oluşumu önemlidir. Çünkü özel bir bölgeden CaCO_3 birikimini başlatarak karbonatlaşmanın homojenliğini ve sağlamlığını yönetmektedir. Kullanılan mikroorganizmanın tipine bağlı olarak farklılık gösterebilir.

İlk iki faktör mikrobiyal CaCO_3 çökmede CaCO_3 birikimi için önemli iken, bakterilerin kendileri çekirdeklenme bölgeleri gibi davrandıkları için üçüncü faktör çok fazla önemli taşımamaktadır [45,46,6].

1.3.1.2. Üreaz Kaynağı

Üreazlar (E.C 3.5.1.5) amonyak ve karbon dioksitten üre hidrolize eden bitki, bakteri ve mantarlar içerisinde bulunan nikel bağımlı enzimlerdir. Bitki ve mantar tarafından üretilen üreazlar homodimerlerdir yaklaşık olarak 90 kDa alt biriminde heksamerleri vardır. Bakteriyel üreazlar ise iki ya da üç alt birimden oluşan bir yapıya sahiptir. Bitki ya da mantarlar tarafından üretilen üreaz monomerlerinin N-terminal ucu bakteriyel üreaz enzimin küçük alt birimine benzer (örneğin *S. pasteurii* üreazının β ve γ zincirleri) bitki ve mantar zincirlerinin C-terminal uç kısımları bakteriyel üreazların büyük alt birimleri ile benzerdir (örneğin *S. pasteurii* üreazının α zinciri).

Tüm üreazların yüksek sekans benzerliği, protein çeşitliliği, benzer üçüncül yapıları ve katalitik mekanizmaları muhtemelen aynı atalara sahip olabileceğini gösterir. Şimdiye kadar sadece bakteriyel üreazların (*Klebsiella aerogenes*, *S. pasteurii* ve *Helicobacter pylori*) 3D kristalografik yapısı başarıyla analiz edilmiştir [47].

Bazı bakteriyel üreazlar insan ve hayvan hastalıklarının patogeneğinde etkin bir rol oynar. Üreaz aktivitesi tek azot kaynağı olarak üre kullanımı için bakteriye imkân sağlar. *S. pasteurii* yüksek miktarda üreaz üreten geniş dağılıma sahip bir toprak bakterisidir. *S. pasteurii*'nin üreazı saflaştırılmış ve aktif merkezinde iki nikel iyonu taşıyan 3 zincirden (α , 61,4 kDa γ , 11,1 kDa, β , 14,0 kDa) oluşan heteropolimer ($\alpha\beta\gamma$) bir yapıya sahip olduğu belirlenmiştir. [48].

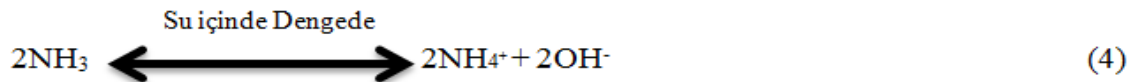
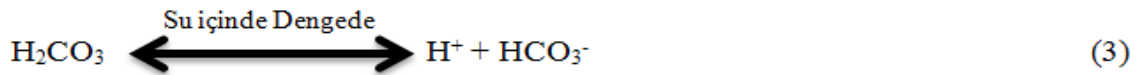
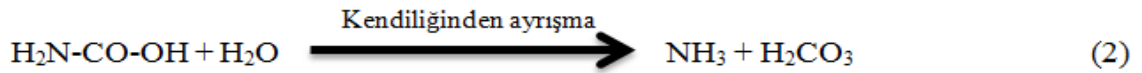
Üreaz üreten bakteriler amonyuma karşı üreaz yanıtına göre; üreaz aktivitesi baskılanmış (*Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus megaterium* and *Klebsiella aerogenes*) ve üreaz aktivitesi baskılanmamış (*Sporosarcina pasteurii*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Helicobacter pylori* ve *Ureplasma (Moclicutes)*) olmak üzere iki ayrı gruba ayrılabilir. *K. aerogenes*' de, hücre içinde amonyum varlığı fazla ürenin hidrolizini engelleyen glutaminin üretimine neden olur. Biyoçimento oluşumu sırasında yüksek konsantrasyonlarda üre hidrolize olduğundan dolayı amonyum kullanımı ile üreaz aktivitesi bastırılmamış mikroorganizmalar kullanılır [45].

1.3.2. Biyoçimento Oluşum Mekanizması

Biyoçimento oluşumu 4 aşamada gerçekleşmektedir (Şekil 1.1).

1- Ürenin hidrolizi (1, 2 ve 3): Üre hidrolizi karbonat iyonlarının 1:1 M oranında üretilmesiyle gerçekleşmektedir. Bu aşamada önemli parametre, çözülmüş inorganik karbon konsantrasyonunun miktarıdır [2].

2- Alkalikliğin artırılması (4) : Karbonat türleşmesi etkisi nedeniyle çevredeki pH değeri spesifik üreaz aktivitesinde önemli rol oynamaktadır. pH değerinin yaklaşık 9,3 değerine artırılması sonucu, $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ ve $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ arasında denge oluşuncaya kadar NH_4^+ 'ün NH_3 ' e ayrımını başlatır. Ortamdaki pH değeri karbonat oluşumunu ve CaCO_3 çökeltisini önemli derecede etkilemektedir [2]. (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Üreaz tarafından ürenin hidrolizi

3- Ca^{2+} iyonlarının yüzey absorpsiyonu (5 ve 6): Kalsiyum klorür formunda sağlanan Ca^{2+} bakteri hücre duvarına eklenirler [2]. (Şekil 1.3).



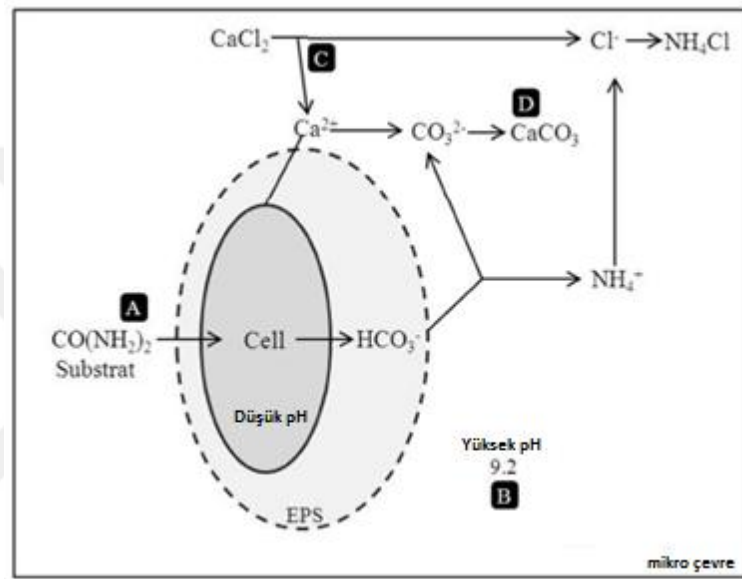
Şekil 1.3. Çimento oluşumu [2].

4- Çekirdekleşme ve kristal gelişimi (7) : Bu aşama 3 kısımda meydana gelir.

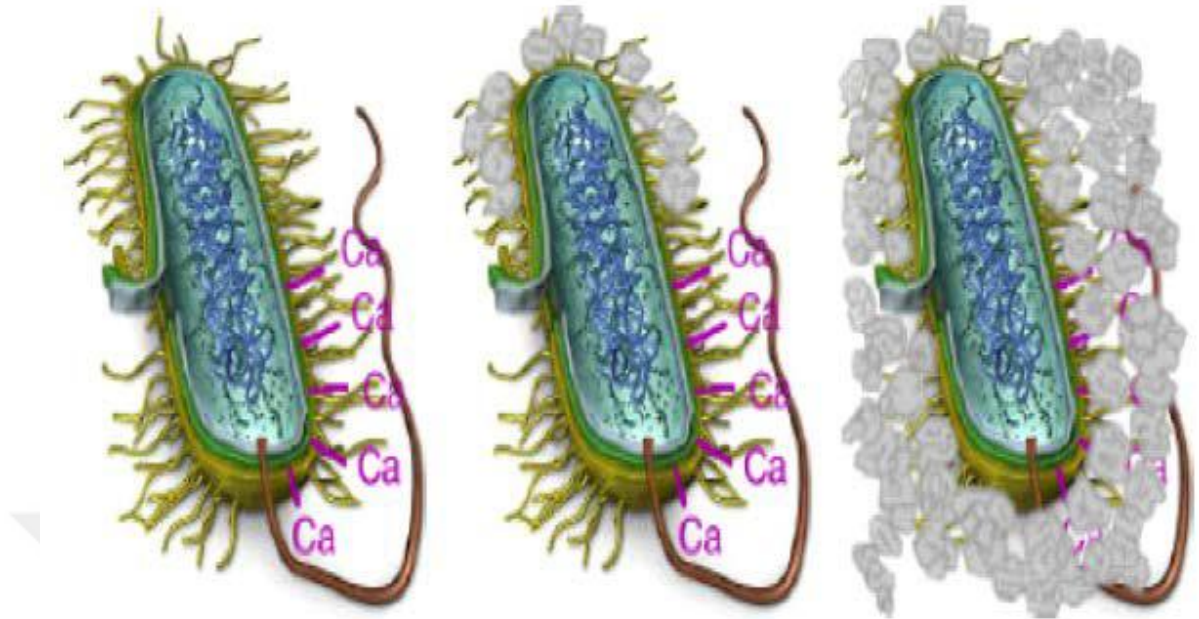
(I) Aşırı doymuş çözeltinin geliştirilmesi,

(II) Kritik doymuşluk noktasında çekirdekleşmenin (yeni kristallerin oluşumu) başlaması,

(III) Sabit çekirdeklerde spontane kristal gelişimi [2] (Şekil 1.3).



Şekil 1.4. Yüksek Ca^{2+} iyonu konsantrasyonunda CaCO_3 birikiminde üreolitik bakterilerin rolünü gösteren şema.(A) Ürenin hidrolizi (B) Alkaliliğin arttırılması (C) Ca^{2+} iyonlarının yüzey absorpsiyonu (D) Çekirdekleşme ve kristal gelişimi. EPS, üreolitik hücreleri çevreleyen EPS'nin bulunması halinde ilave-polisakkarit tabakasını ifade eder [23].



Şekil 1.5. Bakteri hücre duvarında CaCO_3 oluşumu [49].

Biyočimento üretiminde; *Helicobacter pylori*, *Unidentified gastric cocci*, *Sporosarcina pasteurii*, *Streptococcus salivarius*, *Recombinant E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersina enterocolitica* JB580 mikroorganizmaları kullanılmaktadırlar [45].

Bu mikroorganizmalar dışında *Bacillus spp*'nin bazı cinsleri içerdikleri üreaz enzimi nedeni ile biyočimento üretim potansiyeline sahip olabilmektedirler. Bu çalışma kapsamında topraktan izole edilen üreaz aktivitesine sahip olan *Bacillus* türlerinin tanımlanması aktivitelerinin belirlenmesi ve biyokalsifikasyon özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

1.4. LİTERATÜR ÖZETİ

Kalsiyum karbonat biyomineralizasyonu geçmişten günümüze ve gelecek zamanda atmosferde bulunan CO_2 seviyesini doğal olarak kontrol eden bir prosesi içermektedir. Bakteri içeren süspansiyonların çökelti denemeleri sırasında yapılan SEM analizleri sonucu yaşayan hücrelerin etrafında veya yüzeylerinde CaCO_3 varlığı tesbit edilmiştir.

Fransa’ da yapılan bir çalışmada, CaCO_3 çökeltimi oranının organik alt kültürde gelişen iki zıt zincirli anoksijenik fototropik bakteri tarafından (haloalkalifilik *Rhodovulum steppense* A-20s ve nötrofilik halofilik *Rhodovulum* sp.S17-65) uyarıldığı belirlenmiştir. Dünyanın başlangıcından itibaren, anoksijenik fototrofik bakteri (AFB)’ nin anoksijenik fotoheterotrofik metabolizması ile fototrofik siyanobakteriler ile karşılaştırıldığında, daha düşük etkili CaCO_3 oluşumunun görüldüğü belirtilmiştir [49].

Dupraz ve arkadaşlarının, (2009) yaptığı çalışmada, çeşitli mineralizasyon proseslerindeki bakterilerin spesifik rolleri ve hücre dışı polimerik bileşiklerin (EPS) matriksi incelenmiş, modern sucul (tatlı sular, denizler ve yüksek tuzlu sulardaki) ve karasal mikrobiyal örneklerinin etkileri tartışılmıştır. Bu çalışma sonucunda, mikrobiyal matların, jeolojik zamanlar boyunca biyosfer koşullarını etkilediği, karbonat çökmesinin ve tabakalanmış matların oluşumunun mikrobiyal yollarla meydana geldiği belirtilmiştir [51].

Belçika’da yapılan bir çalışmada farklı boyuttaki gözeneklere sahip harç örneğinin devamlılığına bakteriyel karbonat çökeltiminin etkisi araştırılmıştır. Yüzeyin CaCO_3 kristallerinin oluşturduğu çökeltimin, örneklerin gözeneklerinde bulunan suyun absorpsiyonunu %65-90 azalttığı belirlenmiştir. Bunun sonucu olarak karbonasyon oranı %25-30 oranında ve kloritin taşınmasında %10-40 oranında azaltılmıştır. Bu sonuçlar ışığında bakteriyel karbonat çökeltimi uygulamasının geleneksel yüzey uygulamalarıyla benzer özellik gösterdiği belirtilmiştir [52].

Siddique ve Chahal (2011), çok sayıdaki bakteri türlerinin toprak, jeolojik oluşumları, taze su biyofilmlerinde, okyanuslarda ve tuzlu göller gibi çeşitli doğal ortamlarda mineral karbonat çökmesini sağladığını belirtmişlerdir. Seçici mikrobiyal prosesler, CaCO_3 çökeltiminin metabolik aktiviteler sırasında kalsit formuna dönüştürmesi ile zarar görmüş yapıların ve tarihi eserlerin restorasyonunda yeni bir teknik olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmaya göre hemen hemen tüm bakterilerin CaCO_3 üretimini gerçekleştirdikleri hipotez edilmiştir. Çünkü çökeltim; fotosentez, sülfat redüksiyonu ve üre hidrolizi gibi metabolik proseslerin üretimi ile gerçekleşmektedir. Yapılan çalışmanın temel amacı kuvvet, permeabilite, su absorpsiyonu, klorit girişi, mikrobiyal mineral çökeltim benzeri özellikleri karşılaştırılmasıyla ümitvar bir tekniğin geliştirilmesi hedeflenmiştir [49].

Dejong et al. (2006) çalışmalarında, *B. pasteurii* ve kireç taşı kullanarak zemin özelliklerinin iyileştirilmesini amaçlamışlardır. Zemine üç farklı uygulama yapılmıştır. Zemine katkı kullanılmadan, *B. pasteurii* kullanılarak ve kireç taşı kullanarak uygulama yapılmış sonuçları analiz edilmiştir. Analizlerde kesme dalgası hızı, üç eksenli basınç dayanımı, SEM analizi ve X-Ray analizi kullanılmıştır. İyileştirmeye etki eden faktörleri, pH, oksijen miktarı, metabolik durum, mikrop konsantrasyonu, kalsiyum iyonları ve bunun yanı sıra aşılama sayısı olarak tanımlamışlardır. Kesme dalgası hızı analizinde kireç taşı ile iyileştirilmiş ve bakteri ile iyileştirilmiş zemin benzer sonuçlar göstermiştir. Bakteri ile iyileştirilmiş zeminde kesme kapasitesi, drenajsız kesme koşullarında artış göstermiştir. Uygulama yapılmamış zemin numunesi ile karşılaştırıldığında bakteri ile iyileştirilmiş zemin ve kireç taşı ile iyileştirilmiş zeminde başlangıç kesme bükülmesi ve yüksek elastiklik kapasitesinde artış gözlemlenmiştir. X-ray elektron mikroskobu ile inceleme yapıldığında bakteri ve kireç taşı ile iyileştirilmiş zeminlerin zemin-partikül yüzeylerinin yanı sıra partikül bağlantıları da gözlemlenmiştir. Mikroskopta kireç taşı ile iyileştirilmiş zeminde iyi biçimlendirilmiş, iğne şekilli bir kristal yapı gözlemlenmiş bakteri ile iyileştirilmiş zeminde ise küçük bir yapı ile birlikte daha pürüzlü doku gözlemlenmiştir. Sonuç olarak doğal biyolojik süreçlerin kontrolü ve çalışacak duruma getirilmesi yolu ile iyi bir çimentolama yapılarak gevşek kum yapılarının güçlendirilebileceği belirtilmiştir [53].

Chou vd. (2011) yaptığı araştırmada biyoçimentolamanın kum üzerindeki etkilerini tam karışımli biofilm reaktörler şeklinde çalışan kolonlarda incelemiş ve alınan örnekler Kaliforniya Taşıma Oranı (CBR) testine tabii tutulmuştur. Tam karışımli biyofilm reaktörünün içinde değişik koşullar (zeminin yoğunluğu, hücre tipleri (ölü, inaktif (resting),ve canlı hücreler), ve hücre konsantrasyonu) altında uniform kum, *S. pasteurii* (ATCC 11859) tarafından katalize edilmiş üre parçalanmasına dayanan mikrobiyal çimentolamaya maruz bırakılmıştır. Araştırma sonucunda mikrobiyal çimentolama sonucu özellikle yüksek bakteri konsantrasyonlarında, CBR değerleri yükselmiştir. En yüksek konsantrasyonda özellikle yoğun kum içeren kolonlara canlı hücre eklenmesini takiben CBR değerleri 2 ila 7 kat artmıştır. Taşıma gücündeki bu değişimlerle birlikte hidrolik iletkenlikte %90'ın üzerinde azalma meydana geldiği gözlemlenmiştir [54].

Hindistan' da yapılan bir diğer çalışmada; MKÇ (Mikrobiyal karbonat çökeltimi) olarak tanımlanan doğal olayın üreaz enziminin aktivitesine bağlı olarak meydana geldiğini

belirtilmiştir. Çok sayıdaki toprak mikroorganizmaları üreaz üretim yeteneğini göstermektedirler. Bu çalışmada özellikleri geliştirilmiş toprak bakterisi olan *B.pasteurii* NCIM 2477 kullanılmıştır. Karbonat iyonlarının çökeltimi sonucu olarak CaCO_3 meydana gelmesiyle birlikte, üreaz enzimi yolu ile CO_2 ve amonyak haline gelmesi için ürenin parçalanması gerekmektedir. Bu çalışmanın sonucunda, orjinal uygulamalara benzer örneklerin geliştirilmesi ile çeşitli üreaz aktivitesi gösteren mikroorganizmalar kullanılarak üreaz miktarını artırma ihtiyacının bulunduğu açıklanmıştır [55].

Ramachandran vd (2001), *B. pasteurii* adlı bakteriyi kullanarak betonda meydana gelen çatlakların kapatılabileceğini göstermişlerdir. Bu çalışmada *B. pasteurii* isimindeki bakteri tarafından neden olunan kalsit çökmesi iki çeşit portland çimento harcı numunesi üzerinde incelenmiş olup birisi, mikroorganizma karıştırılarak hazırlanmış ve diğerinde ise çatlaklar mikrobiyal karışımlarla doldurulmuştur. Bu çalışma için, *B. pasteruii* ATCC 11859 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, daha düşük miktarda canlı hücre içeren portland çimento harç kübünün basma dayanımında önemli miktarda artışlar olduğu gözlemlenmiştir. Bununla beraber, canlı veya ölü hücreler içeren küplerin basma mukavemetleri hücre miktarı ve kür süresi artarken azalmıştır. Bakteri ve kum ile doldurulmuş çatlaklar için basma dayanımı ve rijitlikte hücresiz küplerle kıyaslandığında önemli bir artış olduğunu göstermiştir. Alınan elektron mikroskop görüntüleri, mikrobiyal kalsit çökmesinin, özellikle çatlağın yüzeye yakın olan yerlerinde olduğunu belirlemiştir. Burada, hücrelerle görülen yoğun bir kalsit kristal oluşumu gözlemlendiği belirtilmiştir [56]. Kantzas ve diğ. (1992) *Bacillus pasteurii* kullanılarak yapılan kum konsolidasyonunda çimentolaşmanın oluştuğu alanda, gözenekliliğin %50 ve geçirgenliğinde %90'a kadar azaldığı belirlenmiştir [57].

Çatlakların mikrobiyal mineral çökeltmesi kullanılarak iyileştirilmesi tezi petrol endüstrisinde uygulanmaktadır. Mikroorganizmaların kaya gözeneklerini tıkamasının yalnızca küçük parçaların hareketiyle değil aynı zamanda mevcut yüzeye ekstraselüler organik bileşikler vasıtasıyla yapışarak da sağlandığı gözlemlenmiştir. Çalışma sonucunda ayrıca, mikrobiyolojik olarak sebep olunan kalsit çökmesinin çevreye herhangi bir zarar vermediği de vurgulanmıştır.

2. BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 MATERYAL

2.1.1. Toprak örnekleri

Bu çalışmada Kayseri'nin farklı yerlerinden (Yeni Mahalle'deki inşaat alanı ve Yeşil Mahalle'deki 2 farklı inşaat alanı Erkilet'teki 2 farklı tarla) alınan toprak ve çimento örnekleri kullanılmıştır.

2.1.2. Bakteri örnekleri

Çalışmada, 14'ü topraklardan ve 1'i kültür koleksiyonlarından temin edilen referans suşlar olmak üzere, toplam 15 adet *Bacillus* suşu kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan referans *Sporosarcina pasteurii* (DMS 33) suşu Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

2.1.3. Besiyerleri

Nutrient Sıvı (NB) Besiyeri (gr/lt) : Et Özütü 1,0 gr, Maya Özütü 2,0 gr, Pepton 5, 0 gr sodyum klorür (NaCl) 5,0 gr.

Nutrient Agar (NA) Besiyeri (gr/lt) : Et Özütü (beef extract) 1,0 gr, maya özütü (yeast ekstrakt) 2,0 gr, pepton 5,0 gr, sodyum klorür 5,0 gr, agar 15 gr.

Üre Agar Besiyeri: Üre 20,0 gr, Sodyum Klorid 5,0 gr, Monopotasyum Fosfat 2,0 gr, Jelatin Pepton 1,0 gr, Dekstroz 1,0 gr, Fenol kırmızısı 0,012 gr

Üre agar, Christensen tarafından enterik basillerin tespiti için katı bir besiyeri olarak geliştirilmiştir. Mikroorganizmalar, besiyeri içerisindeki üreyi kullandığında, inkübasyon sırasında, pembe-kırmızı bir renk meydana getirerek bu besiyeri reaksiyonunu bazik yapan amonyağı oluşturmaktadır. Bu nedenle, üreaz üretimi fenol kırmızısı göstergedeki değişim ile saptanabilmektedir.

Kalsit Presipitasyon Agar Besiyeri (g/l): Nutrient Broth 3,0 gr, Üre 20,0 gr, CaCl₂.2H₂O 28,5 gr, NaHCO₃ 2,12 gr, NH₄Cl 10,0 gr, Agar 15,0 gr

2.1.4. Çözeltiler

Kromozomal DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler

-*STE çözeltisi:* 10 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 1 mM EDTA (pH 8,0)

-*Lizozim Çözeltisi:* 10 mg/ml olacak şekilde Tris-EDTA tamponu içerisinde hazırlanmıştır.

-*Fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) çözeltisi:* 25 ml fenol, 24 ml kloroform ve 1 ml izoamilalkol karıştırılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti bir gece 4°C' de bekletildikten sonra kullanılmıştır.

-*Tris-EDTA tamponu (TE):* 10 mM Tris, 1 mM EDTA

Üreaz aktivitesi ve protein tayininde kullanılan çözeltiler

Üre çözeltisi: 10 ml distile suda 25,5 mg üre çözülerek hazırlanmaktadır

Fenol nitropurid: Reaktif A 25 ml distile suda 2,5 gr fenol çözülerek, reaktif B ise 25 ml distile suda 0,0125 gr Na-nitroprussid çözülerek hazırlanır ve 1:1 oranında karıştırılır.

Alkali hipoklorit çözeltisi: %5'lik (w/v) NaOH, 2gr NaOCl içeren kloraktan 2.9 ml alınarak 100 ml' ye distile su ile tamamlanarak hazırlanır.

0.1 M Fosfat tamponu (gr/lt): 13,6 gr KH₂PO₄ ve 17,4 gr K₂HPO₄ tartılarak ayrı ayrı 1000 ml distile su içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan iki çözelti belirli oranlarda karıştırılarak pH 8,0'e ayarlanmıştır.

Bradford Boyası: 100 mg Commasie Blue G-250 50 ml metanolde çözülüp üzerine 100 ml %85'lik H₃PO₄ eklenerek 200 ml distile su ilave edilmiştir. Daha sonra boya filtre kağıdından süzümüştür. Süzelen çözelti çözelti 1:4 oranında distile su ile seyreltilerek buzdolabı şartlarında (0-4 °C) saklanmıştır.

2.2. Metot

2.2.1. Toprak örneklerinin alınması

Toprağın üst yüzey materyalleri süpürüldükten sonra steril bir spatula ile yaklaşık yüzeyden 2-5 cm aşağıdan 10 gram toprak örneği alınarak steril cam kavanozlara konmuştur. Alınan örnekler kullanılana kadar +4 °C' de saklanmıştır [58].

2.2.2. Bakterilerin izolasyonu

Bacillus cinsi bakterilerin izolasyonu

Bacillus cinsine ait bakteri türlerinin izolasyonu için Nutrient Broth (NB) besiyeri kullanılmıştır. Kayseri iline ait farklı semtlerdeki inşaat alanlarından alınan toprak ve çimento örneklerinin 1 gramı, içinde % 2 üre içeren 50 ml nutrient broth (NB) sıvı besiyeri içerisine konularak 37 °C'de 120 saat boyunca 130 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır (pH 8.0). Örneklerden 10^{-1} 'den 10^{-7} 'ye kadar seri seyreltmeler hazırlanarak, 10^{-3} seyreltmeden itibaren NA besiyerine 0,1 ml ekimler yapılmış ve 37 °C' de 1 gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda gelişen koloniler üreaz aktivitesini kontrol etmek amacı ile üreaz seçici ortam olan üreaz agar besiyerine ekilmiştir [59].

Üreaz agar besiyerinde büyüyen farklı morfolojik yapıya sahip olan koloniler seçilerek gram boyama yapılmıştır. Gram pozitif çubuk şekilli olan bakteriler deney materyali olarak seçilmiştir.

2. 2. 3. Bakterilerin Moleküler Tanımlanması

Nutrient Broth sıvı besiyerinde bir gece büyüyen bakterileri kültürlerinin kromozomal DNA'ları Maniatis (1989)'e göre izole edilmiştir [60]. İzolatlar suşları 5 ml' lik NB besiyerine ekilmiş ve 30 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hücre kültürü ependorf tüplere aktarılarak 13 000 rpm'de 2 dk santrifüj edilerek çöktürülmüş ve besiyeri uzaklaştırılmıştır. Pelletlerin üzerine 500 ml STE tamponu konularak yeniden çözülmüştür.

Daha sonra her bir tüpe 10 µg lizozim ilave edilerek karıştırılmış ve 37 °C'de bir saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda her bir tüpe 0,1 hacim olacak şekilde 3 M sodyum asetat çözeltisinden ilave edilmiştir. Alt üst edilerek 65 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra üzerine 500 µl fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) ilave edilerek karıştırılmış ve 13 000 rpm' de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda üstteki sıvı kısım steril tüplere alınmıştır.

Üzerine 2 hacim % 96' lık etil alkol ilave edilmiş ve -20 °C' de 30 dk bekletilmiştir. Daha sonra 13 000 rpm' de santrifüj edilerek DNA pellet halinde elde edilmiştir. DNA'lar % 70' lik etil alkol ile yıkanmış ve kurutulmuştur. Elde edilen DNA pelletleri

60 µl TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA) tamponu içerisinde çözülerek -20 °C' de kullanılana kadar muhafaza edilmiştir [18].

Genomik DNA'dan 16S rRNA gen bölgesi 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' ileri ve 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'geri primerleri kullanılarak PCR işlemi ile çoğaltılmıştır.

PCR işleminde aşağıdaki program kullanılmıştır:

95 °C' de	5dk	Başlangıç denaturasyon aşaması
94 °C' de	15 sn	} 35 döngü
52 °C' de	15 sn	
72 °C' de	1 dk 30 sn	
72 °C' de	5 dk	Son uzama aşaması

Amplifiye olan PCR ürünlerinden hizmet alımı şeklinde dizi analizleri yaptırılmıştır. Elde edilen Gen Bankasında kayıtlı bulunan *Bacillus* türlerine ait 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırılmış izolatların dizi eşleştirilmesi yapılmıştır.

2. 2. 4. Üreaz Aktivitesinin Belirlenmesi:

Bakterilerin üreaz aktiviteleri fenol- hipoklorid metoduna göre gerçekleştirilmiştir [19]. Bu metoda göre 250 µl bakteri kültürü üzerine 1 ml 0,1 M potasyum fosfat tamponu (pH 8.0) ve 2.5 ml üre (0.1 M) karışımı ilave edilmiştir. Karışım 5 dk 37 °C 'de bekletilmiş ve sürenin sonunda 1'er ml fenol nitropurid ve alkalin hipoklorit ilave edilerek 37 °C' de 25 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler 626 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçümleri yapılmıştır. Bir ünite üreaz 1 µmol üre/dk hidrolize edilen enzim miktarı olarak belirtilmiştir. Standart olarak amonyum klorid kullanılmıştır.

2. 2. 5. Biyokalsifikasyon Özelliklerinin Belirlenmesi

2. 2. 5. 1. Katı besiyerinde CaCO₃ (Kalsiyum karbonat) birikiminin gözlenmesi

Bakteriler tarafından üretilen CaCO₃ (kalsiyum karbonat) birikiminin gözlenmesi için kalsit presipitasyon agar ortamı kullanılmıştır. Üre dışındaki tüm malzemeler otoklav ile steril edilmiştir. Üre ise filtre ile steril edilerek ortama ilave edilmiştir. Hazırlanan besiyeri petri kutularına dökülerek katılaşmaları beklenmiştir. Katılaştıran besiyeri bulunan petri kutularının merkezine 20 µl bakteri kültürü ilave edilerek 30 °C’ de 6 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Petri kutuları CaCO₃ (kalsiyum karbonat) birikimi için sürekli olarak gözlemlenmiş ve çökme zonunun büyüklüğü ölçülmüştür [20].

2. 2. 5. 2. Sıvı besiyerinde CaCO₃ (Kalsiyum karbonat) birikiminin gözlenmesi

Sıvı besiyerinde CaCO₃ birikimini ölçmek için % 2 üre ve kalsiyum klorid ile desteklenmiş nutrient broth besiyeri (NB-U/Ca) kullanılmıştır. 30 ml NB-U/Ca % 2 lik besiyeri bakteri kültürü ile inoküle edilmiş ve 30 °C ‘de 130 rpm’ de 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Deneyler üç tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir. Sıvı besiyerinde çöken CaCO₃ filtre kâğıdı ile süzülerek 60 °C’ de 3 saat boyunca kurutulmuştur [20].

Daha sonra çöken CaCO₃’ün ağırlığı aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$W_c = W_{fc} - W_f$$

W_c=Çöken CaCO₃’ün net ağırlığı

W_{fc}=Çöken CaCO₃ ‘ı içeren kağıdın ağırlığı

W_f=Boş filtre kağıdının ağırlığı

2.2.6. Taramalı elektron mikroskopu (SEM) ve Enerji Dağılımlı X Işını Analizi

Bakterilerin kalsit birikimi taramalı elektron mikroskopu, kalsiyum miktarı EDX analizi ile belirlenmiştir. % 2 üre ve kalsiyum klorid ile desteklenmiş nutrient broth besiyerinde (NB-U/Ca) üreyen bakterilerin elektron mikroskop görüntüleri ve EDX analizleri ERNAM (Erciyes Üniversitesi Nanoteknoloji Araştırma Merkezi)’da hizmet alımı şeklinde yaptırılmıştır.

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. *Bacillus* İzolatlarının İzolasyonu

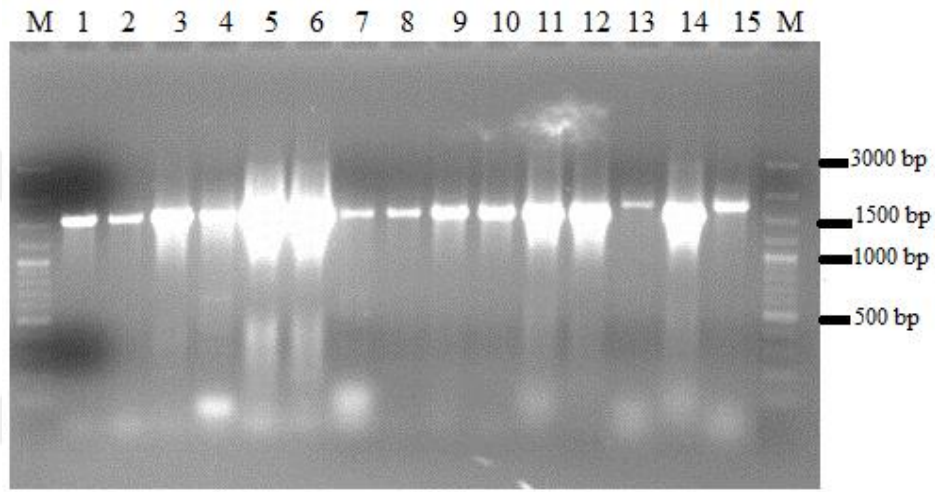
Kayseri'nin farklı yerlerinden alınan toprak örnekleri % 2 üre içeren 50 ml nutrient broth (pH 8.0) besiyerinde 37 °C'de 120 saat 130 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda seyreltilerek uygun besi yerlerine ekildikten sonra gelişen izolatlar seçici üre agar besiyerine ekilmiştir. Üre agar besiyerinde sarıdan pembeye doğru gerçekleşen renk değişikliğine neden olan izolatlar üreaz aktivitesi pozitif olarak değerlendirilmiştir. Üreaz pozitif olan izolatlar seçilerek saf kültürleri elde edilmiş ve Gram boyamaları yapılmıştır. Boyama sonunda Gram pozitif çubuk ve kok şekilli olan 14 izolat tanımlanması yapılmak üzere seçilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. *İzolatların* üreaz aktivitesi, Gram boyama özellikleri ve izole edildikleri toprak örnekleri

Bakterilerin Kodları	Gram Boyama / Şekil	Üreaz aktivitesi	İzole edildiği toprak örneği
F1	Gram pozitif/Kok	+	İnşaat alanı
F2	Gram pozitif/Kok	+	İnşaat alanı
F3	Gram pozitif/Kok	+	İnşaat alanı
F4	Gram pozitif /Bacil	+	Killi toprak
F6	Gram pozitif /Bacil	+	Tarla toprağı
F7	Gram pozitif /Bacil	+	Tarla toprağı
F8	Gram pozitif /Bacil	+	Tarla toprağı
F9	Gram pozitif /Bacil	+	İnşaat alanı
F10	Gram pozitif /Bacil	+	İnşaat alanı
F11	Gram pozitif /Bacil	+	İnşaat alanı
F12	Gram pozitif /Bacil	+	İnşaat alanı
F13	Gram pozitif /Bacil	+	İnşaat alanı
F14	Gram pozitif /Bacil	+	İnşaat alanı
F15	Gram pozitif /Bacil	+	İnşaat alanı

3.2. İzolatların Moleküler Tanımlanması

Seçici üre agar besiyerinde pozitif sonuç veren bakterilerin tanımlanmaları için, izolatların kromozomal DNA'sı elde edilmiştir. Elde edilen kromozomal DNA'lar Çizelge 3.1' de özellikleri verilen *Bacillus* cinsine özgün primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılmıştır. PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile yürütülmüş ve yaklaşık olarak 1554 bp uzunluğunda ürünler elde edilmiştir. (Şekil 3.1) Elde edilen PZR ürünleri saflaştırılarak dizi analizleri yapılmıştır.



Şekil 3.1. İzolatlara ait 16S rRNA gen bölgesinin agaroz jel görüntüsü. M: 100bp DNA markır, 1- F1, 2- F2, 3- F3, 4- F4, 6- F6, 7- F7, 8- F8, 9- F9, 10- F10, 11-F11, 12-F12, 13- F13, 14- F14, 15- F15

Belirlenen nükleotid dizileri Gen Bankası'ndaki *Bacillus* cinsine ait bakteri suşlarının nükleotid dizileri ile karşılaştırılarak eşleştirmeleri (alignment) yapılmış ve benzerlik oranları belirlenmiştir.

Homoloji analizlerine (dizi eşleştirme sonuçları) göre 3 izolatın *Staphylococcus*, 11 izolatın ise *Bacillus* cinsine ait olduğu belirlenmiştir. Tanımlanan izolatların tür isimleri Tablo 3.2 gösterilmektedir.

Ízo:184	GCTGTCACTTATAGATGGATCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCA	243
Ref:214	GCTGTCACTTATAGATGGATCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCA	273
Ízo:244	AGGCAACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTACGACACGGT	303
Ref:274	AGGCAACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTACGACACGGT	333
Ízo:304	CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGA	363
Ref:334	CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGA	393
Ízo:364	GCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTATCAGGGAAGAAC	423
Ref:394	GCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTATCAGGGAAGAAC	453
Ízo:424	AAACGTGTAAGTAAGTGTGCACGTCTTGACGGTACCTGATCAGAAAGCCACGGCTAACTA	483
Ref:454	AAACGTGTAAGTAAGTGTGCACGTCTTGACGGTACCTGATCAGAAAGCCACGGCTAACTA	513
Ízo:484	CGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAA	543
Ref:514	CGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAA	573
Ízo:544	AGCGCGGTAGGCGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGT	603
Ref:574	AGCGCGGTAGGCGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGT	633
Ízo:604	CATTGGAAACTGGAAAAGTGGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTG	663
Ref:634	CATTGGAAACTGGAAAAGTGGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTG	693
Ízo:664	AAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTGA	723
Ref:694	AAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTGA	753
Ízo:724	CGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT	783
Ref:754	CGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT	813
Ízo:784	AAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTA	843

Ref:814	 AAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTA	873
İzo:844	AGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCC	903
Ref:874	 AGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCC	933
İzo:904	GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT-ATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAAATCTT	962
Ref:934	 GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAAATCTT	993
İzo:963	GACATCCTTTGACCGCTCTAGAGATAGAGTTT-CCC-TTCGGGG-AC-AAGTGACAGTTG	1018
Ref:994	 GACATCCTTTGACCGCTCTAGAGATAGAGTTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTG	1053
İzo:1019	CTGCATGCTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGT-GGGTTAAGTCC-GCA-CGAGCGCA	1075
Ref:1054	 GTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCA	1113
İzo:1076	ACC-TTAAGCT-AGCTGC-ATCAT-A-GT-GG-CACTCTAAGT-GACTGCCG-TGACAA-	1125
Ref:1114	 ACCCTTAAGCTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACCTAAGTTGACTGCCGGTGACAAA	1173
İzo:1126	C-GGA-GAAGGTGGGGATGACGTCA	1148
Ref:1174	 CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA	1198

İzo: İzolat, Ref: Referans suş

Eşleştirme sonucuna göre F2 izolatının *Staphylococcus pasteurii* ATCC 51129 (NR-114435.1) suşu ile % 92 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Tablo 3.4. F2 izolatının *Staphylococcus pasteurii* ATCC 51129 (NR_114435.1) suşu ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları

İzo:43	GATAAGGAGATTGCTCCTTAGACGACAGCGCGG-CGGG-CAGT-CCACGTGGATTACCT	99
Ref:16	 GATAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCT	75
İzo:100	ACCTATACGACTGGTA-AACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAAGATTTTGAACC	158
Ref:76	 ACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAAGATTTTGAACC	135

Ízo:159	GCATGGCTCAATAGTGAAAGACGGCCTTGCTGTCACTTATAGATGGATCCGCGCCGTATG	218
Ref:136	GCATGGTTCAATAGTGAAAGACGGCCTTGCTGTCACTTATAGATGGATCCGCGCCGTATT	195
Ízo:219	AGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTG	278
Ref:196	AGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTG	255
Ízo:279	ATCGGCCACACTGGAAGTACGACACGATCCAGACTTATACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT	338
Ref:256	ATCGGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT	315
Ízo:339	CTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACCCCCGCTGAGTGATGAAGGTCTTCGG	398
Ref:316	CTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAA-CGCCGCTGAGTGATGAAGGTCTTCGG	374
Ízo:399	ATCGTAAAACCTCTGTTATCAGGGAAGAACAACGTGTAAGTAACTGTGCACGTCTTGACG	458
Ref:375	ATCGTAAAACCTCTGTTATCAGGGAAGAACAACGTGTAAGTAACTGTGCACGTCTTGACG	434
Ízo:459	GTACCTGATCAGAAAGCCACGGCTAAGCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG	518
Ref:435	GTACCTGATCAGAAAGCCACGGCTAA-CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG	493
Ízo:519	GCAAGCGTTATCCCGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGTTTTTTAAGTCTGA	578
Ref:494	GCAAGCGTTAT-CCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGTTTTTTAAGTCTGA	552
Ízo:579	TGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGG-CATTGGAAACTTGAAAACCTTGAGTGCAG	637
Ref:553	TGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTATTGGAAAC-TGAAAACCTTGAGTGCAG	611
Ízo:638	AAGAGGAAAGTGGAATTCCCATGTGTAGCGGTGAAATGGCGCAAAGATATGGAGGAACAC	697
Ref:612	AAGAGGAAAGTGGAATT-CCATGTGTAGCGGTGAAAT-GCGCAGAGATATGGAGGAACAC	669
Ízo:698	GCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAGCTGACGCTGGATGGGCGAA-GCGTGGGGG	756
Ref:670	-CAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTG-ATGTGCGAAAGCGT-GGGG	726
Ízo:757	ATCCAACCGGAATAAGATACCCTGG-AGGCCACGCCGAAACGAATGAGTGCTAAGTTGT	815

Ref:727	ATCAAACAGGATTA-GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG-ATGAGTGCTAAG-TGT	783
İzo:816	TAAGGGGTTTCCGCCCCCTTAAAGCTGGAGCTTAACGCATTAAGCACTCCGCTTGGGGAG	875
Ref:784	TAGGGGGTTTCCG-CCCCTTAGTGCTGCAGC-TAACGCATTAAGCACTCCGCTTGGGGAG	841
İzo:876	AACGAACCGCAAGGTTGAAACTCAAA-GAATTGAGGGGGACC-GCCAAAGCGTTGGAGCT	933
Ref:842	TACG-ACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCA	900
İzo:934	TGTGGTTTTAATTCG-AGCAACGGGAAAAAACTTTACCAAATTTTGGAC-TCGCTTTGGA	991
Ref:901	TGTGGTTT-AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTT-ACCAAATCTTG-ACATC-CTTTGAC	956
İzo:992	CGGTTTaaaaaaaGAAAGTTTTCCCTTCGGGGGAAAAAGGGAAAggggggggATTGGTT	1051
Ref:957	CGCTCTAGAGATAG--AGTTTTCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCAT-GGTT	1013
İzo:1052	G 1052	
Ref:1014	G 1014	

F3 izolatının *Staphylococcus pasteurii* ATCC 51129 (NR_024669.1) suşu ile % 99 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Tablo 3.5. F3 izolatının *Staphylococcus pasteurii* ATCC 51129 (NR_024669.1) suşu ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları

İzo:10	GGCGGCGTGCT--ATACATGCGAGTCGAGCGA-CAGATAAGGAGCTTGCTCCTCTTTGAC	66
Ref:31	GGCGGCGTGCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGATAAGGAGCTTGCTCCT--TTGAC	88
İzo:67	GTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTC	126
Ref:89	GTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTC	148

izo:127	GGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAAGATTTTGAACCGCATGGTTCAATAGTGAAAGACG	186
Ref:149	GGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAAGATTTTGAACCGCATGGTTCAATAGTGAAAGACG	208
izo:187	GCCTTGCTGTCACTTATAGATGGATCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCT	246
Ref:209	GCCTTGCTGTCACTTATAGATGGATCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCT	268
izo:247	TACCAAGGCAACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAAGAC	306
Ref:269	TACCAAGGCAACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAAGAC	328
izo:307	ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTG	366
Ref:329	ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTG	388
izo:367	ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTATCAGGGA	426
Ref:389	ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTATCAGGGA	448
izo:427	AGAACAAACGTGTAAGTAACTGTGCACGTCTTGACGGTACCTGATCAGAAAGCCACGGCT	486
Ref:449	AGAACAAACGTGTAAGTAACTGTGCACGTCTTGACGGTACCTGATCAGAAAGCCACGGCT	508
izo:487	AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGG	546
Ref:509	AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGG	568

İzo:547	CGTAAAGCGCGCTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGG	606
Ref:569	CGTAAAGCGCGCTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGG	628
İzo:607	AGGGTCATTGGAAACTGGAAAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAG	666
Ref:629	AGGGTCATTGGAAACTGGAAAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAG	688
İzo:667	CGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTA	726
Ref:689	CGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTA	748
İzo:727	ACTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC	786
Ref:749	ACTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC	808
İzo:787	GCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACG	846
Ref:809	GCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACG	868
İzo:847	CATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGA	902
Ref:869	CATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGA	924

F4 izolatının *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792 (NR_114581.1) suşu ile % 99 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Tablo 3.6. F4 izolatının *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792 (NR_114581.1) suşu ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları

İzo:23	TACATGCG-GTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATAGAAGTTAGCGGCGGACGG	81
Ref:35	TACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTGAGAGCTTGCTCTCA-AGAAGTTAGCGGCGGACGG	93
İzo:82	GTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTA	141
Ref:94	GTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTA	153
İzo:142	ATACCGGATAACATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACT	201

Ref:814	AGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCC	873
İzo:861	GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGG-ATTGACGGGG	907
Ref:874	GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG	921

F6 izolatının *Bacillus subtilis* JCM 1465 (NR_113265.1) suşu ile % 99 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Tablo 3.7. F6 izolatının *Bacillus subtilis* JCM 1465 (NR_113265.1) suşu ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları

İzo: 8	GCTGGCGGCGTGCT--ATACATGCA-GTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGTCTCCCCTGA	64
Ref: 8	GCTGGCGGCGTGCCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTG-CTCCC-TGA	65
İzo:65	TGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTC	124
Ref:66	TGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTC	125
İzo:125	CGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGT	184
Ref:126	CGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGT	185
İzo:185	GGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGG	244
Ref:186	GGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGG	245
İzo:245	CTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG	304
Ref:246	CTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG	305
İzo:305	ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC	364
Ref:306	ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC	365
İzo:365	TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGG	424
Ref:366	TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGG	425

Ízo:425	GAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG	484
Ref:426	GAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG	485
Ízo:485	GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATT	544
Ref:486	GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATT	545
Ízo:545	GGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCG	604
Ref:546	GGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCG	605
Ízo:605	GGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAAC TTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGG-ATTCCACGTG	663
Ref:606	GGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAAC TTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGG-ATTCCACGTG	665
Ízo:664	TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCT	723
Ref:666	TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCT	725
Ízo:724	GTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC	783
Ref:726	GTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC	785
Ízo:784	CACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTATGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTA	843
Ref:786	CACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTATGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTA	845
Ízo:844	ACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGG-ATTGAC	902
Ref:846	ACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGAC	905
Ízo:903	GGGGCCCCGCACAAGCG	919
Ref:906	GGGGCCCCGCACAAGCG	922

F7 izolatının *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792 (NR_114581.1) suşu ile % 82 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Tablo 3.8. F7 izolatının *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792 (NR_114581.1) suşu ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları

İzo: 34	CGATGGATTCTTACCTCGCTCTTTTGAA-TGACCCGGCGCTCGGGTGAGGAACACCTGTG	92
Ref: 21	CGATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTA-GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG	79
İzo: 93	-CACCTGCCATAATACTGGGATTGCTCCGGGAAACCGTTGCTGATACCGGATAACATTT	151
Ref: 80	TAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACATTT	139
İzo:152	TGAACTGCATGGCTCGAAATTGGAAGGAGGTTTCGGCTGTTTCTTATGGATGTACCCGCG	211
Ref:140	TGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCG	199
İzo:212	ACG-ATTAGCTATATGATGAGGTATCGTCTCACCACGG-TTCGATGCAGCTG-CGACCTG	268
Ref:200	TCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGC-GTAGCCGACCTG	258
İzo:269	ATAGGGTGATCGGCCACACTGGTACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCTC	328
Ref:259	AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG	318
İzo:329	TGGGGAATCTTCCGCAATGGACTTACCT-TGACGGAGCAAC-CCTCTGTGAGTGATGAAA	386
Ref:319	TAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGC-GTGAGTGATGAAG	377
İzo:387	CCTTTCG-TACTTATAAACTCTGTTGCCTTGACAAAACATGTGCTACTTTGAATAAGCTG	445
Ref:378	GCTTTCGGGTCGTA-AACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTA-GTTGAATAAGCTG	435
İzo:446	GCACCTTGACGGTACCTAACCATATAGCCACGTATAACTACGTGCCC-CTGCCCGGTTA	504
Ref:436	GCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG-CCGCGGTA	494
İzo:505	ATACTTATGTGTCAAGCGTTATCCGTATTTATTGACCGTAGAGCGCGCATGTGTCTAC	564
Ref:495	ATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTC	554

Ref:141	CTAATACCGAATMATCTCTTTTGGCTTCATGGTGAAAGACTGAAAGACGGTTTTGGCTGTC	200	
izo:200	GCTATAGGATGGGCCCGGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGA	259	
Ref:201	GCTATAGGATGGGCCCGGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGA	260	
izo:260	CGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGAC	319	
Ref:261	CGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGAC	320	
izo:320	TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACG	379	
Ref:321	TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACG	380	
izo:380	CCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTACAACCTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTAC	439	
Ref:381	CCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTAC	440	
izo:440	AGTAGTAACTGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCC	499	
Ref:441	AGTAGTAACTGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCC	500	
izo:500	AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCG	559	
izo:560	CGCAGGCGGTCCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGG	619	
Ref:561	CGCAGGCGGTCCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGG	620	
izo:620	AAACTGGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCOAAGTG-ACCGG-GAAAT	677	
Ref:621	AAACT-GGGGGACTTGAGTGCAGAAGA-GGAAAGTGAATTCOAAGTGTAGCGGTGAAAT	678	
izo:678	G-GCAGAAGATTTGAAGGAACA-CAGTGCGAAGG-GACTTTCTGGTCTG-AACTGACGC	733	
Ref:679	GCGTAG-AGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGC	737	
izo:734	TGAGG-GC-AAAGCG-GGGGA-CAAACA	757	
Ref:738	TGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACA	765	

F9 izolatu *Bacillus macroides* LMG 18474 (NR_114920.1) suşu ile % 99 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Tablo 3.10. F9 izolatının *Bacillus macroides* LMG 18474 (NR_114920.1) suşu ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları

İzo:27	AGTCGAGCGAACAGA-AAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAAC	85
Ref:33	AGTCGAGCGAACAGAGAAGGAGCTTGCTCCTTCGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAAC	92
İzo:86	ACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAAT	145
Ref:93	ACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAAT	152
İzo:146	AATCTCTTTTGCTTCATGGTGAAAGACTGAAAGACGGTTTCGGCTGTCGCTATAGGATGG	205
Ref:153	MATCTCTTTTGCTTCATGGTGAAAGACTGAAAGACGGTTTCGGCTGTCGCTATAGGATGG	212
İzo:206	GCCCCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCC	265
Ref:213	GCCCCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCC	272
İzo:266	GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG	325
Ref:273	GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG	332
İzo:326	CAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCCGTGAGTGA	385
Ref:333	CAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCCGTGAGTGA	392
İzo:386	AGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAACTGG	445
Ref:393	AGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAACTGG	452
İzo:446	CTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT	505
Ref:453	CTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT	512
İzo:506	AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCC	565

İzo:513	 AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCC	572
İzo:566	TTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGAC	625
Ref:573	 TTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGAC	632
İzo:626	TTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGG-ATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGG	684
Ref:633	 TTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGG-ATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGG	692
İzo:685	AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCG	744
Ref:693	 AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCG	752
İzo:745	TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCT-AGT	803
Ref:753	 TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGT	812
İzo:804	GTTA-GGGGTTTCCG-CCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCG-CTGGGGAG	860
Ref:813	 GTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAG	872
İzo:861	TACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGG	899
Ref:873	 TACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGG	911

F10 izolatının *Bacillus mycooides* NBRC 101228 (NR_113990.1) suşu ile % 98 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Tablo 3.11. F10 izolatının *Bacillus mycooides* NBRC 101228 (NR_113990.1) suşu ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları

İzo:1	GCTGGCGTGC GCGTGCCTA-TACATGCA-GTCGAGCGA-TGGATTA-GAGCTTGCTCTTA	56
Ref:8	 GCTGGCG---GCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTA	64
İzo:57	TGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAA	116
Ref:65	 TGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATAAGACTGGGATAA	124

Ízo:117	CTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGCACCGCATGGTGCGAAATTGAAA	176
Ref:125	CTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATATTTTGAAGTGCATAGTTCGAAATTGAAA	184
Ízo:177	GGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA	236
Ref:185	GGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA	244
Ízo:237	CGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT	296
Ref:245	CGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT	304
Ízo:297	GAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAA	356
Ref:305	GAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAA	364
Ízo:357	GTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTT	416
Ref:365	GTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTT	424
Ízo:417	AGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCC	476
Ref:425	AGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCC	484
Ízo:477	ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATT	536
Ref:485	ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATT	544
Ízo:537	ATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAA	596
Ref:545	ATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAA	604
Ízo:597	CCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGG-ATTCCAT	655
Ref:605	CCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGG-ATTCCAT	664
Ízo:656	GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGG	715
Ref:665	GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGG	724
Ízo:716	TCTGTAAGTACACTGAGGCGCAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA	775

Ref:725	TCTGTAACTGACACTGAGGCGCAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA	784
İzo:776	GTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAG	835
Ref:785	GTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAG	844
İzo:836	TTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG-CGCAAGGCTGAAACTCAAAG	889
Ref:845	TTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAG	899

F11 izolatının *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792 (NR_114581.1) suşu ile % 99 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Tablo 3.12. F11 izolatının *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792 (NR_114581.1) suşu ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları

İzo:6	CGCTGGGCGGGTGCT--ATACATGCA-GTCGAGCGA-TGGATT-AGAGCTTGCTCTTATG	60
Ref:17	CGCTGGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTGAGAGCTTGCTCTCAAG	76
İzo:61	AAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACT	120
Ref:77	AAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACT	136
İzo:121	CCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAATTGAAAGG	180
Ref:137	CCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAATTGAAAGG	196
İzo:181	CGGCTTCGGCTGTCACCTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG	240
Ref:197	CGGCTTCGGCTGTCACCTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG	256
İzo:241	GCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA	300
Ref:257	GCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA	316
İzo:301	GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGT	360
Ref:317	GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGT	376

Ízo:361	CTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAG	420
Ref:377	CTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAG	436
Ízo:421	GGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCAC	480
Ref:437	GGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCAC	496
Ízo:481	GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTAT	540
Ref:497	GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTAT	556
Ízo:541	TGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACC	600
Ref:557	TGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACC	616
Ízo:601	GTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGT	660
Ref:617	GTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGT	676
Ízo:661	GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTC	720
Ref:677	GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTC	736
Ízo:721	TGTAAGTACACTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT	780
Ref:737	TGTAAGTACACTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT	796
Ízo:781	CCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTT	840
Ref:797	CCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTT	856
Ízo:841	AACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG-CGCAAGGCTGAAACTC	888
Ref:857	AACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTC	905

F12 izolatu *Bacillus macroides* LMG 18474 (NR_114920.1) suşu ile % 98 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Tablo 3.13. F12 izolatu *Bacillus macroides* LMG 18474 (NR_114920.1) suşu ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları

İzo:7	CTGGCG-CGTGCT--ATACATGCA-GTCGAGCGAACAGA-AAGGAGCTTGTCTCTCTTTG	61
Ref:9	CTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAGAAGGAGCTTG-CTC-CTTCG	66
İzo:62	ACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATAACT	121
Ref:67	ACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATAACT	126
İzo:122	CCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATCTCTTTTGCTTCATGGTGAAGACTGAAAGA	181
Ref:127	CCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATMATCTCTTTTGCTTCATGGTGAAGACTGAAAGA	186
İzo:182	CGGTTTCGGCTGTCGCTATAGGATGGGCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG	241
Ref:187	CGGTTTGGCTGTCGCTATAGGATGGGCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATG	246
İzo:242	GCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA	301
Ref:247	GCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA	306
İzo:302	GACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGC	361
Ref:307	GACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGC	366
İzo:362	CTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTAAG	421
Ref:367	CTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTAAG	426
İzo:422	GGAAGAACAAGTACAGTAGTAACTGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACG	481
Ref:427	GGAAGAACAAGTACAGTAGTAACTGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACG	486
İzo:482	GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATT	541
Ref:487	GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATT	546

İzo:542	GGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCG	601
Ref:547	GGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCG	606
İzo:602	TGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCAAGTG	661
Ref:607	TGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCAAGTG	666
İzo:662	TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCT	721
Ref:667	TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCT	726
İzo:722	GTAACGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC	781
Ref:727	GTAACGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC	786
İzo:782	CACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTA-GGGGTTTCCG-CCCTTAGTGCTGCAGCTA	839
Ref:787	CACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTA	846
İzo:840	ACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAGAGG-ATTGAC	898
Ref:847	ACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGAC	906
İzo:899	GGGGG 903	
Ref:907	GGGGG 911	

F13 izolatı *Bacillus macroides* LMG 18474 (NR_114920.1) suşu ile % 98 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Tablo 3.14. F13 izolatı *Bacillus macroides* LMG 18474 (NR_114920.1) suşu ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları

İzo:11	GCGACGTGCT--ATAC-TGCA-GTCGAGCGAACAGA-AAGGAGCTTGCTCCTCTTTGAC	65
Ref:12	GCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAGAAGGAGCTTG-CTCCT--TCGAC	68
İzo:66	GTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCC	125
Ref:69	GTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCC	128

Ízo:126	GGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATCTCTTTTGCTTCATGGTGAAGACTGAAAGACG	185
Ref:129	GGGAAACCGGGGCTAATACCGAATMATCTCTTTTGCTTCATGGTGAAGACTGAAAGACG	188
Ízo:186	GTTTCGGCTGTCGCTATAGGATGGGCCCGGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC	245
Ref:189	GTTTTGGCTGTCGCTATAGGATGGGCCCGGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGC	248
Ízo:246	TCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA	305
Ref:249	TCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA	308
Ízo:306	CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGAAAGCCT	365
Ref:309	CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGAAAGCCT	368
Ízo:366	GATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTAAGGG	425
Ref:369	GATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTAAGGG	428
Ízo:426	AAGAACAAGTACAGTAGTAACTGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGC	485
Ref:429	AAGAACAAGTACAGTAGTAACTGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGC	488
Ízo:486	TAAC TACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG	545
Ref:489	TAAC TACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG	548
Ízo:546	GCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTG	605
Ref:549	GCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTG	608
Ízo:606	GAGGGTCATTGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGG-ATTCCAAGTGTA	664
Ref:609	GAGGGTCATTGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTCCAAGTGTA	668
Ízo:665	GCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGT	724
Ref:669	GCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGT	728
Ízo:725	AACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA	784

Ref:729	AACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA	788
İzo:785	CGCCGTAAACTATGAGTGCTACGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAAC	844
Ref:789	CGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAAC	848
İzo:845	GCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATT	899
Ref:849	GCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATT	903

F14 izolatının *Bacillus thuringiensis* Bt407 (NR_102506.1) suşu ile % 96 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Tablo 3.15. F14 izolatı *Bacillus thuringiensis* Bt407 (NR_102506.1) suşu ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları

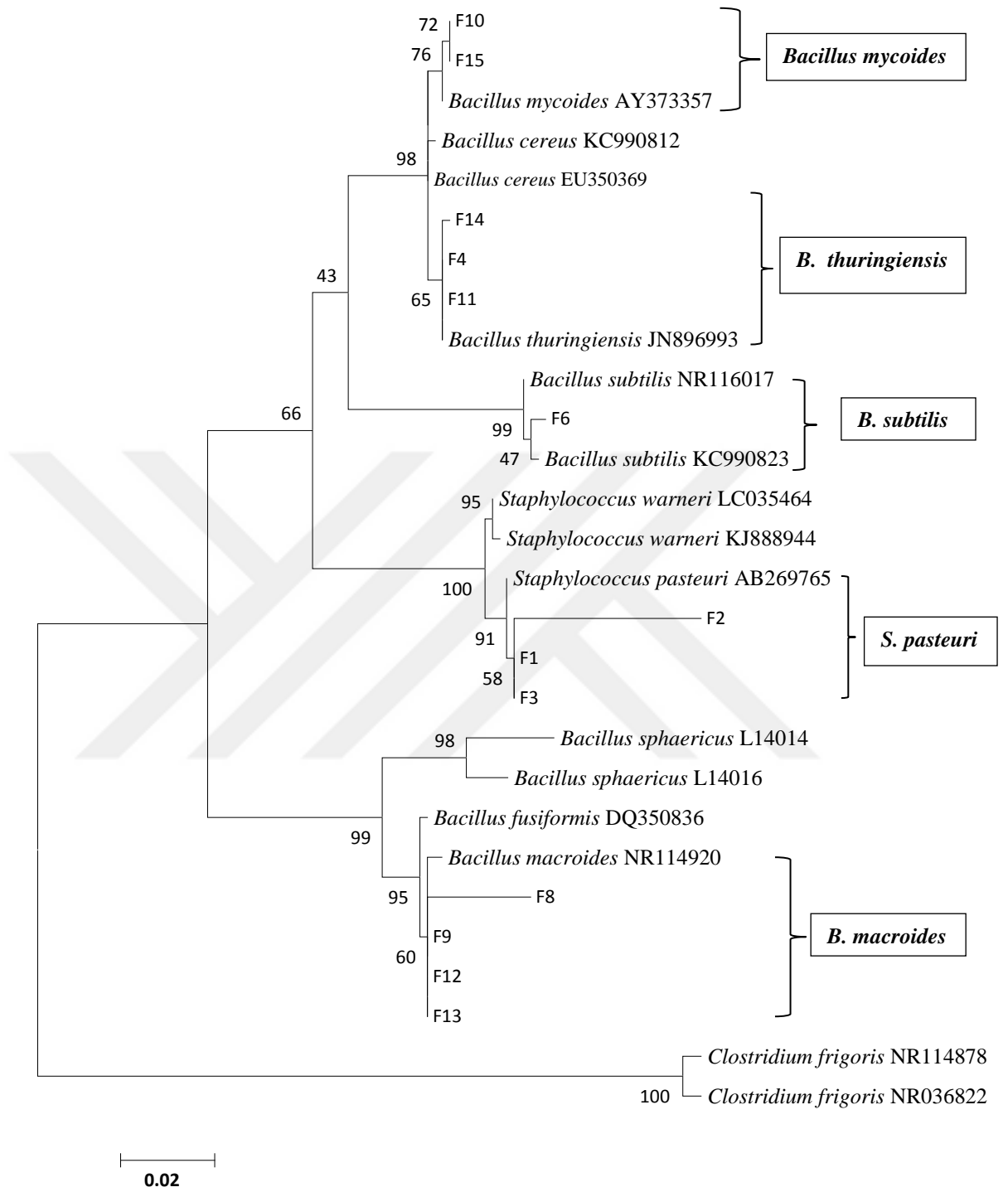
İzo:5	TGGCGGGCGTGCT--ATACATCGCAGTCGAGCGAATAGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGA	62
Ref:30	TGGCGG-CGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAAT-GGATTGAGAGCTTGCTCTCAAGA	87
İzo:63	AGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTC	122
Ref:88	AGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTC	147
İzo:123	CGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAATTGAAAGGC	182
Ref:148	CGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAATTGAAAGGC	207
İzo:183	GGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGG	242
Ref:208	GGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGG	267
İzo:243	CTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG	302
Ref:268	CTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG	327
İzo:303	ACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC	362
Ref:328	ACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC	387

Ízo: 363	TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGG	422
Ref: 388	TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGG	447
Ízo: 423	GAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG	482
Ref: 448	GAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG	507
Ízo: 483	GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATT	542
Ref: 508	GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATT	567
Ízo: 543	GGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCG	602
Ref: 568	GGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCG	627
Ízo: 603	TGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTG	662
Ref: 628	TGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTG	687
Ízo: 663	TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCT	722
Ref: 688	TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCT	747
Ízo: 723	GTAACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC	782
Ref: 748	GTAACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC	807
Ízo: 783	CACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTA	842
Ref: 808	CACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTA	867
Ízo: 843	ACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGAC	902
Ref: 868	ACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGAC	927
Ízo: 903	GGGGG-TCGCACAAGCGGTGGAGCATGTG--TTTATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC	959
Ref: 928	GGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC	987
Ízo: 960	CA-GTCTTGACAT-CTCTGAAA--CCTAGAGATAGGGC-TCT-CTTCGGGAGCAGAGTGA	1013

Ízo:307	CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG	366
Ref:314	CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG	373
Ízo:367	AGCAACGCCCGGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAA	426
Ref:374	AGCAACGCCCGGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAA	433
Ízo:427	CAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC	486
Ref:434	CAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC	493
Ízo:487	TACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGT	546
Ref:494	TACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGT	553
Ízo:547	AAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGG	606
Ref:554	AAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGG	613
Ízo:607	GTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGG	666
Ref:614	GTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGG	673
Ízo:667	TGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAAC	726
Ref:674	TGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAAC	733
Ízo:727	GACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC	786
Ref:734	GACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC	793
Ízo:787	GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCAT	846
Ref:794	GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCAT	853
Ízo:847	TAAGCACTCCGGCCTGGGGAGTACGGGCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGG	906
Ref:854	TAAGCACTCC-GCCTGGGGAGTACGGGCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGG	912
Ízo:907	TCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGATCCTTACAAGGT	966

Ref:913	CCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGT	972
İzo:967	CTTGACAT-CTCTGACAACCCTAGAAGATAGGGCTTCT-CTTCGGGAGCAGAGTGACAGG	1024
Ref:973	CTTGACATCCTCTGAAAACCTAG-AGATAGAGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGG	1031
İzo:1025	TGGTGCAT-GCTGTCGTCAGCTCGTGTTCGGGA-ATGTTG--TAAGT-ACGC-ACGAGC-	1077
Ref:1032	TGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCG	1091
İzo:1078	CA--CCCTGATC-TAGTTG-CATCAT--AG-TGGGCACTCTAA-GTGA CTGGCGGTGACA	1129
Ref:1092	CAACCCTGATCTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACA	1151
İzo:1130	A 1130	
Ref:1152	A 1152	

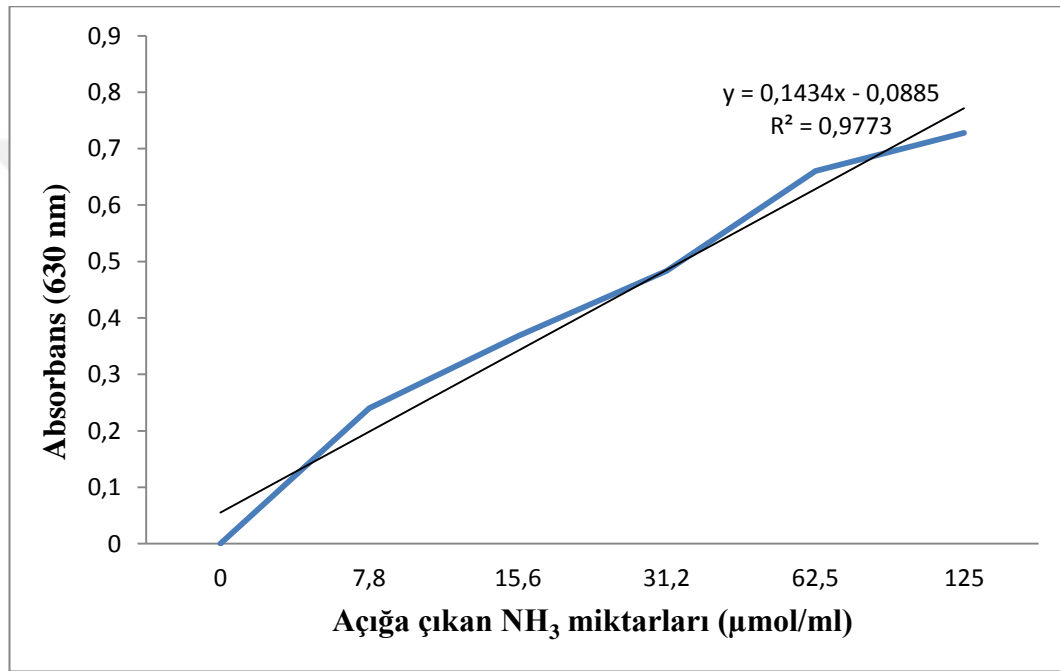
Topraktan izole edilen ve 16S rRNA gen bölgesinin dizi analizi gerçekleştirilerek tür tanımlanması yapılan izolatların gen bankasındaki örnekler ile karşılaştırılması sonucunda MEGA5.2 programı ile filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Filogenetik ağaç Maksimum benzerlik indeksine göre yapılmıştır (Şekil 3.2). Dış grup olarak *Clostridium frigidum* türü kullanılmıştır. Gen bankasından alınan örneklerin numaraları parantez içerisinde gösterilmiştir.



Şekil 3.2. 16S rRNA gen bölgesine göre izolatlar ve Gen bankasındaki örnekler ile oluşturulan filogenetik ağaç

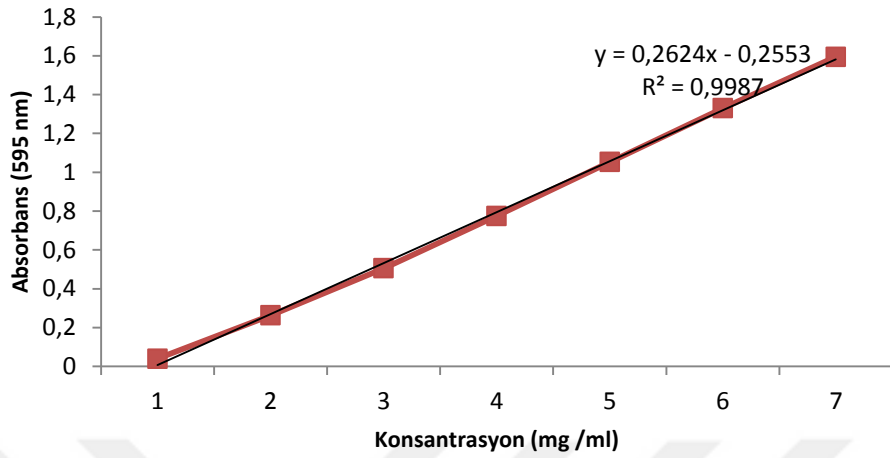
3.3. İzolatların Üreaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Bakterilerin üreaz aktiviteleri bölüm 2 de 2.2.4 te belirtildiği gibi fenol- hipoklorid metoduna göre gerçekleştirilmiştir [19]. Bu yöntemde açığa çıkan NH_3 miktarları 626 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülerek üreaz aktivitesi tayin edilmiştir. Bu nedenle aktivite tayininde kullanılmak üzere amonyum klorid ile standart grafiği hazırlanmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. NH_3 standart grafiği

Spesifik enzim aktivitesinin belirlenmesi için izolatların protein miktarları Bradford yöntemine göre 595 nm dalga boyunda ölçümler yapılarak belirlenmiştir. Ölçülen absorbans değerleri standart eğri denkleminde yerine konularak protein miktarları hesaplanmıştır. BSA ile elde edilen protein standart grafiği Şekil 3.4 olduğu gibidir.

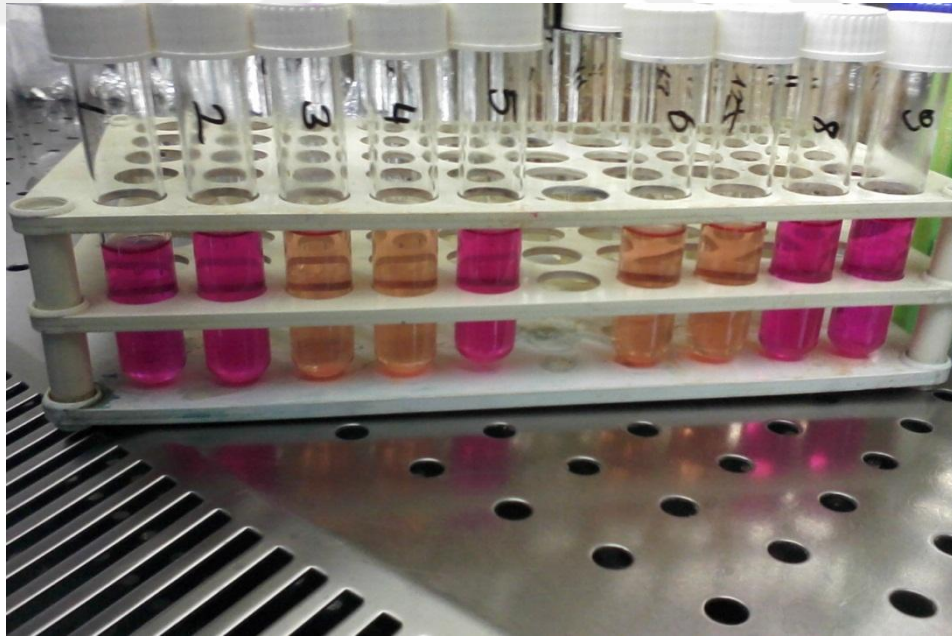


Şekil 3.4. Bradford yöntemine göre protein standart grafiği

Tablo 3.17. İzolatlara ait üreaz aktivitesi, protein miktarı ve spesifik aktivite değerleri

İzolatlar	Üreaz aktivitesi (U/ml)	Protein miktarı (mg/ml)	Spesifik aktivite (U/mg)
F1 (<i>S. pasteurii</i>)	18,85286±0,00	2,03048	9,2848±0,00
F2 (<i>S. pasteurii</i>)	18,70642±0,00	2,05716	9,0933±0,00
F3 (<i>S. pasteurii</i>)	14,51883±0,05	1,59794	9,0859±0,05
F4 (<i>B.thuringiensis</i>)	10,42538±0,08	1,58079	6,5950±0,08
F6 (<i>B.subtilis</i>)	8,73431±0,03	1,09679	7,9634±0,03
F7 (<i>B.thuringiensis</i>)	8,80753±0,16	1,21303	7,2607±0,16
F8 (<i>B.macroides</i>)	6,433054±0,01	1,45122	4,4328±0,01
F9 (<i>B.macroides</i>)	18,85286±0,00	2,29535	8,2134±0,00
F10 (<i>B.mycooides</i>)	18,70642±0,00	2,19817	8,5099±0,00
F11 (<i>B.thuringiensis</i>)	6,882845±0,00	1,55983	4,4125±0,00
F12 (<i>B.macroides</i>)	18,77964±0,01	2,47827	7,5776±0,01
F13 (<i>B.macroides</i>)	6,949093±0,01	1,62271	4,2823±0,01
F14 (<i>B.thuringiensis</i>)	3,981869±0,04	1,44740	2,7510±0,04
F15 (<i>B.mycooides</i>)	6,990934±0,03	1,46265	4,7796±0,03
<i>Sporosarcina pasteurii</i>	18,12413±0,03	1,55602	11,6477±0,03

Üreaz aktivitesi analizi sonucunda kontrol suşu *Sporosarcina pasteurii*'nin 11,6477 U/mg ile en yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Toprakta izole edilen kok şekilli izolatlar arasında F1 (*S. pasteurii*)'nin 9,2848±0,00 U/mg değeri ile en yüksek üreaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. F2 (*S. pasteurii*) ve F3 (*S. pasteurii*)'ün üreaz aktivitesi sırasıyla 9,0933±0,00 ve 9,0859±0,05 U/mg olarak belirlenmiştir. *Bacillus* cinsine ait olan türler arasında en yüksek aktiviteye sahip olan tür ise 8,5099±0,00 U/mg değeri ile F10 (*B. mycoides*) olarak belirlenmiştir. F9 (*B. macroides*), F6 (*B. subtilis*), F12 (*B. macroides*), F7 (*B. thuringiensis*) ve F4 (*B. thuringiensis*) bakterilerinin spesifik aktiviteleri sırasıyla 8,2134±0,00, 7,9634±0,03, 7,5776±0,01, 7,2607±0,16 ve 6,5950±0,08 U/mg olarak belirlenmiştir. F8 (*B. macroides*), F11 (*B. thuringiensis*), F13 (*B. macroides*), F15 (*B. mycoides*) bakterilerinin spesifik aktivitesi diğer bakterilere göre düşük olduğu tespit edilmiştir. Diğer bakteriler ile karşılaştırıldığında en düşük spesifik aktiviteye sahip olan bakterinin 2,7510±0,04 U/mg değeri ile F14 (*B. thuringiensis*) izolatu olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3.5. Üre seçici besiyerinde bakterilerin görüntüsü. Üreaz aktivitesi sonucu sarı renkli besiyeri pembe renge dönüşmektedir.

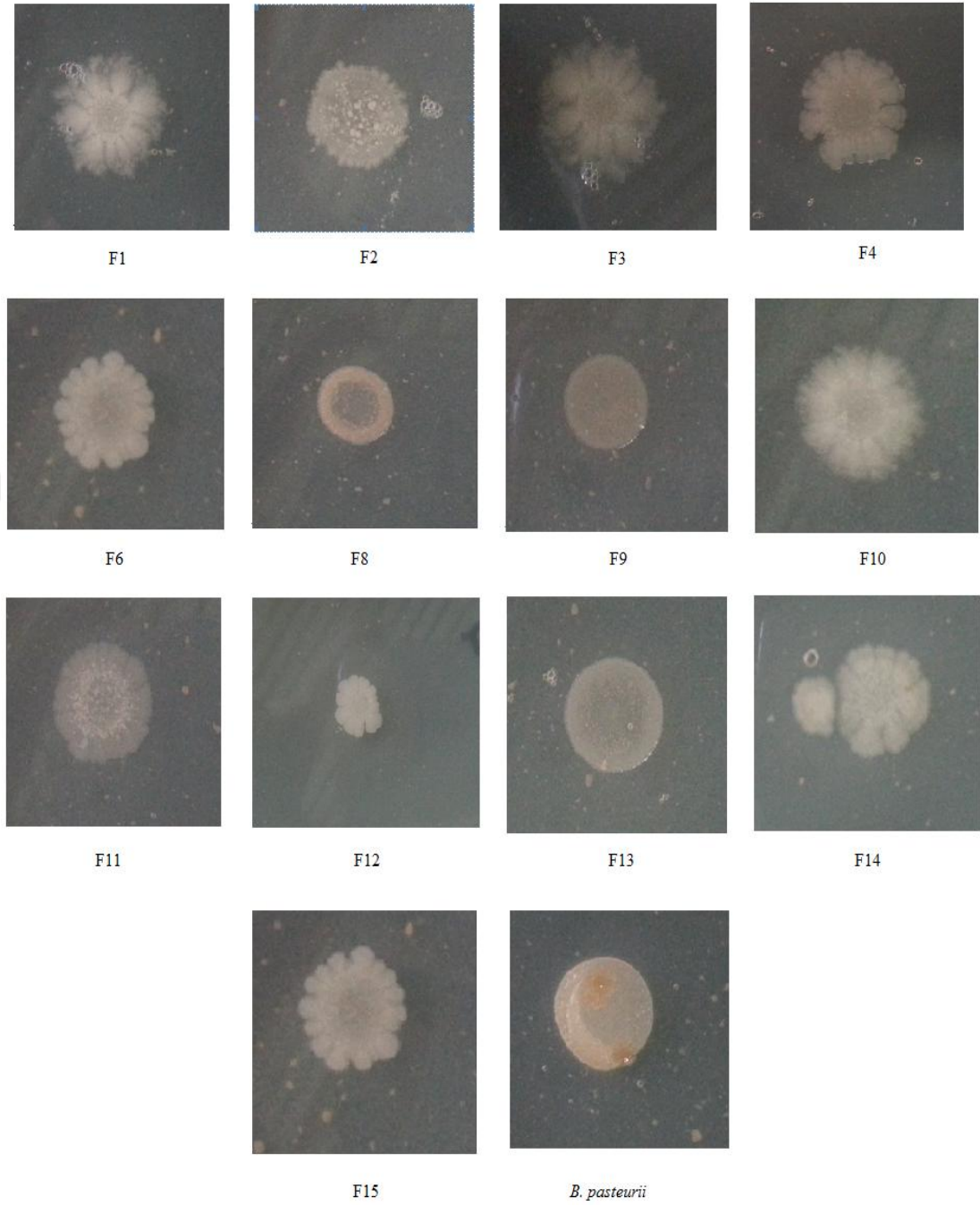
3.4. İzolatların Biyokalsifikasyon Özelliklerinin Belirlenmesi

3.4.1. Katı besiyerinde biyokalsifikasyonun belirlenmesi

Toprakta izole edilen bakteriler tarafından üretilen CaCO_3 birikiminin gözlenmesi için kalsit presipitasyon agar ortamı kullanılmıştır. Katılaştıran besiyeri bulunan petri kutularının merkezine 20 μl bakteri kültürü ilave edilerek 30°C 'de 6 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Petri kutuları CaCO_3 birikimi için sürekli olarak gözlemlenmiş ve 3.ve 6. gün sonunda çökeltme zonuun büyüklüğü ölçülmüştür. Elde edilen değerler Tablo 3.18 gibidir. Elde edilen ölçümlere göre en fazla zon artışının kok şekilli F2 ve F3 izolatlarında 2,5 mm F1 izolatında 2 mm olduğu gözlenmiştir. *Bacillus* cinsine ait türler arasında ise F14 ve F7 izolatlarında 2 mm zon artışı olduğu tesbit edilirken kontrol suşu olan *S. pasteurii* de ise 1mm zon artışı olmuştur. F8 ve F6 izolatlarında 1mm zon artışı gözlemlenmiştir. F4 ve F9, F10 izolatlarında 0.5 mm zon artışı gözlenirken F11 ve F13, F15 izolatlarında ise zon artışı gözlenmemiştir.

Tablo 3.18. Bakteriler tarafından oluşturulan zon çaplarının artışı

İzolatlar	Zon çapı (3. Gün)	Zon çapı (6. Gün)
F1 (<i>S. pasteurii</i>)	8 mm	10 mm
F2 (<i>S. pasteurii</i>)	7,5 mm	10 mm
F3 (<i>S. pasteurii</i>)	7,5 mm	10 mm
F4 (<i>B.thuringiensis</i>)	4,5 mm	5 mm
F6 (<i>B.subtilis</i>)	4,5 mm	5,5 mm
F7 (<i>B.thuringiensis</i>)	5,5 mm	7,5 mm
F8 (<i>B.macroides</i>)	9 mm	10 mm
F9 (<i>B.macroides</i>)	4,5 mm	5 mm
F10 (<i>B.mycooides</i>)	4,5 mm	5 mm
F11 (<i>B.thuringiensis</i>)	9 mm	9 mm
F12 (<i>B.macroides</i>)	4 mm	5 mm
F13 (<i>B.macroides</i>)	4 mm	4 mm
F14 (<i>B.thuringiensis</i>)	6 mm	8 mm
F15 (<i>B.mycooides</i>)	4 mm	4 mm
<i>Sporosarcina pasteurii</i>	6 mm	7 mm



Şekil 3.6. Bakteriler tarafından oluşturulan zon çapları

3.4.2. Sıvı Besiyerinde Biyokalsifikasyonun Belirlenmesi

Bakteriler % 2 üre ve kalsiyum klorid ile desteklenmiş nutrient broth sıvı besi ortamına ekilip 30 °C 130 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. Önce filtre kağıtlarının ağırlıkları ölçülerek daraları alınmıştır. Daha sonra sıvı besiyerinde çöken CaCO₃ filtre kağıdı ile süzölmüş filtre kağıtları 60 °C’de 2 saat kurutulduktan sonra hassas terazide ağırlıkları ölçölmüştür (Şekil 3.8). Çöken CaCO₃’ın ağırlığı aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$W_c = W_{fc} - W_f$$

W_c =Çöken CaCO₃’ın net ağırlığı,

W_{fc} =Çöken CaCO₃ ‘ı içeren kâğıdın ağırlığı,

W_f =Boş filtre kâğıdının ağırlığı

Elde edilen sonuçlara göre en fazla CaCO₃ birikimi 0,5324 ile gr kontrol suşu olan *Sporosarcina pasteurii*’de gözlenmiştir. Kontrol suşundan sonra en fazla CaCO₃ birikimi F9 (*B. macroides*) de 0,2011 gr daha sonra kok şekilli izolat olan F3 (*S. pasteurii*) de 0,1922 gr ölçölmüştür. F8 (*B. macroides*) izolatında 0,1829 gr, kok şekilli F1 (*S. pasteurii*) izolatında 0,1707 gr ve F2 (*S. pasteurii*) izolatında 0,1640 gr olarak ölçölmüştür. F15 (*Bacillus mycoides*) izolatında 0,1236 gr, F10 (*Bacillus mycoides*) izolatında 0,0906 gr, F12 (*B. macroides*) izolatında 0,0778 gr, F11 (*B. thuringiensis*) izolatında 0,0753 gr, F14 (*B. thuringiensis*) izolatında 0,0672 gr, F6 (*B. subtilis*) izolatında 0,0472 gr, F7 (*B. thuringiensis*) 0.471 gr CaCO₃ birikimi ölçölmüştür. En az CaCO₃ birikimi ise F4 (*B. thuringiensis*) izolatında 0,0344 gr olarak belirlenmiştir.

Tablo 3.19. İzolatlar ve kontrol şusuna ait sıvı besiyerinde biriken CaCO_3 miktarları

İzolatlar	W_{fc}	W_f	$W_{fc} - W_f$	W_c
F1 (<i>S. pasteurii</i>)	0,4436	0,2729	0,4436-0,2729	0,1707
F2 (<i>S. pasteurii</i>)	0,4369	0,2729	0,4369-0,2729	0,1640
F3 (<i>S. pasteurii</i>)	0,4651	0,2729	0,4651-0,2729	0,1922
F4 (<i>B.thuringiensis</i>)	0,3073	0,2729	0,3073-0,2729	0,0344
F6 (<i>B.subtilis</i>)	0,3201	0,2729	0,3201-0,2729	0,0472
F7(<i>B.thuringiensis</i>)	0,3200	0,2729	0,3200-0,2729	0,0471
F8 (<i>B.macroides</i>)	0,4558	0,2729	0,4558-0,2729	0,1829
F9 (<i>B.macroides</i>)	0,4740	0,2729	0,4740-0,2729	0,2011
F10 (<i>B.mycoides</i>)	0,3635	0,2729	0,3635-0,2729	0,0906
F11 (<i>B.thuringiensis</i>)	0,3482	0,2729	0,3482-0,2729	0,0753
F12 (<i>B.macroides</i>)	0,3507	0,2729	0,3507-0,2729	0,0778
F13 (<i>B.macroides</i>)	0,4786	0,2729	0,4786-0,2729	0,2057
F14 (<i>B.thuringiensis</i>)	0,3401	0,2729	0,3401-0,2729	0,0672
F15 (<i>B.mycoides</i>)	0,3965	0,2729	0,3965-0,2729	0,1236
<i>Sporosarcina pasteurii</i>	0,8053	0,2729	0,8053-0,2729	0,5324



F8



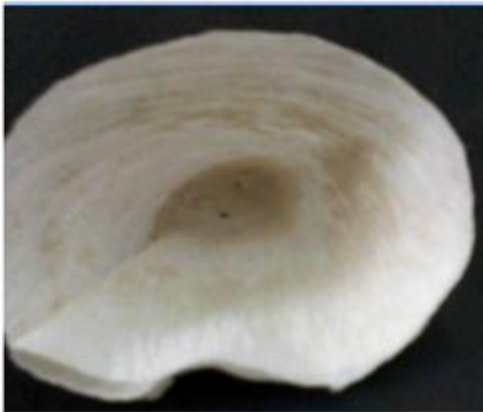
F9



F11



F13



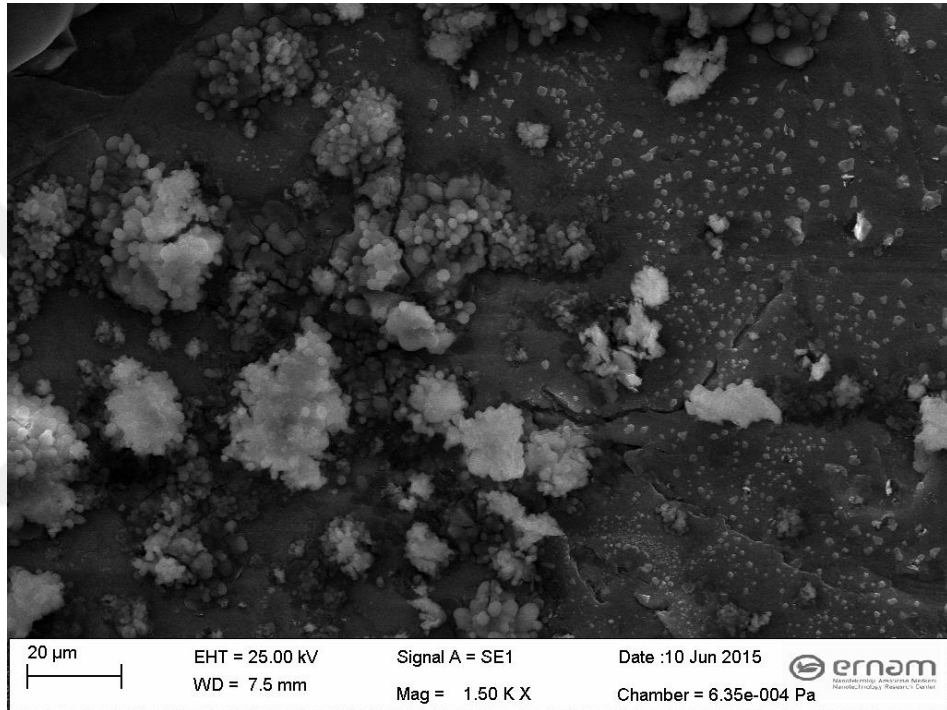
F15

*S. pasteurii*

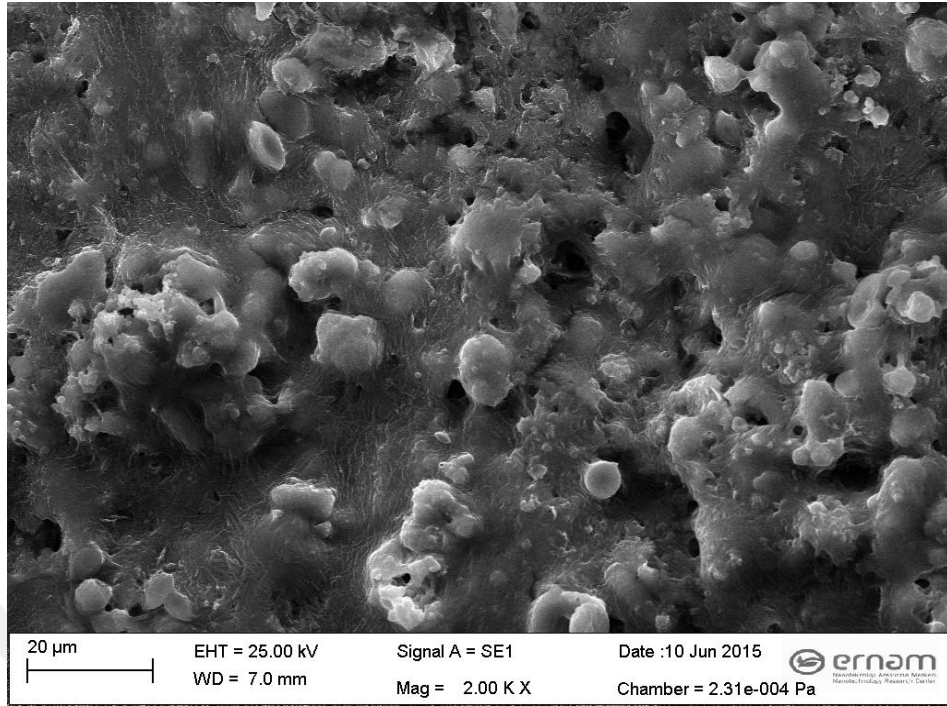
Şekil 3.7. Bazı izolatlarla ve kontrol şuşuna ait sıvı besiyerinde CaCO_3 birikimi

3.5. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analiz Sonuçları

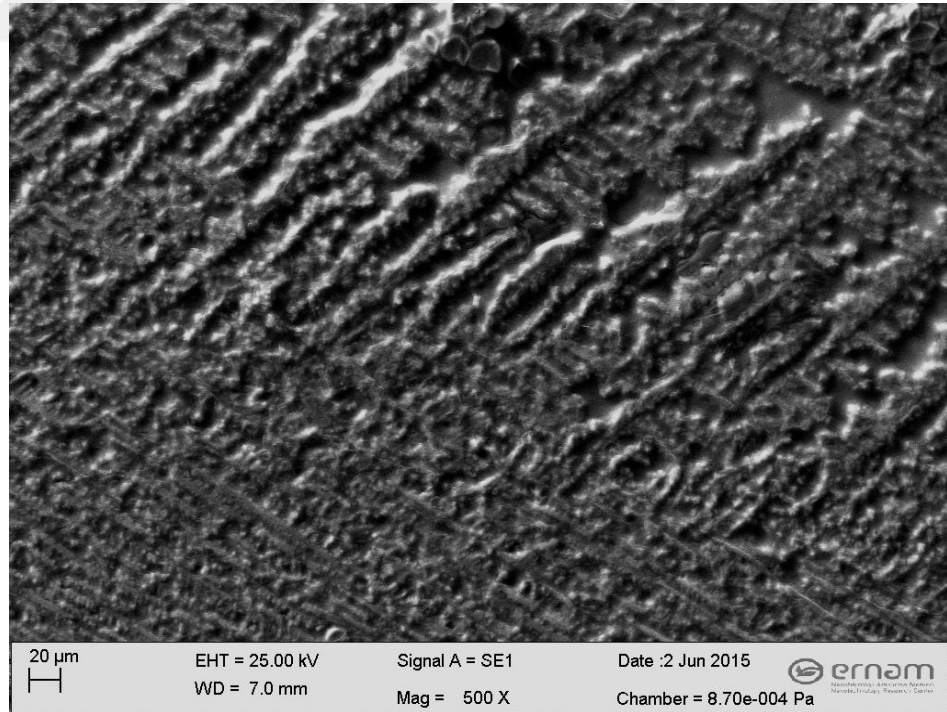
İzolatların kalsifikasyon özellikleri elektron mikroskobu ile belirlenmiştir. İzole edilen bakteri örnekleri kalsifikasyon besi ortamında 5 gün inkübe edildikten sonra elektron mikroskobunda görüntüleri incelenmiş ve fotoğrafları alınmıştır. Elektron mikroskobu görüntülerine göre izolatlarda CaCO_3 birikiminin olduğunu görülmektedir(Şekil 3.8-Şekil 3.21).



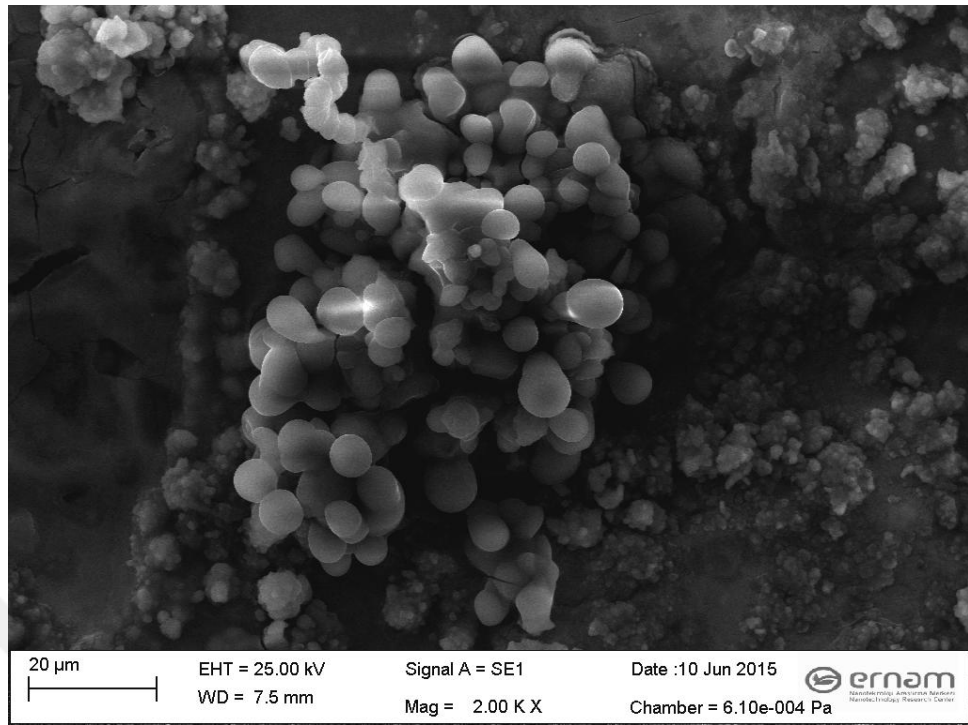
Şekil 3.8. F1 izolatının elektron mikroskop görüntüsü



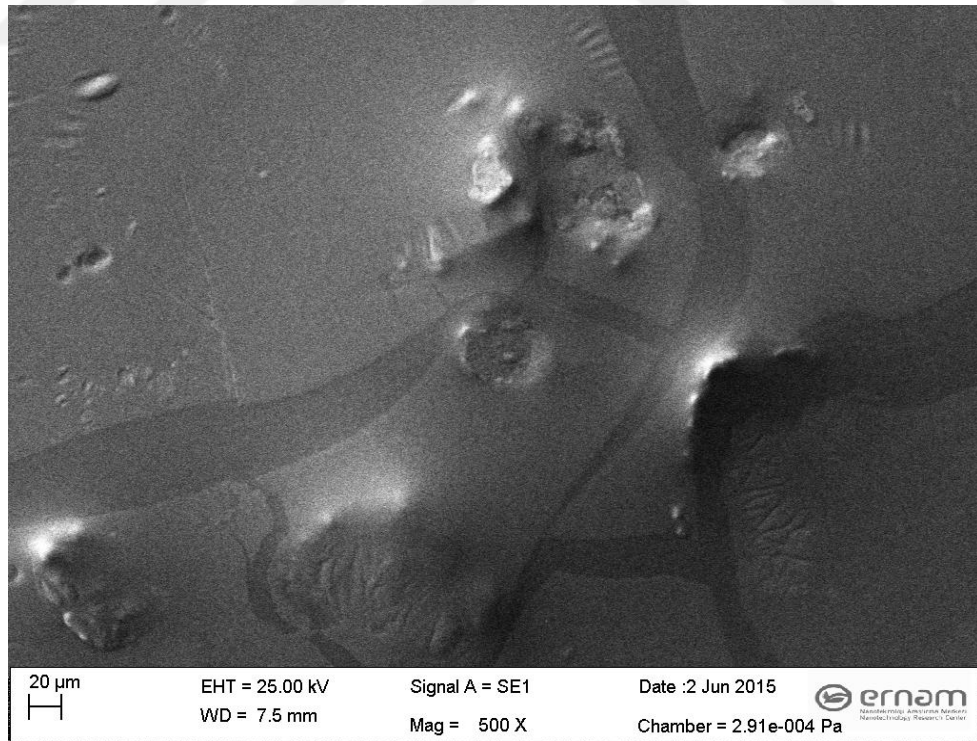
Şekil 3.9. F2 izolatının elektron mikroskop görüntüsü



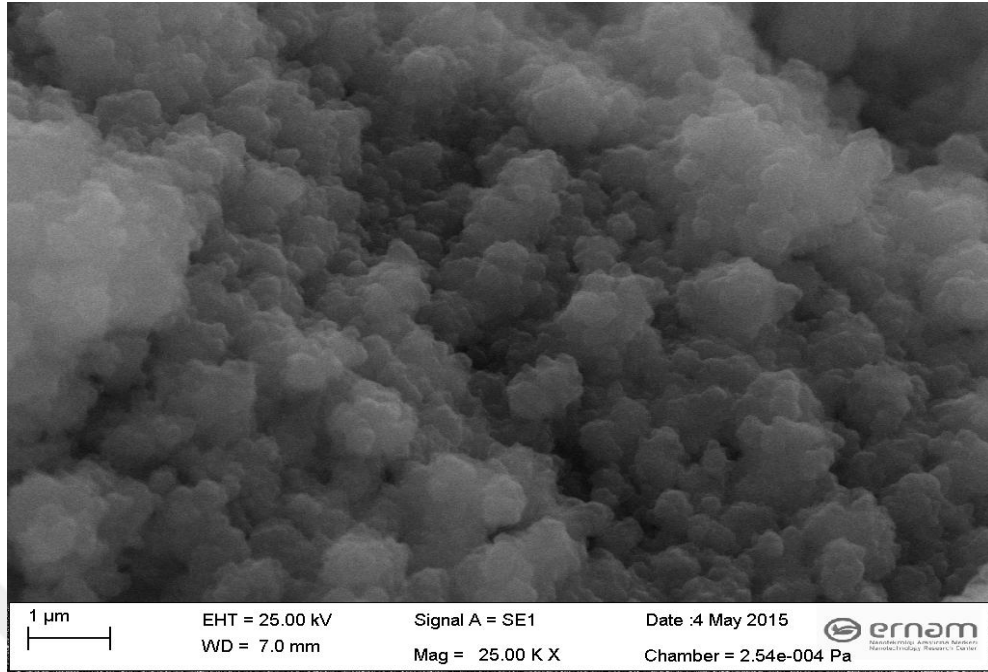
Şekil 3.10. F3 izolatının elektron mikroskop görüntüsü



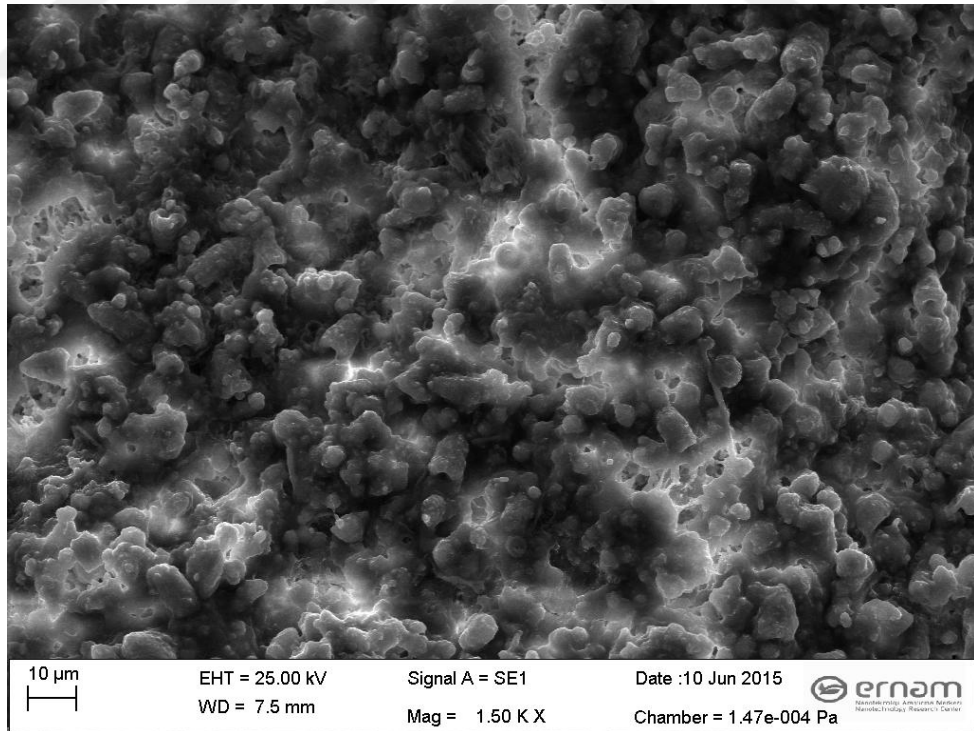
Şekil 3.11. F4 izolatının elektron mikroskop görüntüsü



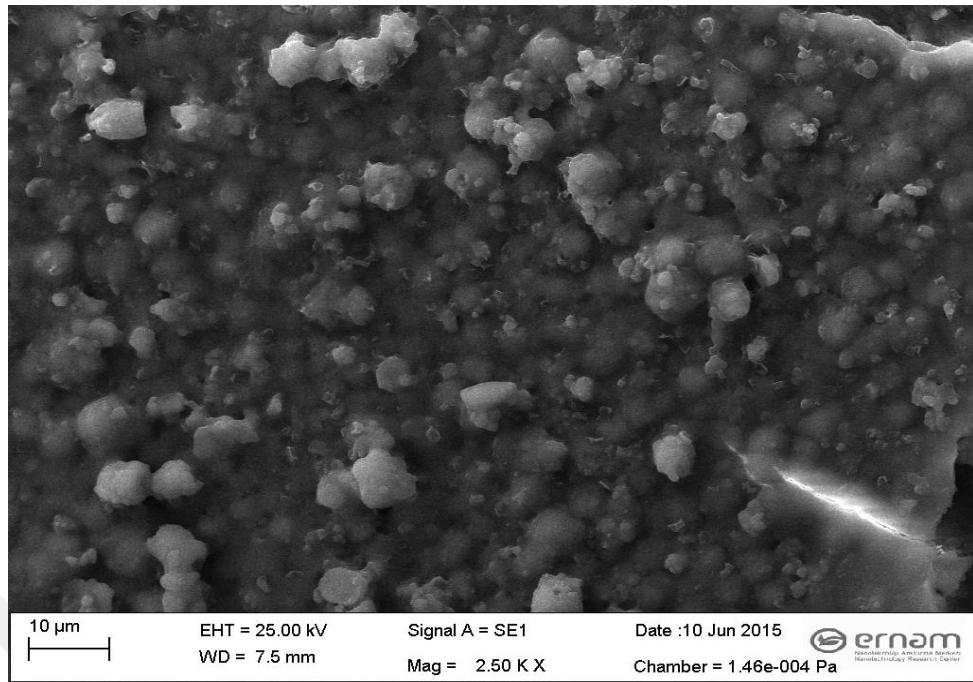
Şekil 3.12. F6 izolatının elektron mikroskop görüntüsü



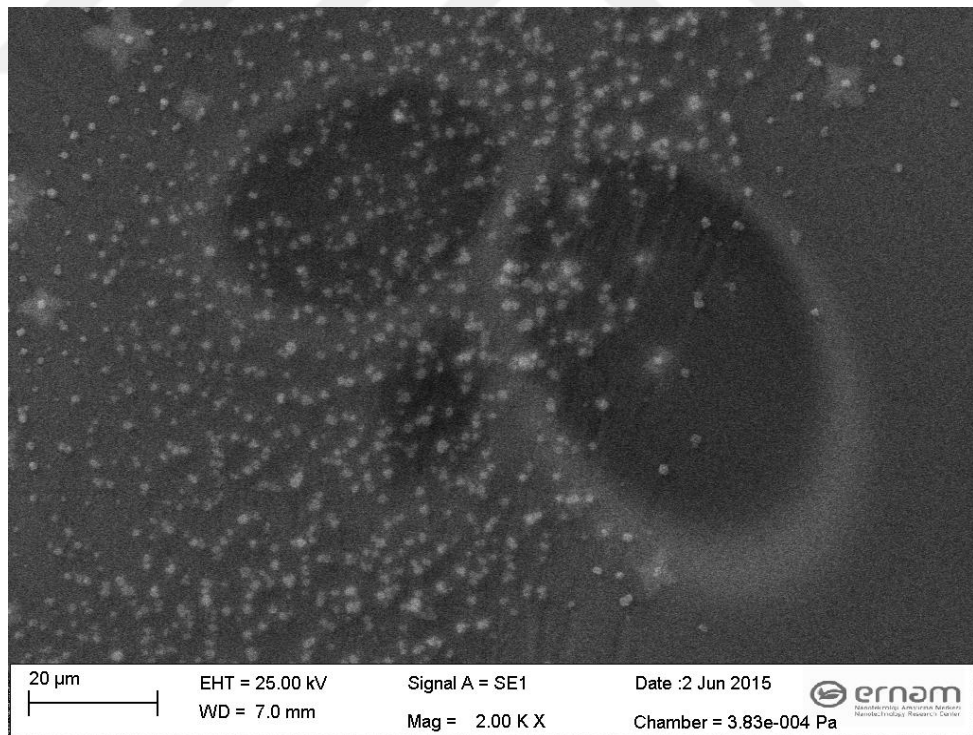
Şekil 3.13. F7 izolatının elektron mikroskop görüntüsü



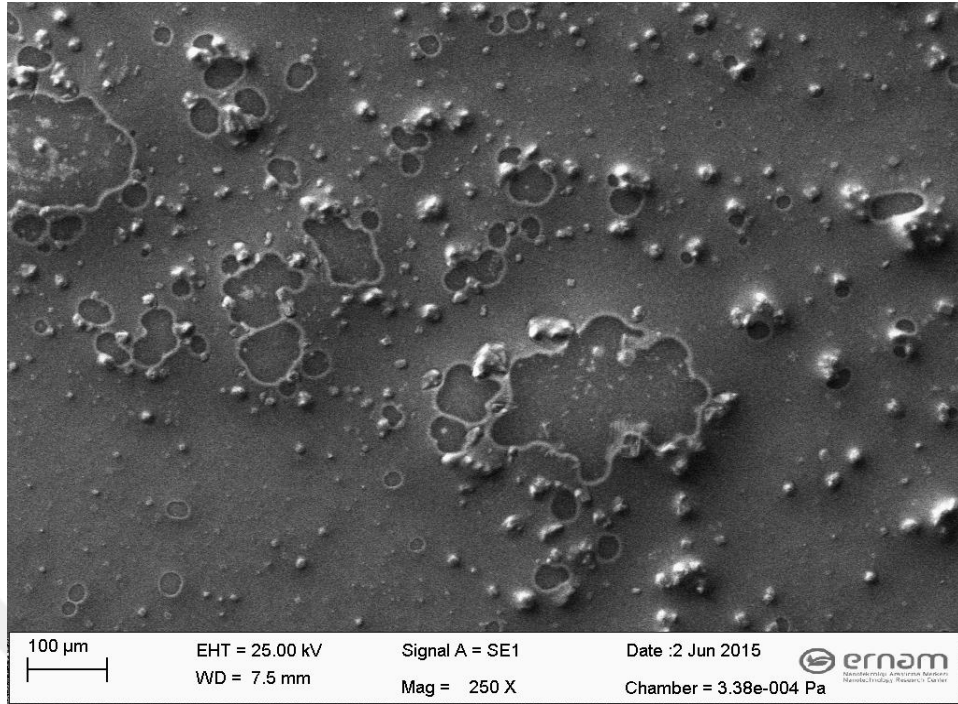
Şekil 3.14. F8 izolatının elektron mikroskop görüntüsü



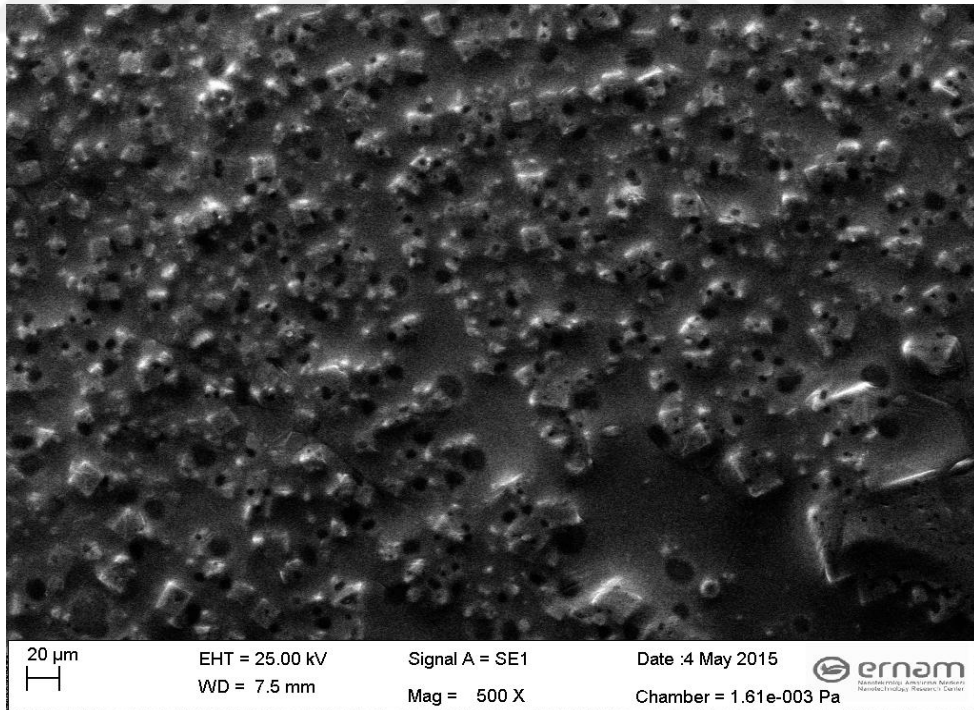
Şekil 3.15. F9 izolantının elektron mikroskop görüntüsü



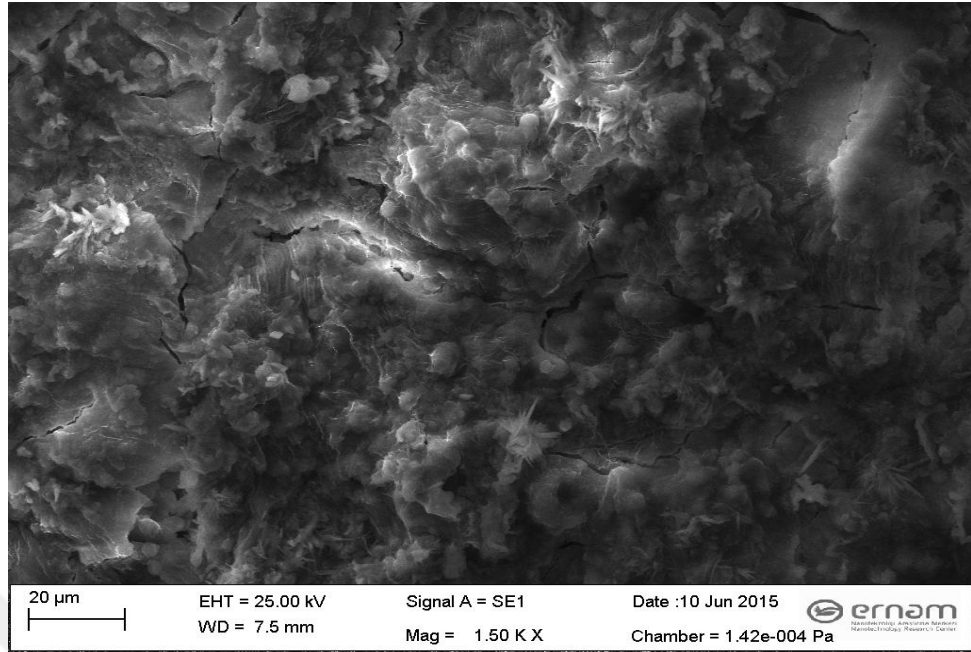
Şekil 3.16. F11 izolantının elektron mikroskop görüntüsü



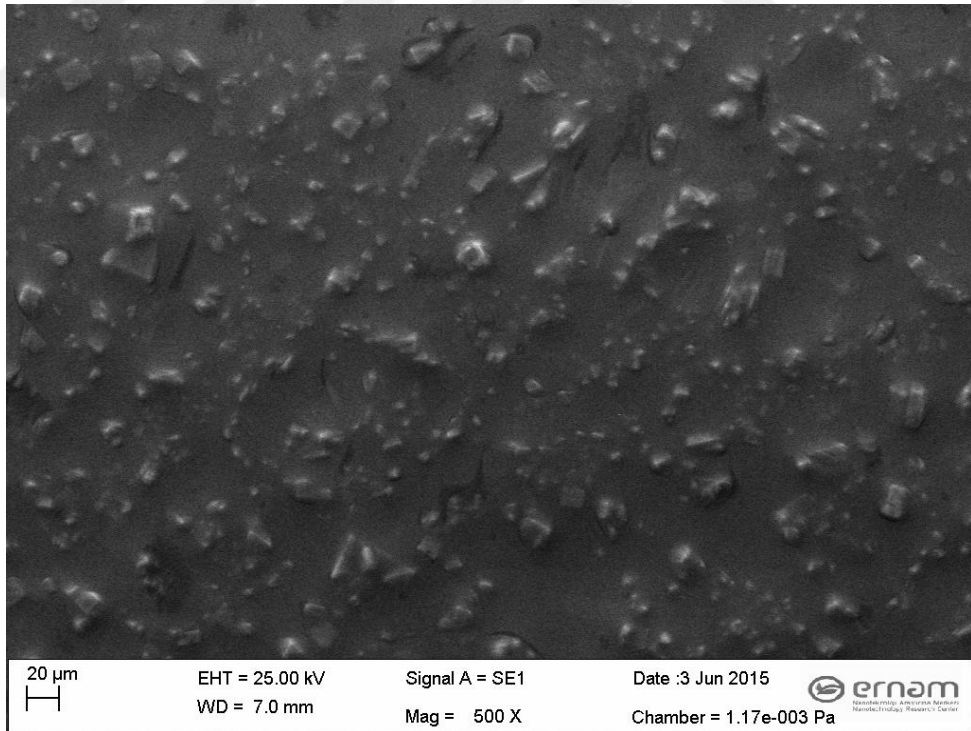
Şekil 3.17. F12 izolatının elektron mikroskop görüntüsü



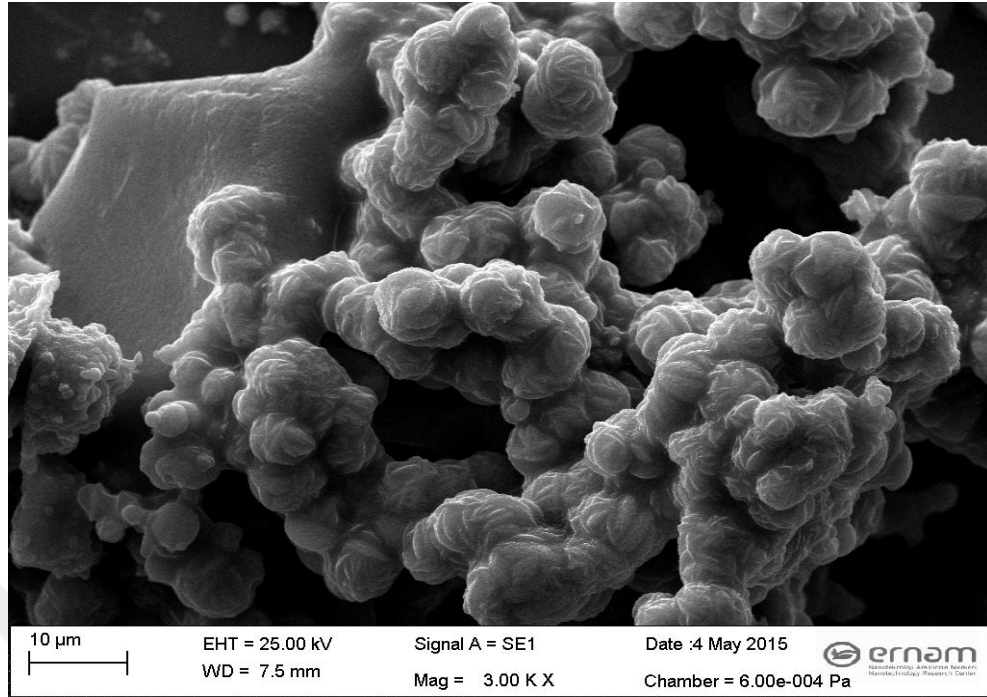
Şekil 3.18. F13 zolatının elektron mikroskop görüntüsü



Şekil 3.19. F14 izolatının elektron mikroskop görüntüsü



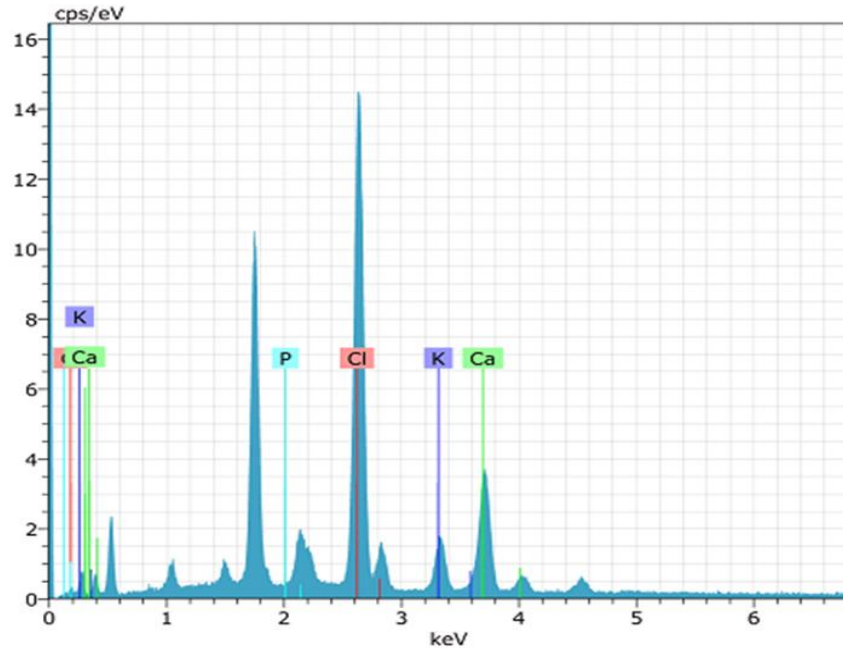
Şekil 3.20. F15 izolatının elektron mikroskop görüntüsü



Şekil 3.21. *S. pasteurii* nin elektron mikroskop görüntüsü

3.6. Enerji Dağılımlı X-Işını Kırınımı (EDX) Analiz Sonuçları

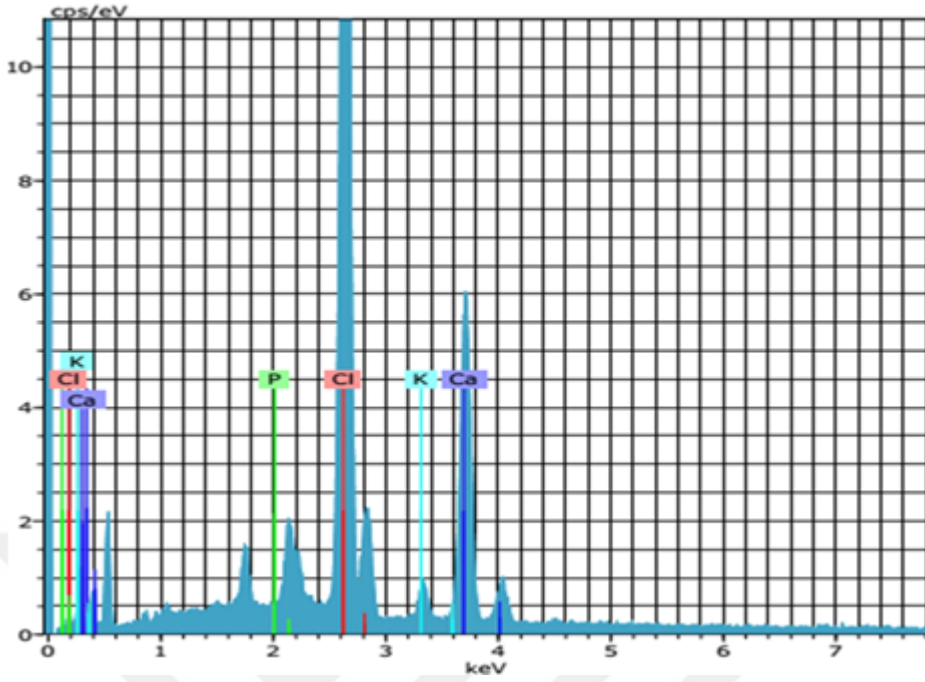
Elektron mikroskop incelemeleri yapılan izolatların aynı zamanda biriktirdiği kalsiyum miktarını belirlemek amacıyla Enerji Dağılımlı X-Işını Kırınımı (EDX) analizleri de yapılmıştır. EDX analizi yapılan bölgelerin görüntüleri şekillerde belirtilmiştir ve alınan sonuçlar grafikte gösterilmiştir. Yapılan analize göre en yüksek kalsiyum birikiminin % 48,52 oranı ile kontrol şusu *S. pasteurii*' de olduğu belirlenmiştir. Endüşük kalsiyum birikiminin ise % 8.53 oranı ile F13 izolatında olduğu belirlenmiştir. Kontrol şusundan sonra en yüksek kalsiyum birikimi %39.25, %38.77 %34.01, %33.03, %31.95, %31.36, %31.10, %30.93 oranı ile sırasıyla F6, F7, F14, F10, F2, F12, F4, F11 izolatlarında belirlenmiştir. Geriye kalan izolatların kalsiyum birikimi ise F1 %29.03, F8 %28.12, F15 % 27.44, F9 % 22.43, F3 %19.78 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 3.22. F1 izolatının EDX analiz grafiği

Tablo 3.20. F1 izolatının EDX analizine göre element miktarları

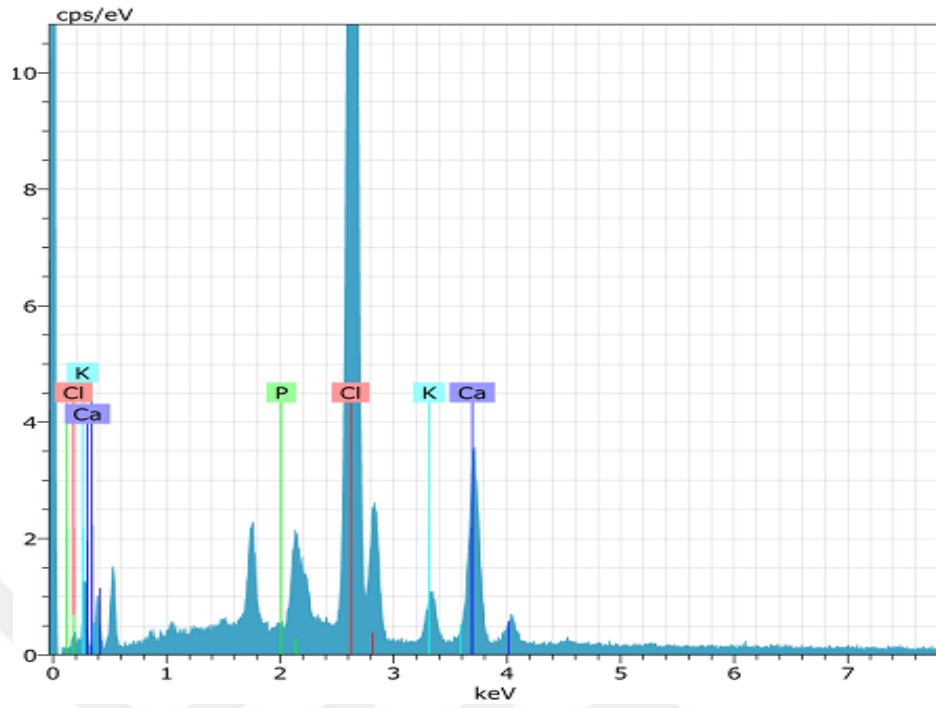
Element	Seriler	Unn. C (% wt.)	Norm C (% wt.)	Atom C (% at.)	Sigma (% wt.)
Cl	K	56,01	56,01	58,38	0,80
Ca	K	29,03	29,03	26,77	0,29
K	K	12,12	12,12	11,46	0,15
P	K	2,84	2,84	3,38	0,08



Şekil 3.23. F2 izolatının EDX analiz grafiği

Tablo 3.21. F2 izolatının EDX analizine göre element miktarları

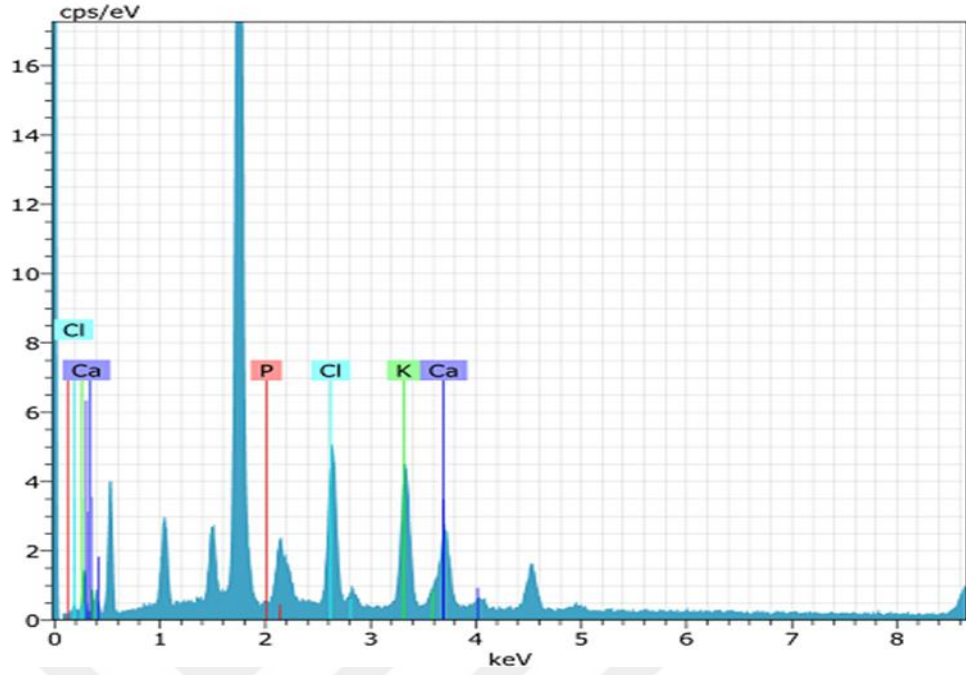
Element	Seriler	Unn. C (% wt.)	Norm C (% wt.)	Atom C (% at.)	Sigma (% wt.)
Cl	K	61,11	61,11	63,51	0,87
Ca	K	31,95	31,95	29,37	0,32
K	K	4,60	4,60	4,34	0,07
P	K	2,34	2,34	2,78	0,07



Şekil 3.24. F3 izolatının EDX analiz grafiği

Tablo 3.22. F3 izolatının EDX analizine göre element miktarları

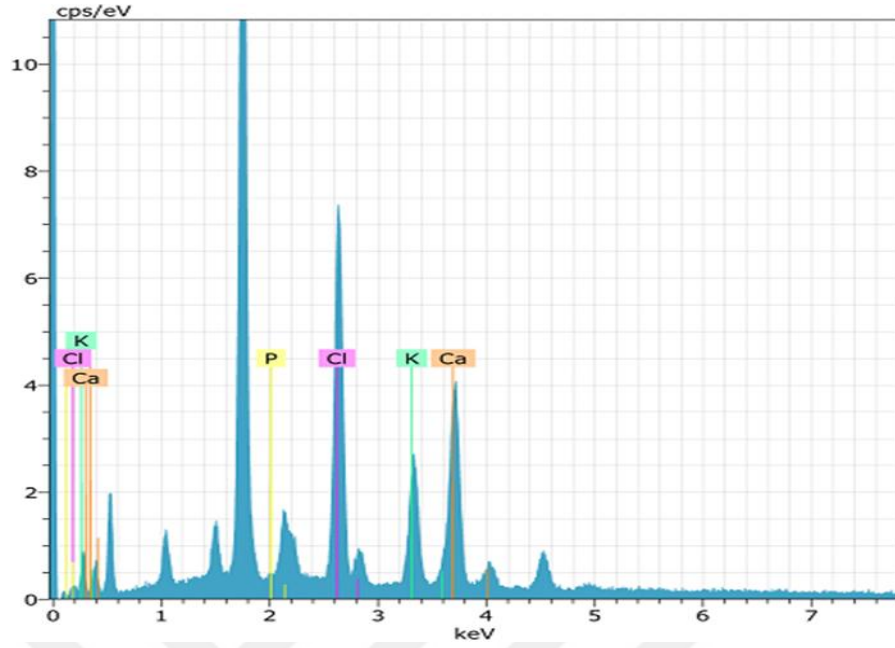
Element	Seriler	Unn. C (% wt.)	Norm C (% wt.)	Atom C (% at.)	Sigma (% wt.)
Cl	K	72,26	72,26	74,12	1,03
Ca	K	19,78	19,78	17,95	0,21
K	K	5,78	5,78	5,38	0,08
P	K	2,18	2,18	2,56	0,07



Şekil 3.25. F4 izolatının EDX analiz grafiği

Tablo 3.23. F4 izolatının EDX analizine göre element miktarları

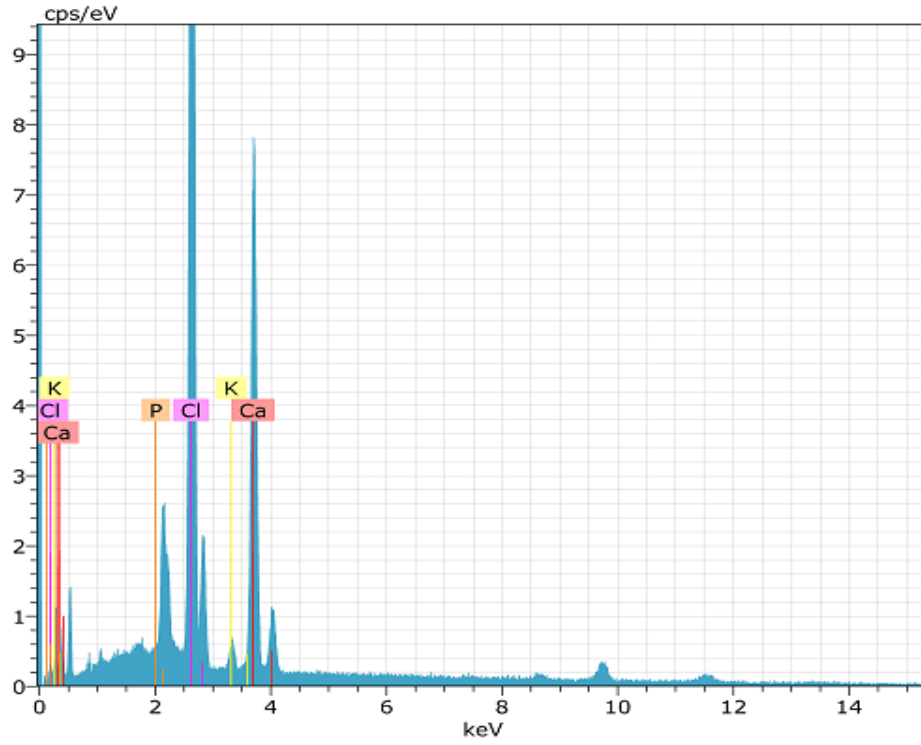
Element	Seriler	Unn. C (% wt.)	Norm C (% wt.)	Atom C (% at.)	Sigma (% wt.)
K	K	35,40	35,40	34,22	0,39
Ca	K	31,10	31,10	29,34	0,31
Cl	K	28,79	28,79	30,69	0,42
P	K	4,71	4,71	5,75	0,12



Şekil 3.26. F6 izolatının EDX analiz grafiği

Tablo 3.24. F6 izolatının EDX analizine göre element miktarları

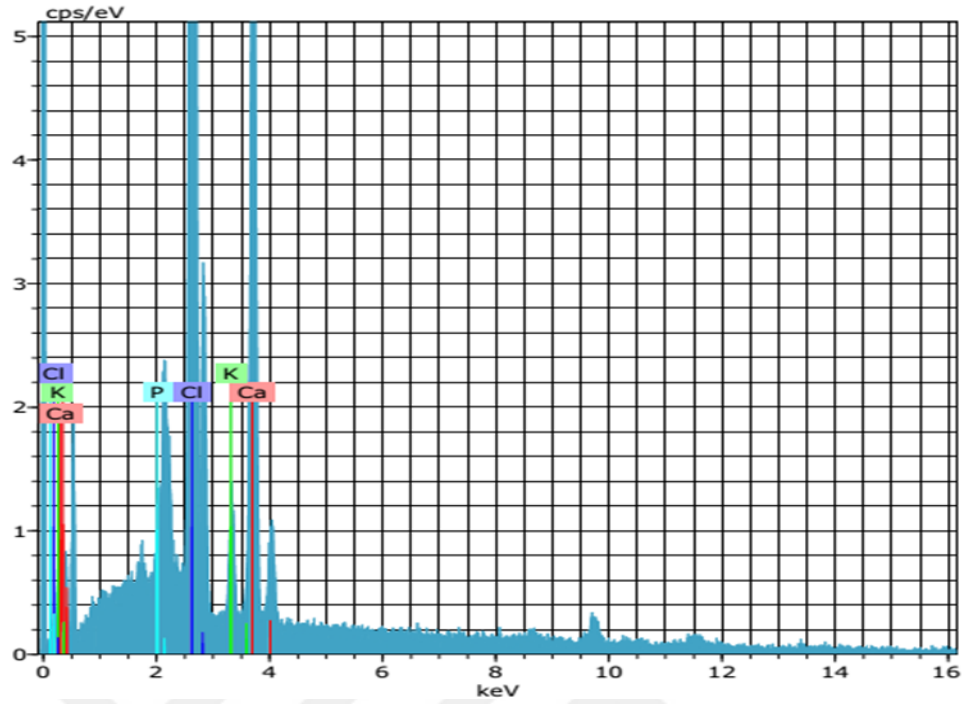
Element	Seriler	Unn. C (% wt.)	Norm C (% wt.)	Atom C (% at.)	Sigma (% wt.)
Ca	K	39,25	39,25	36,90	0,38
Cl	K	36,84	36,84	39,15	0,54
K	K	20,33	20,33	19,59	0,24
P	K	3,58	3,58	4,36	0,09



Şekil 3.27. F7 izolatının EDX analiz grafiği

Tablo 3.25. F7 izolatının EDX analizine göre element miktarları

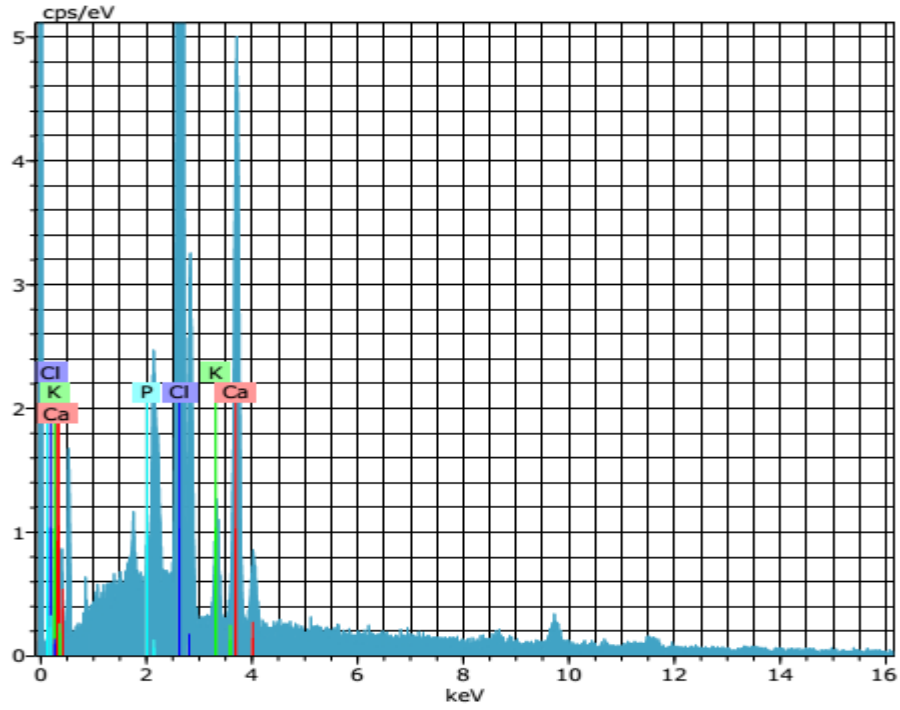
Element	Seriler	Unn. C (% wt.)	Norm C (% wt.)	Atom C (% at.)	Sigma (% wt.)
Cl	K	55,56	55,56	58,12	0,80
Ca	K	38,77	38,77	35,88	0,38
K	K	3,17	3,17	3,00	0,06
P	K	2,50	2,50	3,00	0,07



Şekil 3.28. F8 izolatının EDX analiz grafiği

Tablo 3.26. F8 izolatının EDX analizine göre element miktarları

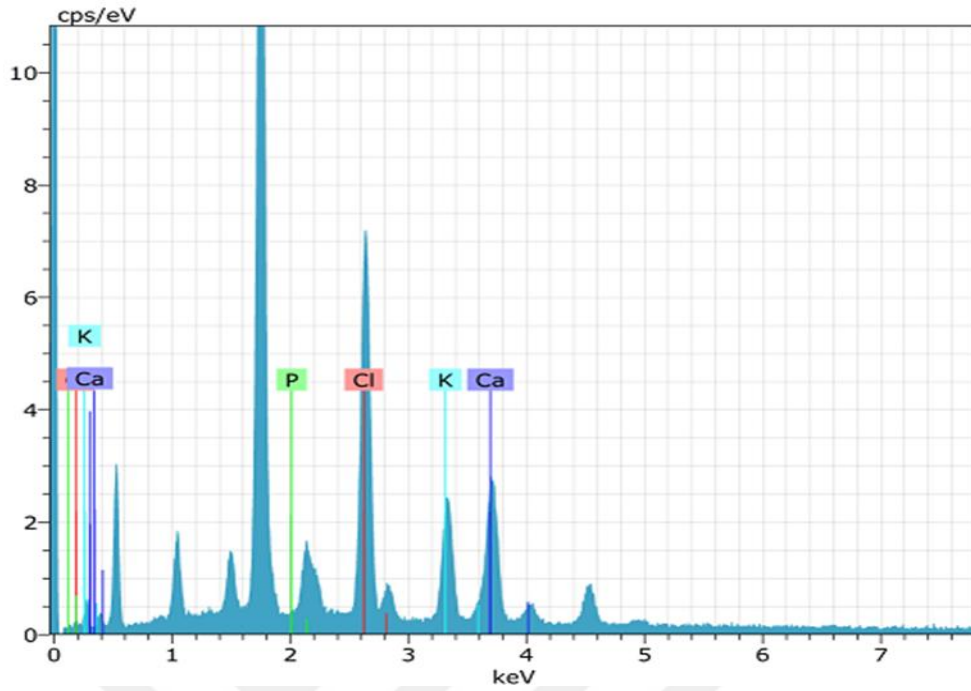
Element	Seriler	Unn. C (% wt.)	Norm C (% wt.)	Atom C (% at.)	Sigma (% wt.)
Cl	K	63,87	63,87	66,03	0,91
Ca	K	28,12	28,12	25,71	0,28
K	K	4,95	4,95	4,64	0,08
P	K	3,06	3,06	3,62	0,08



Şekil 3.29. F9 izolatının EDX analiz grafiği

Tablo 3.27. F9 izolatının EDX analizine göre element miktarları

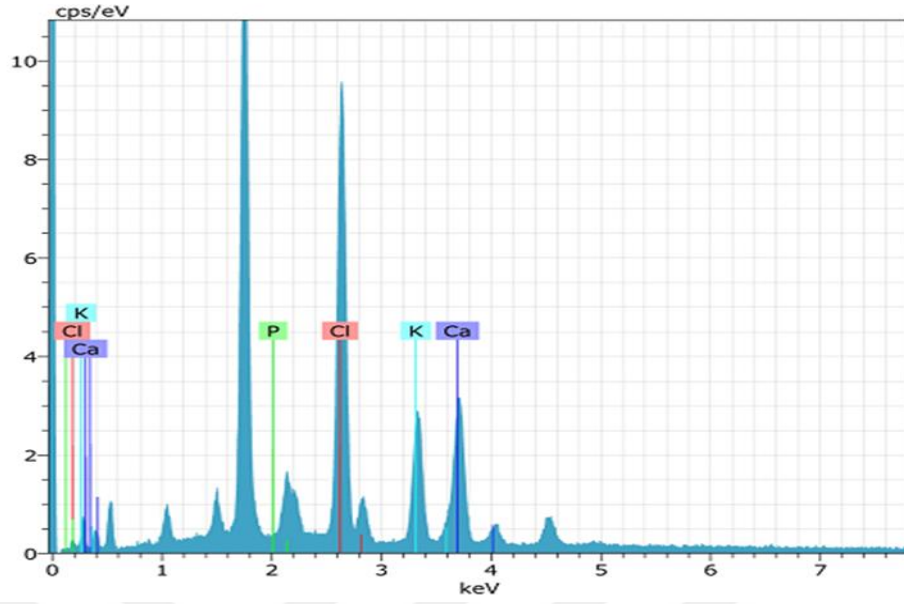
Element	Seriler	Unn. C (% wt.)	Norm C (% wt.)	Atom C (% at.)	Sigma (% wt.)
Cl	K	69,93	69,93	71,87	1,00
Ca	K	22,43	22,43	20,39	0,23
K	K	5,12	5,12	4,77	0,08
P	K	2,53	2,53	2,97	0,07



Şekil 3.30. F10 izolatının EDX analiz grafiği

Tablo 3.28. F10 izolatının EDX analizine göre element miktarları

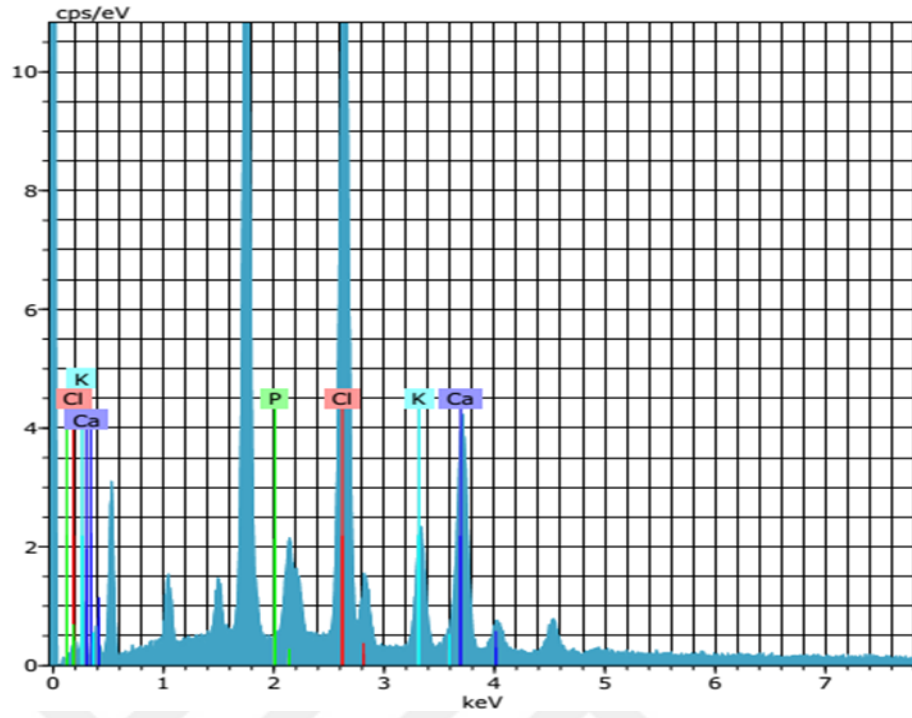
Element	Seriler	Unn. C (% wt.)	Norm C (% wt.)	Atom C (% at.)	Sigma (% wt.)
Cl	K	41,18	41,18	43,51	0,60
Ca	K	33,03	33,03	30,87	0,33
K	K	22,14	22,14	21,21	0,25
P	K	3,65	3,65	4,42	0,10



Şekil 3.31. F11 izolatının EDX analiz grafiği

Tablo 3.29. F11 izolatının EDX analizine göre element miktarları

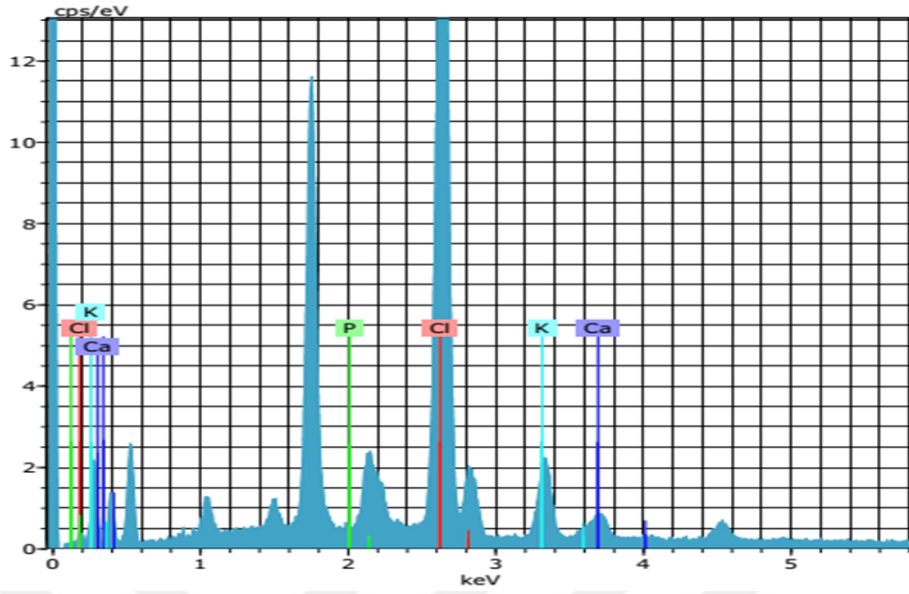
Element	Seriler	Unn. C (% wt.)	Norm C (% wt.)	Atom C (% at.)	Sigma (% wt.)
Cl	K	44,37	44,37	46,80	0,64
Ca	K	30,93	30,93	28,86	0,31
K	K	21,80	21,80	20,85	0,25
P	K	2,89	2,89	3,49	0,08



Şekil 3.32. F12 izolatının EDX analiz grafiği

Tablo 3.30. F12 izolatının EDX analizine göre element miktarları

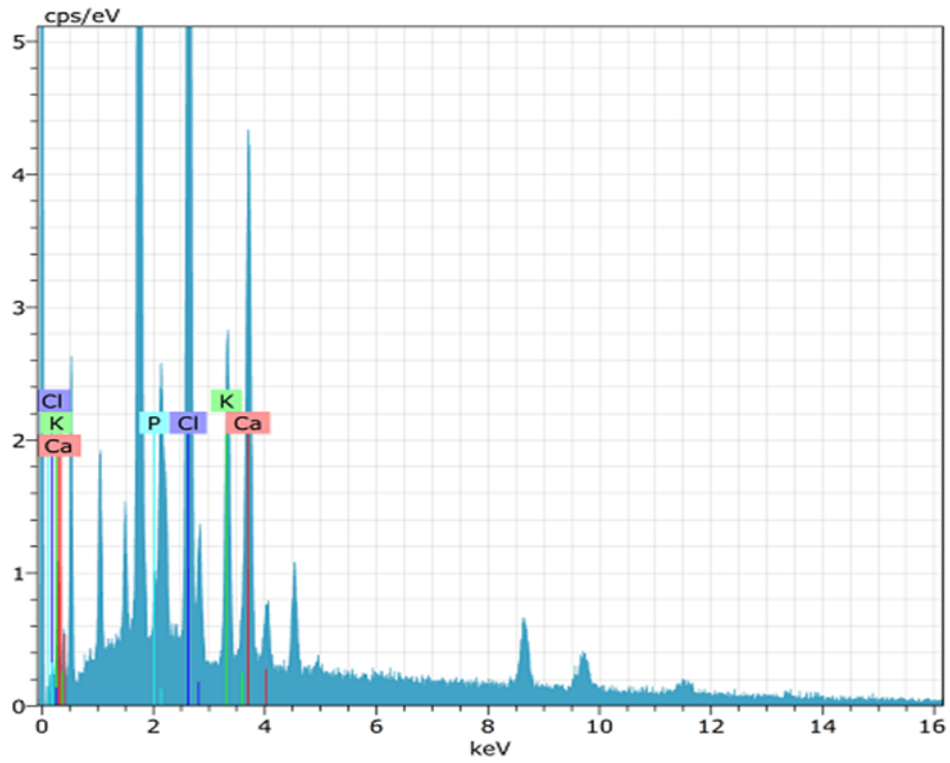
Element	Seriler	Unn. C (% wt.)	Norm C (% wt.)	Atom C (% at.)	Sigma (% wt.)
Cl	K	51,00	51,00	53,42	0,73
Ca	K	31,36	31,36	29,06	0,31
K	K	14,56	14,56	13,83	0,18
P	K	3,08	3,08	3,69	0,08



Şekil 3.33. F13 izolatının EDX analiz grafiği

Tablo 3.31. F13 izolatının EDX analizine göre element miktarları

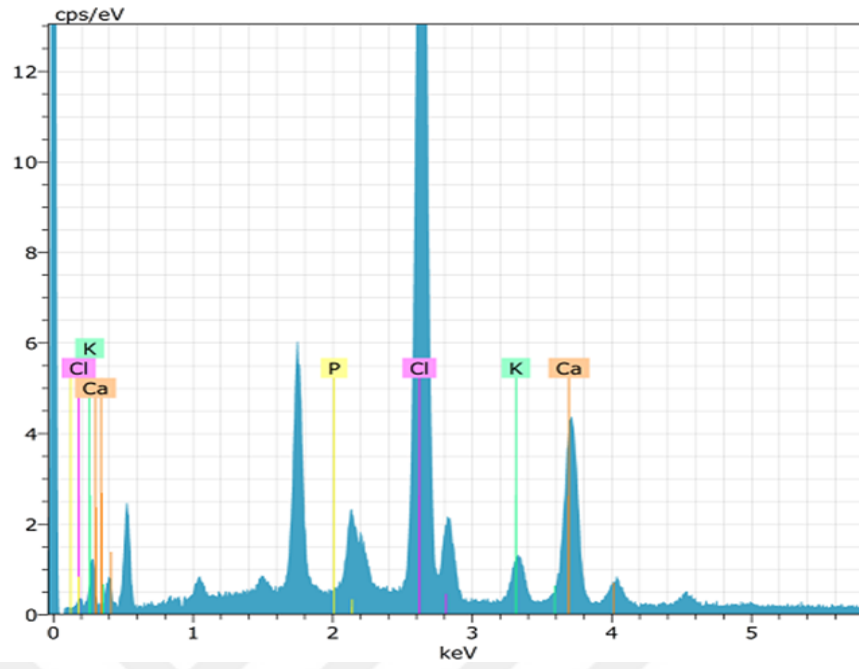
Element	Seriler	Unn. C (% wt.)	Norm C (% wt.)	Atom C (% at.)	Sigma (% wt.)
Cl	K	72,28	72,28	73,77	1,03
K	K	16,04	16,04	14,84	0,19
Ca	K	8,53	8,53	7,70	0,10
P	K	3,16	3,16	3,69	0,09



Şekil 3.34. F14 izolatının EDX analiz grafiği

Tablo 3.32. F14 izolatının EDX analizine göre element miktarları

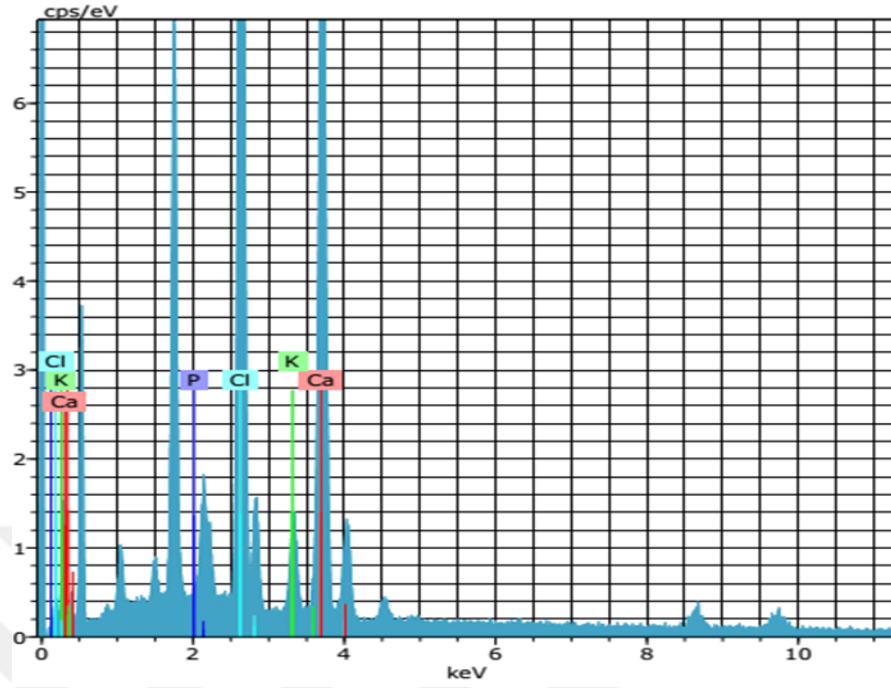
Element	Seriler	Unn. C (% wt.)	Norm C (% wt.)	Atom C (% at.)	Sigma (% wt.)
Cl	K	43,65	43,65	45,91	0,63
Ca	K	34,01	34,01	31,65	0,34
K	K	17,86	17,86	17,04	0,21
P	K	4,48	4,48	5,40	0,11



Şekil 3.35. F15 izolatının EDX analiz grafiği

Tablo 3.33. F15 izolatının EDX analizine göre element miktarları

Element	Seriler	Unn. C (% wt.)	Norm C (% wt.)	Atom C (% at.)	Sigma (% wt.)
Cl	K	62,21	62,21	64,46	0,89
Ca	K	27,44	27,44	25,15	0,28
K	K	7,64	7,64	7,18	0,10
P	K	2,71	2,71	3,21	0,08



Şekil 3.36. *S. pasteurii* bakterisinin EDX analiz grafiği

Tablo 3.34. *S. pasteurii* bakterisinin EDX analizine göre element miktarları

Element	Seriler	Unn. C (% wt.)	Norm C (% wt.)	Atom C (% at.)	Sigma (% wt.)
Ca	K	48,52	48,52	45,60	0,47
Cl	K	42,37	42,37	45,02	0,61
K	K	6,72	6,72	6,47	0,09
P	K	2,39	2,39	2,91	0,07

4. BÖLÜM

4.1. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada kullanılan bakteri örneklerinin 14 tanesi çoğunluğu inşaat alanlarında alınan toprak örneklerinden izole edilmiştir. Toprak örnekleri, içerisinde % 2 oranında üre bulunan besiyerinde inkübe edilmiş ve daha sonra seyreltmeler yapılarak üre agar besiyerine ekim yapılmıştır. Sarı renkli olan üre agar besiyerini pembe renge çeviren izolatlar tanımlanmak üzere seçilmiştir. İzolatların tür seviyesinde tanımlanması 16S rRNA bölgelerinin çoğaltılması ve PZR ürünlerinin analizi ile gerçekleştirilmiştir.

Bacillus cinsi bakterilerin sınıflandırılmasında, aerobik, Gram-pozitif, çubuk şekilli olmaları ve endospor oluşturmaları önemli yer tutmasına rağmen, türlerin ayrımının güç olduğu ve yanlış tanımlamalar yapılabileceği bildirilmektedir. Yüksek derecedeki heterojenitenin standart testler ile tanımlamayı zorlaştırdığı ifade edilmektedir. Cinsin sahip olduğu geniş fenotipik çeşitliliğin aynı zamanda geniş bir filogenetik dağılıma neden olduğu ve gelişmiş moleküler tekniklerle elde edilen kriterlerin organizmaların gruplandırılmasında esas yeri teşkil ettiği belirtilmiştir [9].

Ribozomal RNA genleri (rDNA) (16S, 23S ve 5S) bakterilerde yüksek derecede korunmuş bölgelerdir. Özellikle de 16S rRNA genleri bakteri türleri arasında filogenetik yakınlığın belirlenmesi için oldukça sık kullanılmaktadır [62].

16S rRNA' dan oluşturulan DNA probları *Staphylococcus*, *Listeria* ve *Legionella* türlerinin tanımlanması [61], karışık mikrobiyal populasyonların ve anaerobik siliatlardan endosimbiyotik sülfat indirgeyici bakterilerin tanımlanması gibi birçok çalışmada kullanılabilir [63].

Çalışmamızda topraktan izole edilen bakteriler üre ilave edilerek zenginleştirilmiş besi ortamına ekilerek çoğaltılmıştır ve üreaz aktivitesine sahip olan toplam 14 izolatın tanımlanmaları 16S rRNA dizi analizi ile yapılmıştır (Bkz. Tablo 3.2). Gen bankasındaki kayıtlı 16S rRNA dizileri ile yapılan karşılaştırma sonucuna göre kok şekilli 3 tane izolatın *Staphylococcus pasteurii* türüne ait olduğu belirlenmiştir. Bu izolatlardan F1 izolatının *Staphylococcus pasteurii* ATCC 51129 (NR_024669.1) suşu ile % 98 oranında benzerlik gösterdiği, F2 izolatının *Staphylococcus pasteurii* ATCC 51129 (NR_114435.1) suşu ile % 92 oranında benzerlik gösterdiği, F3 izolatının ise *Staphylococcus pasteurii* ATCC 51129 (NR_024669.1) suşu ile % 99 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Diğer izolatların ise *Bacillus* cinsine ait olduğu belirlenmiştir. Bu izolatlardan F4 izolatının *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792 (NR_114581.1) suşu ile % 99 oranında benzerlik gösterdiği, F6 izolatının *Bacillus subtilis* JCM 1465 (NR_113265.1) suşu ile % 99 oranında benzerlik gösterdiği, F7 izolatının *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792 (NR_114581.1) suşu ile % 82 oranında benzerlik gösterdiği F8 izolatının *Bacillus macroides* LMG 18474 (NR_114920.1) suşu ile % 96 oranında benzerlik gösterdiği, F9 izolatının *Bacillus macroides* LMG 18474 (NR_114920.1) suşu ile % 99 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

F10 izolatının *Bacillus mycoides* NBRC 101228 (NR_113990.1) suşu ile % 98 oranında benzerlik gösterdiği F11 izolatının *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792 (NR_114581.1) suşu ile % 99 oranında benzerlik gösterdiği, F12 izolatı *Bacillus macroides* LMG 18474 (NR_114920.1) suşu ile % 98 oranında benzerlik gösterdiği F13 izolatı *Bacillus macroides* LMG 18474 (NR_114920.1) suşu ile % 98 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. F14 izolatının *Bacillus thuringiensis* Bt407 (NR_102506.1) suşu ile % 96 oranında benzerlik gösterdiği, F15 izolatının *Bacillus mycoides* NBRC 101228 (NR_113990.1) suşu ile % 96 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Mikrobiyal çimento üretim teknolojisi doğal kumtaşı oluşumunu taklit eden bir proses olup, uygun mikroorganizma ve ortam seçimi ile istenen yüzeylerde kalsit oluşumu prensibine dayanmaktadır. Mikroorganizma ortamda bulunan partikülleri birleştirici bir mekanizmayla kalsit oluşumunu gerçekleştirmekte ve sentetik çimentodan daha güçlü bir yapı oluşturmaktadır [1]. Biyoçimento oluşumu mikroorganizmaların metabolik

prosesleri sayesinde karbonat çökeltimine sebep olarak ve kalsiyum varlığında karbonat ile birleşerek, kalsiyum karbonat şeklinde çökeltmesiyle gerçekleşmektedir [2].

Çalışmamız sonucunda tanımlanan *Bacillus* ve *Stahyplococcus* türlerinin üreaz enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Kontrol grubu ile yapılan karşılaştırma sonucunda *S. pasteurii* türlerinin enzim aktivitesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. *S. pasteurii* izolatları arasında F1 (*S. pasteurii*)'in $9,2848 \pm 0,00$ U/mg değeri ile en yüksek üreaz aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. F2 (*S. pasteurii*) ve F3 (*S. pasteurii*)'ün üreaz aktivitesi ise sırasıyla $9,0933 \pm 0,00$ ve $9,0859 \pm 0,05$ U/mg olarak belirlenmiştir.

Bacillus cinsine ait olan türler arasında en yüksek aktiviteye sahip olan tür ise $8,5099 \pm 0,00$ U/mg değeri ile F10 (*B. mycoides*) izolatı olarak belirlenmiştir. F9 (*B. macroides*), F6 (*B. subtilis*), F12 (*B. macroides*), F7 (*B. thuringiensis*) ve F4 (*B. thuringiensis*) izolatlarının spesifik aktiviteleri sırasıyla $8,2134 \pm 0,00$, $7,9634 \pm 0,03$, $7,5776 \pm 0,01$, $7,2607 \pm 0,16$ ve $6,5950 \pm 0,08$ U/mg olarak belirlenmiştir. F8 (*B. macroides*), F11 (*B. thuringiensis*), F13 (*B. macroides*), F15 (*B. mycoides*) bakterilerinin spesifik aktivitesi diğer bakterilere göre düşük olduğu tespit edilmiştir. Diğer bakteriler ile karşılaştırıldığında en düşük spesifik aktiviteye sahip olan bakterinin $2,7510 \pm 0,04$ U/mg değeri ile F14 (*B. thuringiensis*) izolatı olduğu tespit edilmiştir.

Azarno (2013) yaptığı tez çalışmasında *Streptomyces spp*, *Bacillus* ve *Klebsiella oxytoca* türlerinin üreaz aktivitesini araştırmıştır. Araştırma sonuçlarına göre *Streptomyces spp* türlerinin üreaz enzim aktivitesine sahip olduğunu *Bacillus* ve *K. oxytoca* türlerinin ise yeteri kadar üreaz aktivitesi göstermediğini belirlemiştir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada *Bacillus* türlerinin üreaz enzim aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir [64].

Sarda ve Choonia (2009) tarafından Hindistan' da yapılan çalışmada; biyokalsifikasyonun üreaz enziminin aktivitesine bağlı olarak meydana geldiği belirtilmiştir. Çalışmada toprak bakterisi olan *Bacillus pasteurii* NCIM 2477 kullanılmıştır. Karbonat iyonlarının çökeltimi sonucu olarak CaCO_3 meydana gelmesiyle birlikte, üreaz enzimi yolu ile CO_2 ve amonyak haline gelmesi için üreazın parçalanması gerektiği ve orjinal uygulamalara benzer örneklerin geliştirilmesi ile çeşitli üreaz aktivitesi gösteren mikroorganizmalar kullanılarak üreaz miktarını artırma ihtiyacının bulunduğu açıklanmıştır [55].

Üreaz aktivitesi belirlenen izolatların CaCl_2 varlığında katı ve sıvı besiyeri ortamı içerisinde kalsiyum karbonat birikimleri belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda katı besiyerinde karbonat oluşumuna bağlı olarak izolatların bazılarında zon çapı artışı olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen ölçümlere göre en fazla zon artışının kok şekilli F2 (*S. pasteurii*) ve F3 (*S. pasteurii*) izolatlarında 2.5 mm, F1 (*S. pasteurii*) izolatında 2 mm olduğu gözlenmiştir. *Bacillus* cinsine ait türler arasında ise F14 (*B. thuringiensis*) ve F7 (*B. thuringiensis*) izolatlarında 2 mm zon artışı olduğu tespit edilirken kontrol suşu olan *Bacillus pasteurii* de ise 1 mm zon artışı olmuştur. F8 (*B. macroides*) ve F6 (*B. subtilis*) izolatlarında 1mm zon artışı gözlemlenmiştir. F4 (*B. thuringiensis*) ve F9 (*B. macroides*), F10 (*B. mycoides*) izolatlarında 0.5mm zon artışı gözlenirken F11 (*B. thuringiensis*) ve F13 (*B. macroides*), F15 (*B. mycoides*) izolatlarında ise zon artışı gözlenmemiştir.

Üre ve kalsiyum klorid ile desteklenmiş sıvı besiyerinde yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlara göre en fazla CaCO_3 birikimi 0,5324 gr ile kontrol suşu olan *Sporosarcina pasteurii* de gözlenmiştir. Kontrol suşundan sonra en fazla CaCO_3 birikimi F9 (*B. macroides*) de 0,2011 gr, daha sonra kok şekilli izolat olan F3 (*S. pasteurii*) de 0,1922 gr olarak ölçülmüştür. F8 (*B. macroides*) izolatında 0,1829 gr, kok şekilli F1 (*S. pasteurii*) izolatında 0,1707 gr ve F2 (*S. pasteurii*) izolatında 0,1640 gr olarak ölçülmüştür. F15 (*B. mycoides*) izolatında 0,1236 gr, F10 (*B. mycoides*) izolatında 0,0906 gr, F12 (*B. macroides*) izolatında 0,0778 gr, F11 (*B. thuringiensis*) izolatında 0,0753 gr, F14 (*B. thuringiensis*) izolatında 0,0672 gr, F6 (*B. subtilis*) izolatında 0,0472 gr, F7 (*B. thuringiensis*) 0.471 gr CaCO_3 birikimi ölçülmüştür. En az CaCO_3 birikimi ise F4 (*B. thuringiensis*) izolatında 0,0344 gr olarak belirlenmiştir.

İzolatların kalsiyum karbonat birikimi taramalı elektron mikroskobu ile de tespit edilmiştir. SEM analizi sonuçlarına göre izolatların kalsiyum karbonat birikimini gerçekleştirdikleri belirlenmiştir. Aynı zamanada kalsiyum miktarları da EDX ile analiz edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda en yüksek kalsiyum birikiminin % 48,52 oranı ile kontrol suşu *Sporosarcina pasteurii* de olduğu belirlenmiştir. En düşük kalsiyum birikimini ise % 8.53 oranı ile F13 izolatında olduğu belirlenmiştir. Kontrol suşundan sonra en yüksek kalsiyum birikimi % 39.25, % 34.01, % 33.03, % 31.95, % 31.36, % 31.10, % 30.93 oranı ile sırasıyla F6, F14, F10, F2, F12, F4, F11 izolatlarında

belirlenmiştir. Geriye kalan izolatların kalsiyum birikimi ise F1 % 29.03, F8 % 28.12, F15 % 27.44, F9 % 22.43, F3 % 19.78 olarak tespit edilmiştir.

Üreaz aktivitesi ve sıvı besiyerinde kalsiyum karbonat birikimi birlikte değerlendirildiğinde genel olarak enzim aktivitesine sahip izolatlarda biyokalsifikasyon özelliğinin de olduğu görülmüştür.

Alhour (2013) yaptığı tez çalışmasında zenginleştirme kültürü tekniği ile 33 adet üreaz aktivitesine sahip izolat elde etmiştir. Bu izolatlardan 13 tanesinin biyokalsifikasyon özelliğine sahip olduğu ve *B. mycooides* olarak tanımlanan izolatın yüksek performans gösterdiği belirlenmiştir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada da en yüksek üreaz aktivitesi gösteren izolat *B. mycooides* olarak tanımlanmıştır [42].

Akoğuz (2014)'un yapmış olduğu çalışma kapsamında zemin iyileştirme tekniklerine yeni bir yaklaşım olarak bakteriler ile iyileştirmenin yapılabilirliği araştırılmıştır. Bakteri olarak *Bacillus arenosi* ve zemin olarak da kum kullanılmıştır. SEM, XRD, EDX ile analizler yapılmıştır. Farklı pH değerlerinde hazırlanan sıvı besiyerlerine bakteri inokülasyonu yapılarak inkübe edilmiştir. En iyi sonuç pH 8,0 değerinde hazırlanan sıvı besiyeri ile elde edilmiştir. Zemine uygulama sonrasında en iyi sonuç, kültür ortamına CaCl₂ stok çözelti eklendikten sonra oluşan pelletin santrifüj ile çökelti olarak uygulanması ile elde edilmiştir. SEM görüntülerinden zemin daneleri arasındaki boşlukların azaldığı, yüzeylerinin kaplandığı ve taneler arası bağların oldukça arttığı gözlemlenmiştir. XRD ve EDX analizleri ile bakteri olmadan sadece sıvı besiyeri ile reaksiyonun gerçekleşmediği tespit edilmiş kültür ortamı uygulanan zeminlerde ise kalsit oranının arttığı belirlenmiştir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada da CaCl₂ ile desteklenmiş besi ortamında izolatların kalsifikasyonu gerçekleştirdiği yapılan SEM ve EDX analizleri ile gösterilmiştir [65].

Whiffin (2004) yapmış olduğu çalışmada, *P. vulgaris* ve *S. pasteurii* bakterilerini karşılaştırarak ekonomik yönden ve kullanılabilirlik yönünden hangisinin daha uygun olduğunu araştırmıştır. pH kontrolü, üre aktivitesi, zemin kirlilik oranı gibi faktörlerinin gelişimi etkilediğini bulmuştur. Optimum bakteri büyüme pH değeri 9,25 bulunmuş, ancak diğer pH değerlerinde de üre aktivitesi oluşumunu gözlemlemiştir. Ancak üreaz aktivitesinin çok olmasının oluşacak kütlenin de çok olacağı anlamına gelmediğini bundan dolayı da diğer faktörlerinde etkili olduğunu, sadece pH kontrolü ile kütle

oluşumunun kontrol edilemeyeceğini göstermiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada da enzim aktivitesi yüksek olan izolatlarda zon çapının artmamış olması bu şekilde açıklanabilir [45].

Achal ve ark. (2010) yapmış oldukları çalışmada alkalın çimento örneklerinden zenginleştirilmiş kültür tekniğini kullanarak CT2 ve CT5 olarak kodlanan iki bakteri izole etmişlerdir. İzole edilen bakteriler 16S rRNA dizi analizine göre *Bacillus* türü olarak tanımlanmıştır. Bakterilerin üreaz üretimi CT2 için 575,87 U/ml, CT5 için 670,71 U/ml olarak belirlenmiştir. Elektron mikroskobu ile yapılan analiz sonucunda iki izolatın kalsit oluşumu gerçekleştirdiğini tespit etmişlerdir. Yaptıkları çalışma ile izole edilen iki *Bacillus* türünün çeşitli bina veya beton yapılarda çatlaklar ve çatlakların iyileştirilmesinde kullanılabilme potansiyeline sahip olduğunu önermişlerdir [13]. Yapmış olduğumuz çalışmada biyokalsifikasyon özelliğine sahip *B. macroides* olarak tanımlanan F13 ve F9 izolatlarının sıvı besiyerinde fazla miktarda kalsit oluşumu gerçekleştirdikleri tespit edilmiştir. Bu izolatlar üzerinde yapılacak çalışmaların optimize edilmesi sonucunda çatlakların onarımında kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Bu çalışmada topraklardan alınan örneklerden üreaz aktivitesine sahip olan *Bacillus* türlerinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen bakterilerin tanımlanmaları morfolojik özellikler ve 16 S rRNA dizi analizine göre yapılmıştır. Tür seviyesinde tanımlanan izolatların üreaz aktiviteleri belirlenmiş ve aktivite gösteren bakterilerin biyokalsifikasyon özellikleri belirlenmeye çalışılmıştır. Yapılan çalışmada *Bacillus* cinsine ait olan tanımlanmış bakterilerin kontrol suşu olan *Sporosarcina pasteurii* türünden daha az biyokalsifikasyon özelliği gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak yapılacak olan ilave çalışmalarla bu türlerin biyokalsifikasyon özelliklerinin tam olarak optimize edilmesi gerekmektedir.

Aynı zamanda çalışmamızda *Bacillus* türlerine ilave olarak *Staphylococcus pasteurii* türü de tanımlanmıştır. Bu bakteri türü ile ilgili olarak, biyokalsifikasyon özelliğinin belirlenmesi açısından literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamız, üreaz aktivitesine sahip olan bu türlerin biyokalsifikasyon özelliklerinin belirlenmesi konusunda yapılan ilk çalışma olmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, *Staphylococcus pasteurii* türlerinde kontrol suşuna yakın değerlerde aktivite ve kalsifikasyon tespit edilmiştir. Bu nedenle *Staphylococcus pasteurii* türlerinde ve farklı üreaz aktivitesi gösteren mikroorganizmalarda biyokalsifikasyon özelliklerinin araştırılmalarının daha

da arttırılması ve standart bir üretim için optimizasyonun sağlanması gerekmektedir. Aynı zamanda kalsifikasyon olayında anahtar bileşen olan üreaz enziminin daha etkili ve yüksek aktivitede belirlenmesi için daha fazla çalışmanın yapılması gerekmektedir.



KAYNAKLAR

1. Dymond S ., 2004, Patent application PCT/AU2005/001927 (WO06066326), made by Murdoch University and calcite technology (pvt) Ltd. National phase filed in multiple countries.
2. Gonsalves, G.M., 2011, Bioconcrete- A Sustainable Substitute for Concrete. **Universitat Politècnica de Catalunya. Master Thesis**, 80p
3. Chahal N., Rajor A. and Siddique R. ,2011. Calcium carbonate precipitation by different bacterial strains. **African Journal of Biotechnology**, 10 (42), 8359-8372.
4. Castanier, S., Metayer-Levrel, G.Le., Perthuisot, J.P., 1999. Ca-carbonates precipitation and limestone genesis–the microbiolgeologist point of view. **Sedimentary Geology**, 126, 9-23.
5. Hammes, F. and Verstraete, W., 2002. Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. **Environmental Science and Biotechnology**, 1,3-7.
6. Ariyanti, D., Handayani, N and Hadiyanto., 2012. Feasibility of using Microalgae for biocement production through biocementation. **Journal of Bioprocess and Biotechniques** 2(111): 1-4.
7. Knorre H., Krumbein W.2000. Bacterial calcification.In:Riding RE,Awramik SM (Eds),microbial Sediments. **Springer- Verlag, Berlin, Germany**,25-31.
8. Kot, M., Karcz, W. and Zaborska, W., 2010. 5-Hydroxy-1,4-naphthoquinone (juglone) and 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (lawsone) influence on jack bean urease activity: Elecidation of the difference in inhibition activity, **Bioorganic Chemistry** 38, 132–137.
9. Rosovitz,M.J.,Voskuil,M.I.,Chambliss,G.H.,1998. *Bacillus*, Topley and Wilson’s Microbiology and Microbial Infections, Systematic Bacteriology’’9nd Edition, Volume 2 ,by edited Collier L., Balows, A. and Susman, M.,Oxford University Pres, New York,709-730.
10. Wipat,A.,Harwood,CR.,1999. The *Bacillus subtilis* genome sequence:the molecular blueprint of a soil bacterium ,**FEMS Microbiology Ecology**,28:1-9.
11. Braissant,O.,Verrecchia, E.P. and Aragno, M.2002. Is the contribution of bacteria to terrestrial carbon budget greatly underestimated. **Naturwissenschaften**, 89(8): 366-370.

12. Dick J., Windt WDe, Graef BD., Saveyn H., Meeran PV., Belie N., Verstraete W. 2006. Biodeposition of a calcium carbonate layer on degraded limestone by *Bacillus* species. **Biodegradation**; 17(4): 357- 67.
13. Achal V., Mukherjee A., and Reddy M. S., 2010. Characterization of two urease-producing and calcifying *Bacillus* spp. isolated from cement. **Journal of Microbiology Biotechnology**. 20(11), 1571–1576.
14. Sneath, P. H. A., 1986. Endospore-forming Gram-Positive Rods and Cocci, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2, edited by PHA Sneath, N.S., Mair, M.E., Sharpe, J.G., Williams and Wilkins, Holt, 1104-1139.
15. <https://www.trade.indiamart.com> (Erişim tarihi:17.05.2016)
16. Arda, M. 2000. Temel mikrobiyoloji, Medisan Yayınları, Ankara, 548.
17. Tunail, N. ve Köşker, Ö., 1986. Süt mikrobiyolojisi. **Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları**, Ankara, 966:138.
18. Burke, Q. F., McDonald, K. O. and Davidson, E. W., 1983. Effect of UV light on spore viability and mosquito larvicidal activity of *Bacillus sphaericus* 1593. **Applied and Environmental Microbiology**, 954-956.
19. Giffel, M. C., Beumer, R. R., Granum, P. E. and Rombouts, F. M., 1997. Isolation and characterisation of *Bacillus cereus* from pasteurised milk in household refrigerators in the Netherland. **International Journal of Food Microbiology**, 34: 307-318.
20. Johnvesly, B. and Naik, G. R., 2001. Pigeon pea waste as a novel, inexpensive, substrate for production of a thermostable alkaline protease from thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. **Process Biochemistry**, 37, 139-144.
21. Singh, U and Kapoor, K., 2010. Microbial Biotechnology. Oxford Book Company, P:1
22. Ghosh, P and Mandal, S ., 2006. Development of bioconcrete material using an enrichment culture of novel thermophilic anaerobic bacteria. **Indian Journal of Experimental Biology** 44(4): 336-339.
23. Stabnikov, V., Naeimi, M., Ivanov, V and Chu, J., 2011. Formation of water-impermeable crust on sand surface using biocement. **Cement and Concrete Research**, 41(11): 1143-1149.

24. Ivanov, V and Chu, J 2008. Applications of microorganisms to geotechnical engineering for bioclogging and biocementation of soil in situ. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology** 7(2): 139-153.
25. Okwadha, G and Li, J., 2011. Biocontainment of polychlorinated biphenyls (PCBs) on flat concrete surfaces by microbial carbonate precipitation. **Journal of Environmental Management** 92(10): 2860-2864.
26. Annamalai, S., Arunachalam, K and Sathyanarayanan, K., 2012. Production and characterization of Bio Caulk by *Bacillus pasteurii* and its remediation properties with carbon nano tubes on concrete fractures and fissures. **Materials Research Bulletin** 47(11): 3362–3368.
27. Stocks-Fischer, S., Galinat, J and Bang, S., 1999. Microbiological precipitation of CaCO₃. **Soil Biology and Biochemistry** 31(11): 1563-1571.
28. Bachmeier, K., Williams, A., Warmington, J and Bang, S 2002. Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation. **Journal of Biotechnology** 93(2): 171-181.
29. Kucharski, E., Winchester, W., Leeming, W., Cord-Ruwisch, R., Muir, C., Banjup, W., Whiffin, V., Al-Thawadi, S and Mutlaq, J .,2005. Microbial biocementation. Patent Application WO/2006/066326; **International Application**.
30. Atmaca, S., Elci, S and Gul, K 1996. Comparison of slime production under aerobic and anaerobic conditions. **Cytobios** 88(354): 149-152.
31. Lovley, D., Holmes, D and Nevin, K .,2004. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Advances in Microbial Physiology* 49: 219–286.
32. Weber, K., Achenbach, L and Coates, J .,2006. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. **Nature Reviews Microbiology** 4: 752–764.
33. Fredrickson, J and Gorby Y 1996. Environmental processes mediated by iron-reducing bacteria. **Current Opinion in Biotechnology** 7(3): 287–294.
34. Ivanov, V., Wang, J., Stabnikova, O., Krasinko, V., Stabnikov, V., Tay, S and Tay, J., 2004. Iron-mediated removal of ammonia from strong nitrogenous wastewater of food processing. **Water Science and Technology** 49(5-6): 421–431.
35. Ivanov, V., Stabnikov, V., Zhuang, W., Tay, S and Tay, J 2005. Phosphate removal from return liquor of municipal wastewater treatment plant using iron-reducing bacteria. **Journal of Applied Microbiology** 98(5): 1152–1161.

36. Stabnikov, V and Ivanov, V ., 2006. The effect of iron hydroxide concentrations on the anaerobic fermentation of sulfatecontaining model wastewater. **Applied Biochemistry and Microbiology** 42(3): 284-288.
37. Wingender, J., Neu, T and Flemming, H .,1999. Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure and function. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg.
38. Jones, A., Brown, J., Mishra, V., Perry, J., Steigerwalt, A and Goodfellow, M .,2004. *Rhodococcus gordoniae* sp. nov., an actinomycete isolated from clinical material and phenol contaminated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 54(2):407–411.
39. Ivanov V and Tay, S 2006. Microorganisms of aerobic microbial granules. In: Tay JH, Tay STL, Liu Y, Show KY, Ivanov V (eds) Biogranulation technologies for wastewater treatment. **Elsevier, Amsterdam**, pp 135–162.
40. Wu, J., Stahl, P and Zhang, R .,1997. “Experimental study on the reduction of soil hydraulic conductivity by enhanced biomass growth”. **Soil Science** 162: 741–748.
41. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer. K and Stackebrandt, E 2006. *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria*, vol 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. 3rd Edition. Springer-Verlag, New York.
42. Alhour, MT. 2013. Isolation, Characterization and Application of Calcite Producing Bacteria from Urea Rich Soils. **Islamic University, Master Thesis**. Gaza,73p.
43. Benini, S., Rypniewski, W., Wilson, K., Miletto, S., Ciurli, S and Mangani, S 1999. A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels. **European Molecular Biology Laboratory**, 7(2): 205-16.
44. Henriques, R 2011. Estudio relativo al hormigón bacteriano: Fabricación y potenciales campos de aplicación **Universitat Politècnica de Catalunya (UPC), Masters’ Thesis**. 83p.
45. Whiffin, V., 2004. “Microbial CaCO₃ precipitation for the production of biocement” [Ph.D. thesis].Perth, Western Australia, Murdoch University. 154p.
46. Al-Thawadi, S., 2011.Ureolytic bacteria and calcium carbonate formation as a mechanism of strength enhancement of sand. **Journal of Advanced Science and Engineering Research** 1(1): 98-114.

47. Follmer, C., Real-Guerra, R., Wasserman, G., Olivera-Severo, D and Carlini, C 2004. “Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases”. **European Journal of Biochemistry** 271(7): 1357-1363.
48. Olivera-Severo, D., Wassermann, G and Carlini, C .,2006. *Bacillus pasteurii* urease shares with plant ureases the ability to induce aggregation of blood platelets. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 452(2): 149-155.
49. Siddique, R and Chahal, N., 2011. Effect of ureolytic bacteria on concrete properties. *Construction and Building Materials* 25(10): 3791-3801.
50. Bundeleva, I.A., Shirokova, L.S., Bénézeth, P., Pokrovsky, O.S., Kompantseva, E.I. and Balor, S., 2012, Calcium carbonate precipitation by anoxygenic phototrophic bacteria. **Chemical Geology** 291:P:116–131.
51. Dupraz, C., Reid, R.P., Braissant, O., Decho, A.W., Norman, R.S. and Visscher, P.T., 2009, Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats. **Earth-Science Reviews** 96, 141–162.
52. De Muynck, W., Debrouwer, D., De Belie, N. and Verstraete, W., 2008, Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials. **Cement and Concrete Research** 38, 1005–1014.
53. DeJong, J.T., Fritzges, M.B. and Nusslein, K., 2006. Microbially induced cementation to control sand response to undrained shear, **Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering**, 132, (11), 1381-1392.
54. Chou, C., Seagren, E.A., Aydilek, A.H. and Lai, M., 2011. Biocalcification of sand through Ureolysis, **Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering**, 137 (12), 1179-1189.
55. Sarda, D., Choonia, H.S., Sarode, D.D. and Lele, S.S., 2009, Biocalcification by *Bacillus pasteurii* urease: a novel application. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 36(8), 1111-1115.
56. Ramachandran S.K., Ramakrishnan, V., and Bang S S., 2001, “Remediation of Concrete Using Micro-Organisms” **ACI Materials Journal**, 98(1), 3-9.
57. Kantzas A., Ferris F.G., Stehmeier L., Marentette D.F., Jha K.N., Mourits F.M., 1992 “A novel Method of Sand Consolidation Through Bacteriogenic Mineral Plugging” CIM 92-46, Proceedings of the CIM 1992 **Annual Technical Conference, Society of Canadian Institute of Mining, Metallurgy, and Petroleum, Calgary, Canada**, V.2, 1992, pp.1-15.

58. Natarajan KR., 1995 Kinetic study of the enzyme urease from *Dolichos biflorus*. **J Chem Educ** 72: 556–557.
59. Hammad IA., Talkhan FN., and Zoheir AE. 2013. Urease activity and induction of calcium carbonate precipitation by *Sporosarcina pasteurii* NCIMB 8841. **Journal of Applied Sciences Research**, 9(3): 1525-1533.
60. Maniatis, T., Fritsh, E. F. and Sambrook, J., 1989. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, **Cold Spring Harbor**, New York, 1-25.
61. Saunders, N.A., Harrison, T.G., Kachwalla, N. and Taylor, A.G., 1988. "Identification of species of the genus *Legionella* using a cloned rRNA gene from *Legionella pneumophila*", **Journal of General Microbiology**, 134: 2363-2374.
62. Rainey, F. A., Fritze, D., Stackebrandt, E., 1994. The phylogenetic diversity of thermophilic members of the genus *Bacillus* as revealed by 16S rDNA analysis, **FEMS Microbiology Letters**. 115: 205–212.
63. Fenchel, T. and Ramsing, N. B., 1992. Identification of sulphate reducing ectosymbiotic bacteria from anaerobic ciliates using 16S rRNA binding oligonucleotide probes, **Archives of Microbiology**, 158: 394–397.
64. Azarno, T., 2013, "Mikrobiyal Biyoçimento Üretimine Yönelik Üreaz Enzimi Üretiminin Optimizasyonu" **Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi**, İzmir, 49s.
65. Akoğuz, H., 2014, "Kum Zeminlerin Biyolojik İyileştirilmesinde *Bacillus arenosi* Bakterisinin Kullanılabilirliğinin Araştırılması" **Ataürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi**, Erzurum, 73 s

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Fatma EROĞLU

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 16.09.1988, Kayseri

Medeni Durumu: Bekâr

Tel: 05456826326

email: Fatmaeroglu38@hotmail.com

Yazışma Adresi: Yeni Mah. 7. Cad. 34. Sok. Doruk Apt. 3/5 Kocasinan/ KAYSERİ

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü	-----
Lisans	Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2013
Önlisans	Cumhuriyet Üniversitesi Muhasebe	2009
Lise	75.Yıl Cumhuriyet Lisesi	2005

YABANCI DİL

İngilizce