



EGE ÜNİVERSİTESİ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MİKROBİYAL BİYOÇİMENTO ÜRETİMİNE
YÖNELİK ÜREAZ ENZİMİ ÜRETİMİNİN
OPTİMİZASYONU**

Taymaz AZARNO

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Murat ELİBOL

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 614.02.07.

Sunuş Tarihi: 27.08.2013

Bornova-İZMİR

2013

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**MİKROBİYAL BİYOÇİMENTO ÜRETİMİNE
YÖNELİK ÜREAZ ENZİMİ ÜRETİMİNİN
OPTİMİZASYONU**

Taymaz AZARNO

Tez Danışmanı : Prof. Dr.Murat ELİBOL

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 614.02.07

Sunuş Tarihi : 27.08.2013

Bornova-İZMİR

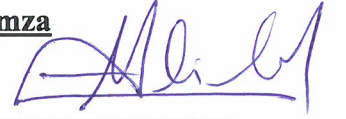
2013

Taymaz AZARNO tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “**Mikrobiyal Biyoçimento Üretimine Yönelik Üreaz Enzimi Üretiminin Optimizasyonu**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’ nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 27.08.2013 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı/~~başarısız~~ bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Murat ELİBOL
Raportör Üye : Prof. Dr. Seçil ÖNAL
Üye : Yrd. Doç. Dr. Sayıt SARGIN

İmza



.....


.....


ÖZET**MİKROBİYAL BİYOÇİMENTO ÜRETİMİNE YÖNELİK ÜREAZ ENZİMİ ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU**

AZARNO, Taymaz

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Murat ELİBOL

Ağustos 2013, 49 sayfa

Tiyol bakımından zengin olan üreaz enzimi (EC 3.5.1.5) ürenin hidrolizini katalizleyen bir enzimdir. Mikrobiyal çimento üretim teknolojisi ise, doğal kumtaşı oluşumunu taklit eden bir proses olup, uygun mikroorganizma ve ortam seçimi ile istenen yüzeylerde kalsit oluşumu prensibine dayanmaktadır. Biyoçimento oluşumu, ürenin hidrolizi, alkalikliğin artırılması, Ca^{2+} iyonlarının yüzey absorpsiyonu ve çekirdekleşme ve kristal gelişimi olarak 4 aşamada gerçekleşmektedir.

Bu çalışmada, çeşitli mikrobiyal suş ve izolatlardan üreaz enzimi üreten mikroorganizma seçimi ve ortam koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca kalsit oluşumu denemeleri yapılarak üretimi etkileyen faktörler belirlenmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında, beş adet *Bacillus* izolatı (EgeB.2.1.F, EgeB.1.1.F, B.1.d.4, B.2.d.5, B.1.4.a) ve *Klebsiella oxytoca* ve on adet *Streptomyces* izolatı (136sy-s, 2M21, M125-1, M-127-2, S3, 1M1, M80, M107, M136K-2, M-123-2) kullanılmıştır. İzolatlar seçici büyüme ortamına aktararak, üreaz enzim aktivitesi potansiyeli olan mikroorganizmalar renk değişimine göre belirlenmiştir. Seçilen üç adet *Streptomyces* izolatının çalkalamalı kültürde üretimleri gerçekleştirilerek üreaz enzim aktiviteleri spektrofotometrik yöntem ile tayin edilmiştir. Üretimler sonucunda en yüksek üreaz aktiviteleri *Streptomyces* M107, M136K-2, M123-2 için sırasıyla 0.138, 0.127 ve 0.121 U/ml olarak elde edilmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında ise, üreaz enzim aktivitesi gösteren *Streptomyces* M107, M136K-2, M123-2 cinsleri biyoçimento üretimi için farklı konsantrasyonlarda $CaCl_2$ ve üre içeren SFM Broth ortamına aktararak, biyoçimento üretim performansları araştırılmıştır.

Anahtar sözcükler: Biyoçimento, *Streptomyces*, üreaz, *Bacillus*, *K. oxytoca*.

ABSTRACT**OPTIMIZATION OF UREASE PRODUCTION FOR THE
PRODUCTION OF MICROBIAL BIOCEMENT**

AZARNO, Taymaz

Master of Science Thesis in Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Murat ELİBOL

August 2013, 49 pages

Urease (EC 3.5.1.5) which has large amount of thiol is the catalytic enzyme of urea. However, microbial cement technology is the process which mimics natural sandstone production and based utilizing the certain microorganism and environment to obtain desired amount of calcite. Biocement production follows 4 steps as, urea hydrolysis, increase in alkalinity, surface adsorption of Ca^{2+} ions, nucleation and crystal formation.

In this study, the selection of urease producing microorganisms among various microbial isolates and optimization of different parameters affecting urease production were carried out. In addition, some factors influencing the calcite formation were also determined. Five *Bacillus* isolates (EgeB.2.1.F, EgeB.1.1.F, B.1.d.4, B.2.d.5, B.1.4.a), *Klebsiella oxytoca* and ten *Streptomyces* isolates (136sy-s, 2M21, M125-1, M-127-2, S3, 1M1, M80, M107, M136K-2, M-123-2) were tested for their potential of producing urease by using urease selective medium. Three *Streptomyces* isolates were selected according to the visual inspection of the color change in the medium. Shake flask productions were performed by using selected isolates and urease activities were determined by spectrophotometric method. The highest urease activities achieved for *Streptomyces* M107, M136K-2, M123-2 isolates were 0.138, 0.127 and 0.121 U/ml respectively. In addition to, the second stage of the research, *Streptomyces* M107, M136K-2, M123-2 genuses which indicated urease activity were transferred into the medium containing various amount of CaCl_2 and urea in SFM Broth and their biocement production performances were investigated.

Keywords: Biocement, *Streptomyces*, urease, *Bacillus*, *K. oxytoca*.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince her türlü desteği veren, bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren değerli danışmanım Prof. Dr. Murat ELİBOL'a, teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Doç. Dr. Esin HAMEŞ KOCABAŞ'a bilgi ve tecrübesini paylaştığı ve ihtiyaç duyduğumda tüm içtenliği ile çözüm ürettiği için teşekkür ederim. Yrd. Doç. Dr. Sait SARGIN'a, Prof. Dr. Seçil ÖNAL'a yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Yüksek lisans boyunca hep yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen tüm hocalarıma, tüm arkadaşlarıma ve Biyomühendislik ailesine teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	6
3. MATERYAL VE METOT.....	10
3.1 Materyal.....	10
3.1.1 Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar.....	10
3.1.2 Kullanılan besiyerleri, çözeltiler ve kimyasallar	15
3.2 Metot.....	19
3.2.1 Berthelot yöntemi	20
3.2.2 Bradford yöntemi.....	20

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	22
4.1 Bulgular.....	22
4.1.1 Mikroorganizmaların ön seçimi	22
4.1.2 İzolatların üreaz aktivitelerinin belirlenmesi	26
4.1.3 NH ₃ ile standart grafiği.....	28
4.1.4 İzolatlarda spor sayımı	30
4.1.5 Bradford yöntemi	31
4.1.6 Biyoçimento üretimi	32
4.2 Tartışma	43
KAYNAKLAR DİZİNİ	45
ÖZGEÇMİŞ	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Bakteri hücrede biyoçimento oluşumu.....	3
1.2 Üreaz mekanizması	3
1.3 Çimento oluşumu.	4
1.4 Bakteri hücre duvarında CaCO ₃ oluşumu.	4
3.1 <i>Klebsiella oxytoca</i> kanlı besin ortamında üremesi.....	11
3.2 <i>Bacillus spp.</i> 'nin besin ortamında üremesi	12
3.3 <i>Streptomyces africanus sp.nov.</i> 'nin spor zinciri.....	13
3.4 <i>Streptomyces antibioticus</i> ETH7451'in boya kiti ile misellerinin boyanması	13
3.5 <i>Streptomyces spp.</i> 'nin yaşam döngüsü	14
3.6 <i>Streptomyces spp.</i> Kolonisi	14
3.7 <i>Streptomyces spp.</i> 'nin üre agar ortamında gösterdiği renk değişimi	18
4.1 Nutrient agar besiyerine inoküle edilmiş <i>Bacillus spp.</i>	22
4.2 <i>K.oxytoca</i> 'nın nütrient agar, Mac conkey agar ve Kanlı agar besiyerlerindeki üremesi.....	23
4.3 <i>Streptomyces spp.</i> 'nin SFM besiyerinde çizgi ekimi	24
4.4 <i>Streptomyces spp.</i> 'nin üre agar besiyerindeki üreaz aktivitesi.....	24

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.5 <i>Streptomyces spp.</i> 'nin çökelti ve sıvı fazın gösterdiği üreaz aktivitesi.	26
4.6 M107 izolatının standart grafiği	29
4.7 Seyreltme metodu	30
4.8 Katı kültür.....	33
4.9 SFM besiyeri.....	34
4.10 pH kıyaslaması	35
4.11 Tekerrürlerin filtreden geçirilerek kurutulmuş durumları.	37
4.12 2.tekerrürün SEM görüntüleri.....	38
4.13 4.tekerrürün SEM görüntüleri.....	39
4.14 5.tekerrürün SEM görüntüleri.....	40
4.15 8.tekerrürün SEM görüntüleri.....	41
4.16 11.tekerrürün SEM görüntüleri.....	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1	Biyoçimeto üretiminde kullanılan mikroorganizmalar 5
3.1	Aktinomiset örneklerinin alındığı iller ve örnek tipleri..... 10
3.2	GYA besiyeri içeriği..... 15
3.3	Nutrient agar besiyeri içeriği 1.bileşenler 15
3.4	Nutrient agar besiyeri içeriği 2.bileşenler 16
3.5	Nutrient agar besiyeri içeriği 3.bileşenler 16
3.6	Nutrient agar besiyeri içeriği 4.bileşenler 16
3.7	Kanlı agar içeriği 17
3.8	Mac Conkey agar içeriği 17
3.9	SFM içeriği..... 17
3.10	Üre agar besin ortamının içeriği. 18
3.11	Berthelot yönteminde kullanılan çözeltilerin kör ve örneklerde kullanılan miktarları 20
4.1	Mikroorganizmaların üre agar besiyerindeki üreaz aktiviteleri 25
4.2	<i>Streptomyces spp.</i> farklı zaman aralıklarındaki ultrasonik uygulamaları sonucu ve Berthelot metodu uygulanarak elde edilen üreaz aktiviteleri(U/ml) 27

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.3 İzolatların sıvı fazlarının seyreltilmiş üreaz aktiviteleri (U/ml)	27
4.4 İzolatların katı fazlarının seyreltilmiş üreaz aktiviteleri (U/ml)	28
4.5 NH ₃ ile standart grafiğinde kullanılan standartlar ve tamponlar.....	28
4.6 M107 izolatının absorbans değerleri.....	29
4.7 M123-2 izolatının üreaz aktivitesi (U/ml), protein miktarı (mg/ml) ve spesifik aktivitesi (U/mg).....	31
4.8 M107 izolatının üreaz aktivitesi (U/ml), protein miktarı (mg/ml) ve spesifik aktivitesi (U/mg).....	31
4.9 M136K-2 izolatının üreaz aktivitesi (U/ml), protein miktarı (mg/ml) ve spesifik aktivitesi (U/mg).....	32
4.10 M107 izolatına eklenecek üre ve Ca ²⁺ miktarları (mM).....	32
4.11 Zon pH ile besiyerinin pH'sının karşılaştırması	35
4.12 SFM Broth besiyerinde M107 izolatının üreaz aktivitesi, protein miktarı ve spesifik aktivitesi.....	36

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
μ l	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
gr	Gram
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
rpm	Dakikadaki dönüş miktarı
U/ml	Birim/mililitre
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
ACTINOCC	Actinomycetes culture collection
AFB	Anoksijenik fototrofik bakteri
AHA	Asetohidroksamik asit
CA	Karbonik anhidraz

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
DIC	Çözünmüş inorganik karbon
EFS	Hücre dışı polimerik bileşikler
GYA	Glycerol yeast extract agar
LiP	Lignin peroksidaz
MKÇ	Mikrobiyal karbonat çökeltimi
SEM	Taramalı elektrom mikroskopu
SFM	Soya flour manitol

1. 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 (Dymond, 2004). Biyoçimento oluşumu mikroorganizmaların metabolik prosesleri sayesinde Mikrobiyal karbonat çökeltimine (MKÇ) sebep olarak ve kalsiyum varlığında karbonat ile birleşerek, kalsiyum karbonat şeklinde çökeltmesiyle gerçekleşmektedir (Gonsalves, 2011). Organizmalar, MKÇ ye 3 şekilde sebep olmaktadır. Bunlardan ilki, Siyanobakteri ve CO₂' i azaltan algler benzeri fotosentetik organizmaların kullanılmasıyla oluşmaktadır. Diğer yöntem ise, sülfat azaltan bakterilerin kullanılmasıyla meydana gelmektedir. En son yöntem olarak da hem nitrojen döngüsünü hem de amino asitlerin aminofikasyonlarını/nitratı azaltan/üenin hidrolizi ile ilişkili organizmalar kullanılmaktadır (Gonsalves, 2011; Castanier et al, 1999).

Tiyol bakımından zengin olan üreaz enzimi (EC 3.5.1.5) üenin hidrolizini katalizleyen bir enzimdir. Bu enzim bitkilerde, alglerde, funguslarda ve bakterilerde bulunmaktadır. Üreaz sorunsuz çevresel koşullarda pozitif rol oynamasının yanısıra, insan ve hayvan sağlığı için bazı etkilerle zarar vermektedir. Enzimin aktif formlarının sebep olduğu zararlı etkileri önleyebilmek için, çok sayıda organik ve inorganik bileşiği kapsayan güçlü inhibitörleri araştırılmaya devam edilmektedir (Kot et al., 2010).

Kalsiyum karbonat çökeltisinin kimyasal prosesi basit olarak 4 ana faktörden oluşmaktadır: (1) kalsiyum konsantrasyonu, (2) çözülmüş inorganik karbon (DIC) konsantrasyonu, (3) pH, (4) nüklasyon alanlarının uygunluğu (De Muynck et al. 2010). Bu faktörler dışında ise, işletim parametreleri olarak nutrient etkisi (C/N, üre), karıştırma hızı, sıcaklık ve kontrollü Ca²⁺ ilavesi; kontrol parametreleri olarakta üreaz aktivitesi, CO₃²⁻ konsantrasyonu, mikroorganizma miktarı, zaman ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) önemlidirler.

Bilim adamları endüstriyel uygulamalar için ilk kez biyoçimentoyu 1974 yılında bulmuşlardır (Anonim, 2013a). Biyoçimento, kırılmış betonların düzeltilmesinde, toprak sertleştirilmesinde, tarihi eserlerin restorasyonunda, betonun basınca karşı güçlendirilmesinde, beton dayanıklılığının geliştirilmesinde,

seçici tampon görevi görerek yağın geri dönüşümünün artırılmasında, atık su uygulamaları ve toprağın geliştirilmesinde kullanılabilir (George ve Li, 2010). Bunlara ek olarak çatlak ve delik kapanmasında, tünel yapımında, poroz malzemelerin konsolidasyonunda kullanılmaktadır.

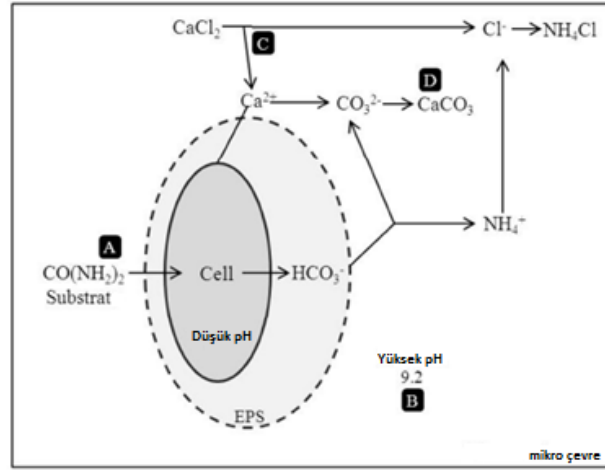
Biyoçimentonun geleneksel betona göre bazı avantajları vardır. Bunlar:

- Biyoçimento geleneksel betonla karşılaştırıldığında daha güçlü bir yapı gösterirler.
- MKÇ ile toprağın yüklü direnç kapasitesi arttırılmakta ve akışkanların toprağa geçişi engellenmektedir.
- Reaktantlar doğada sulu formdadırlar. Bu nedenle, düşük enjeksiyon basıncında olduğu gibi düşük enerji ihtiyacının olması gözeneklerden geçişi kolaylaştırılmaktadır.
- Diğer yöntemlere göre maliyeti daha düşüktür.

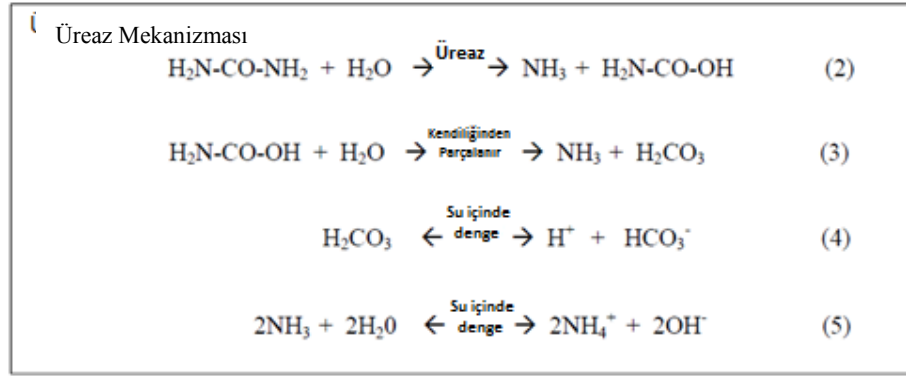
Biyoçimento oluşumu 4 aşamada gerçekleşmektedir (Şekil 1.1).

A- Ürenin hidrolizi (2, 3 ve 4): Üre hidrolizi karbonat iyonlarının 1:1 M oranında üretilmesiyle gerçekleşmektedir. Bu aşamada önemli parametre, çözülmüş inorganik karbon konsantrasyonunun miktarıdır (Gonsalves, 2011) (Şekil 1.2).

B- Alkalikliğin arttırılması (5): Karbonat türleşmesi etkisi nedeniyle çevredeki pH değeri spesifik üreaz aktivitesinde önemli rol oynamaktadır. pH değerinin yaklaşık 9.3 değerine arttırılması 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 (Gonsalves, 2011) (Şekil 1.2).



Şekil 1.1. Bakteri hücresinde biyoçimento oluşumu (A) Ürenin hidrolizi (B) Alkaliliğin artırılması (C) Ca^{2+} iyonlarının yüzey absorpsiyonu (D) Çekirdekleşme ve kristal gelişimi (Gonsalves, 2011).

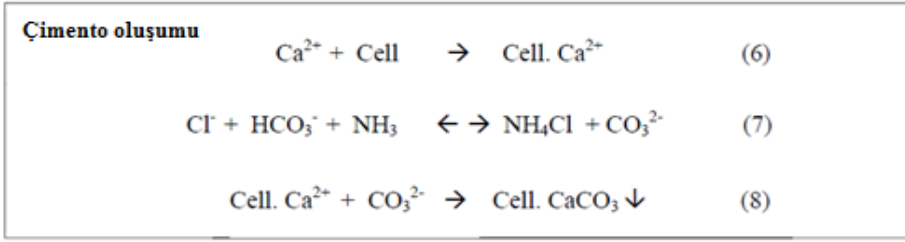


Şekil 1.2. Üreaz mekanizması (Gonsalves, 2011).

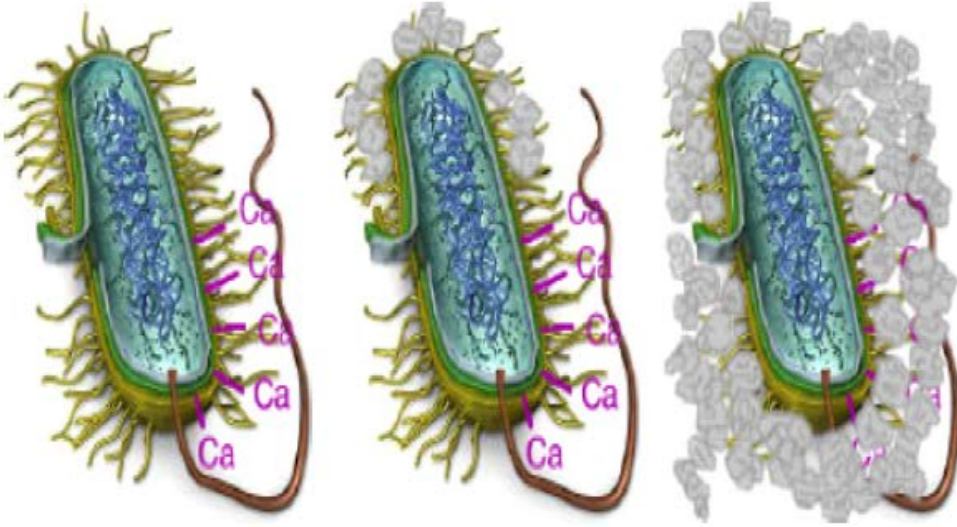
C- Ca^{2+} iyonlarının yüzey absorpsiyonu (6 ve 7): Kalsiyum klorür formunda sağlanan Ca^{2+} bakteri hücre duvarına eklenirler (Gonsalves, 2011) (Şekil 1.3).

D- Çekirdekleşme ve kristal gelişimi (8): Bu aşama 3 kısımda meydana gelir.

- (I) Aşırı doymun çözeltinin geliştirilmesi,
- (II) Kritik doymunlaşma noktasında çekirdekleşmenin (yeni kristallerin oluşumu) başlaması,
- (III) Sabit çekirdeklerde spontane kristal gelişimi (Gonsalves, 2011) (Şekil 1.3).



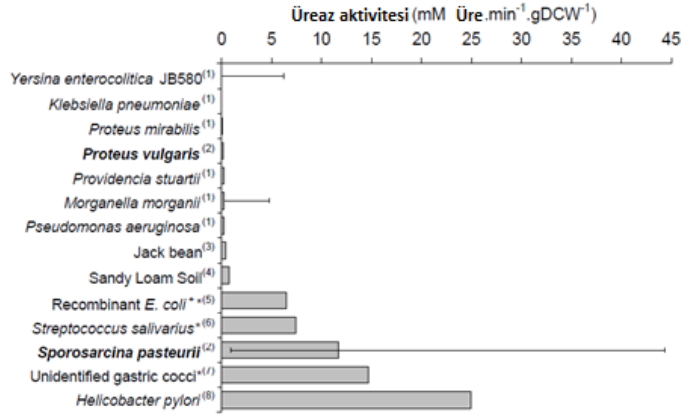
Şekil 1.3. Çimento oluşumu (Gonsalves, 2011).



Şekil 1.4. Bakteri hücre duvarında CaCO₃ oluşumu (Siddique ve Chahal, 2011).

Biyoçimento 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 (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Biyoçimeto üretiminde kullanılan mikroorganizmalar (Whiffin, 2004).



Bu mikroorganizmalar dışında *Streptomyces spp* nin bazı cinsleri içerdikleri üreaz enzimi nedeni ile biyoçimeto üretim potansiyeline sahip olabilmektedirler.

Streptomyces spp; antibiyotikler, bağışıklığı baskılanmış ve bir çok diğer biyolojik aktiviteye sahip bileşikler gibi sekonder metabolitlerin geniş miktarda üretim potansiyellerine sahip olduğu bilinmektedir. *Streptomyces spp* genomuna sahip organizmaların geniş miktarda farmasotik ve enzim endüstrilerinde geniş anlamda kullanılmaktadır. (Gopal et al, 2013).

1943 yılında Waksman ve Henrici tarafından önerilen *Streptomyces* cinsi, morfoloji ve hücre duvar yapısına göre Actinobacteria sınıfı içerisinde Actinomycetales takımının *Streptomycetaceae* familyasında sınıflandırılmış olup, Gram (+), aerobik ve spor oluşturan aktinomisetler olarak tanımlanmıştır (Gürel, 2006).

Bu çalışmanın temel amacı; üreaz enzimi ile üre hidrolizi esnasında mikrobiyal ortamda kalsiyum bulunması durumunda kristal yapıda kalsit oluşumu potansiyelinin araştırılmasıdır. Böylelikle çalışma kapsamında:

1. Üreaz enzimini üreten en uygun mikroorganizmanın seçimi ve ortam parametrelerinin optimizasyonu,
2. Kalsit oluşumu denemelerini etkileyen faktörlerin belirlenmesi gerçekleştirilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Karbonat biyomineralizasyonu geçmişte ve gelecek zamanda atmosferdeki CO₂ seviyesini doğal olarak kontrol eden bir prosesi içermektedir. Bakteri suspansiyonlarının çökelti denemeleri sırasında yapılan SEM analizleri sonucu yaşayan hücrelerin etrafında veya yüzeylerinde CaCO₃ varlığı ispatlanmıştır. Fransa’ da yapılan bir çalışmada, CaCO₃ çökeltimi oranının organik alt kültürde gelişen iki zıt zincirli anoksigenik fototropik bakteri tarafından (haloalkalifilik *Rhodovulum steppense* A-20s ve nötrofilik halofilik *Rhodovulum sp.*S17-65) uyarıldığı belirlenmiştir. Dünyanın başlangıcından itibaren, anoksigenik fototrofik bakteri (AFB)’ nin anoksigenik fotoheterotrofik metabolizması ile fotoototrofik siyanobakterilerle karşılaştırıldığında, daha düşük etkili CaCO₃ oluşumunun görüldüğü belirtilmiştir (Bundeleva et al., 2012).

Yüksek kalsiyum konsantrasyonları borularda tıkanmaya, kazanlarda ve eşanjörlerde ölçekleme sırasında, veya aerobik ve anaerobik reaktörlerin arızalanmasına neden olmaktadır. Üre hidrolizi, pH ve CO₂’ in eşzamanı olarak artmasıyla birlikte CaCO₃ üretiminden sorumlu olduğu belirlenmiştir. Etkili bir kalsiyum taşınması için optimum üre konsantrasyonu 15 mM olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada üre bazlı mikrobiyal karbonat çökeltiminin alternatif kalsiyum taşınım teknolojisi ile fizibil olduğu görülmüştür (Işık et al., 2012).

Siddique ve Chahal (2011), çok sayıdaki bakteri türlerinin toprak, jeolojik oluşumları, taze su biyofilmleri, okyanuslar ve tuz gölleri gibi çeşitli doğal çevrelerde mineral karbonat çökeltmesini sağlamaktadırlar. Seçici mikrobiyal prosesler, CaCO₃ çökeltiminin metabolik aktiviteler sırasında kalsit formuna dönüştürmesi ile zarar görmüş yapıların restorasyonunda yeni bir teknik olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmaya göre hemen hemen tüm bakterilerin CaCO₃ üretiminin 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.

Belçika’da yapılan bir çalışmada farklı gözeneklilikteki harç örneğinin devamlılığına bakteriyel karbonat çökeltiminin etkisi araştırılmıştır. Yüzeyin CaCO₃ 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 (Muyneck et al., 2008).

Ghosh ve arkadaşlarının., (2005) yaptığı çalışmada mikrobiyolojik mineral çökeltimi tarafından çimentonun toprak harcının direncinin geliştirilmesinin sağlayan bir metot üzerinde incelemeler yapmıştır. Bu çalışmada, 10^5 hücre/ml eklenmiş suda 28 gün boyunca bekletildiğinde, çimento harcının direncinin %25 oranında arttığı görülmüştür. Ayrıca direncin artırılmasının geliştirilmesi için, çimento kum karışımının gözenekleri SEM ile görüntülenmiştir.

Çinde yapılan bir çalışmada, CaCO_3 çökeltisindeki mikrobiyal karbonik anhidrazın (CA) etkisi diğer biyolojik faktörlerle (sığır CA, sığır serum albumini, karboksimetil kitozan ve glutamik asit) karşılaştırılarak sistematik olarak araştırılmıştır. Sonuçlar göstermektedir ki, mikrobiyal CA veya sığır CA' nın her ikisinden birinin varlığında oluşan Ca^{+2} çökeltisinin oranı; %1 sığır serum albumin, %1 karboksimetil kitozan veya %1 glutamik asit varlığından daha hızlı oluşmaktadır (Li et al., 2010).

Okwadha ve Li (2010), bakteriyel hücre konsantrasyonlarının başlangıçtaki üre konsantrasyonlarına göre üre hidrolizi oranına ($k_{üre}$) çok etkisi bulunduğunu belirtmektedirler. 25 mM Ca^{+2} konsantrasyonlarında bakteriyel hücre konsantrasyonlarının 10^6 dan 10^8 hücre/ml artırılması, CaCO_3 çökeltimini ve CO_2 ayırımını %30 oranında artırmıştır. Bununla birlikte Ca^{+2} konsantrasyonundaki 10 kat arttırarak 250 mM Ca^{+2} 'a ulaştığı zaman, CaCO_3 çökeltimindeki ve CO_2 ayırımının miktarı başlangıçtaki üre konsantrasyonuna bakılmaksızın, %100 oranına arttığı belirlenmiştir. Sonuç olarak deneysel koşullar altında, 2.3×10^8 hücre/ml bakteriyel hücre konsantrasyonlarında, 666 mM üre ve 650 mM Ca^{+2} içeriğinde MKÇ için optimum koşullarının sağlandığı gözlemlenmiştir.

Dupraz ve arkadaşlarının., (2009) yaptığı çalışmada, çeşitli mineralizasyon proseslerindeki mikropların 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 çalışmada, mikrobiyal matların, jeolojik zamanlar boyunca biyosfer koşullarını etkilediği, karbonat çökeltiminin ve tabakalanmış matların oluşumunun mikrobiyal yollarla ortaya çıktığı belirtilmiştir.

Amerika’da yapılan bir çalışmada; *Bacillus pasteurii* üreaz olarak kodlanan, pBU11 plazmidi içeren rekombinant *Echerichia coli* HB101 kullanılarak kalsit çökeltiminde mikrobiyal üreazın rolü araştırılmıştır. *B.pasteurii* ve *E.coli*’nin (pBU11) her ikisi ile uyarılmış kalsit çökeltimi, asetohidroksamik asit (AHA) olarak adlandırılan bir üreaz inhibitörün varlığında inhibe edildiği belirtilmiştir. Rekombinant üreazdaki bu gözlemler, üreaz aktivitesinin mikrobiyolojik bağımlı kalsit çökeltimi için önemli olduğunu doğrulamıştır (Bachmeier et al., 2002).

Avustralya’da yapılan bir çalışmada toprağın mekanik özelliklerinin geliştirilmesinde mikrobiyolojik proseslerinin kullanılmasının olasılığı son yıllarda dikkat çekecek bir şekilde yükseldiği belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda kolay uygulanabilir yüzey sızıntı metodu kullanılarak doymamış toprak için bir sağlamlaştırma tekniği olarak MKÇ’nin yeni uygulamaları hakkında bilgi verilmiştir (Cheng ve Cord-Ruwisch, 2012).

Çeşitli çevresel teknolojilere MKÇ’ nin potansiyel katkısı olmasına rağmen, bakteriyal komüniteyle ilişkili kullanılan morfoloji ile üre hidrolizi ve çökelti boyutu oranının kontrolü hakkında çok az bilgi varlığı bildirilmiştir. Bu çalışmada kalsit tarafından biyofilmin enkapsulasyonu sonunda üre hidrolizinin nasıl sınırlandırılacağı ve istenen zaman sürecini aşmadan maksimum kalsit çökeltimi miktarını optimize edecek reaksiyonlara imkan veren istenen bir model geliştirileceği hakkında bilgi verilmiştir. Bazı koşullarda meydana gelebilecek yavaş reaksiyon oranı maksimum reaksiyon etkinliği için istenmekte olduğu belirtilmekte ve bunun sunucunda MKÇ içeren mühendislik çözümlerinin dizayn edilebilme gerekliliğinin önemi vurgulanmaktadır (Cuthbert et al., 2012).

Hindistan’ da yapılan bir diğer çalışmada; MKÇ 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 *Bacilluse pasteurii* NCIM 2477 kullanılmıştır. Karbonat iyonlarının çökeltimi sonucu olarak CaCO₃ meydana gelmesiyle birlikte, üreaz enzimi yolu ile CO₂ 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 (Sarda ve Choonia, 2009).

Başka bir çalışmada ise mineral çökeltilerinde bakterilerin rolleri araştırılmıştır. Denemede *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus pumilis* kullanılmıştır. Bu bakterilerin farklı inkübasyon sıcaklıklarında (5, 15, 25, 32 °C) CaCO₃ kristalleri oluşturma yetenekleri araştırılmıştır ve 25 °C' de optimum kalsit çökeltimi meydana gelmiştir. Bu çalışma sonucunda mikrobiyal aktivite ve optimum sıcaklığın kalsit çökeltiminde anahtar faktörler olduğu belirlenmiştir (Baskar et al., 2006).

Streptomyces rochei' nin kültürel fizyolojik ve antimikrobiyal aktivitelerinin incelendiği bir çalışmada, aktinomiset soyu olarak tanımlanan *S.richei* MTCC 8376' nın yüksek dercede antimikrobiyal potansiyele sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca bu soy amilaz, asparginaz, selulaz, kitinaz, nitrat reküktaz, proteaz, triyozinaz ve üreaz benzeri farklı enzimlerde ürettiklerini gözlemlemiştir (Kavitha ve Vijayalakshmi, 2007).

Streptomyces viridioporus T7A süpernantının kültürdeki CaCO₃ bağımlı yüksek liginin peroksidaz (LiP) aktivitesinin incelendiği bir çalışmada, glikoz içeren besin ortamında lignin peroksidaz enzimlerinin kararsız hale dönüştüğü ve CaCO₃' in etkisinin tespit edildiği belirlenmiştir. Maksimum LiP aktivitesinin yüksek değerlikleri 600 ve 900 U/L olarak gözlemlendiğinde iki farklı CaCO₃ katkısı %0.5-5.0 olarak gözlemlenmiştir (Macedo et al., 1999).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

Bu çalışma Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Biyoproses Laboratuvarında *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus spp.* (B.1.4.a, B.1.d.4, B.2.d.5, EgeB.2.1.F, EgeB.1.1.F) ve *Streptomyces spp.* (136sy-s, 2M21, 1M1, M125-1, M80, S3, M127-2, M107, M123-2, M136K-2) mikroorganizma türleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan aktinomiset izolatları Biyomühendislik Bölümü' nde bulunan Aktinomiset Kültür Koleksiyonu' ndan [Actinomycetes Culture Collection (ACTINOCC), World Federation of Culture Collections, No. 952)] temin edilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Aktinomiset örneklerinin alındığı iller ve örnek tipleri.

İzolat kodu	İl	İlçe	Örnek tipi
136sy-s	Konya	Ereğli	Sediment
2M21	Kütahya	Merkez	Toprak
1M1	Kütahya	Merkez	Toprak
M125-1	Aydın	İmamköy	Su
M80	İzmir	Dikili	Sediment
S3	İzmir	Bornova	Toprak
M127-2	Aydın	İmamköy	Su
M107	Muğla	Köyceğiz	Sediment
M123-2	Aydın	Bozköy	Su
M136K-2	Konya	Ereğli	Sediment

3.1.1 Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar

3.1.1.1 *Klebsiella oxytoca*

Klebsiella cinsi içindeki bakteriler Enterobacteriaceae' nin genel özelliklerini gösteren gram negatif bakterilerdir. İndol pozitif bir *Klebsiella* türü olan, genellikle hastanelerde gelişen idrar yolu enfeksiyonlara, yara-insizyon yeri

enfeksiyonları, yumuşak doku enfeksiyonları, sepsis ve diğer bir çok organlarda gelişen enfeksiyonlara neden olmaktadır (Tünger ve ark, 2005).

Klebsiella'nın yaptığı hastalıklarına göre farklı yerlerden materyaller alınır. Bunlar; balgam, idrar, boğaz veya yara sürüntüsü, BOS ve kan gibi örneklerdir. Alınan örnekler kültür için Kanlı Agar, Endo Agar, EMB Agar besiyerlerine ekilir (Şekil 1.3).



Şekil 3.1. *Klebsiella oxytoca* kanlı besin ortamında üremesi.

3.1.1.2 *Bacillus spp.*

Çubuk şeklinde düz ya da düze yakın hücreleri bulunduran, kötü şartlara dirençli olan, genelde gram pozitif olarak bulunan mikroorganizmalardır. Peritrik flagellalı ve flagellaları hareketlidirler. Aerobik ve fakültatif anaerobturlar. Endospor oluştururlar. Vejetatif hücreler $0.5 \times 1.2 \mu\text{m}$ ile $2.5 \times 10 \mu\text{m}$ çapındadır. *Bacillus* genusunun koloni morfolojisi çeşitlilik göstermektedir. Geneli beyaz veya krem renkli kolonilere sahiptir. Bazı türlerinde sarı, pembe, portakal rengi ve siyah renklere pigmentli kolonilere de rastlanmaktadır (Şekil 3.2).

Bacillus'ların termofilik, mezofilik ve psikrofilik türleri bulunmaktadır. Genellikle 35-37 °C da ve pH 7 civarında ürerler. *Bacillus* genusu uygun olmayan şartlarda spor oluşturma yeteneğine sahiptirler (Kalaylı ve Beyatlı, 2003).



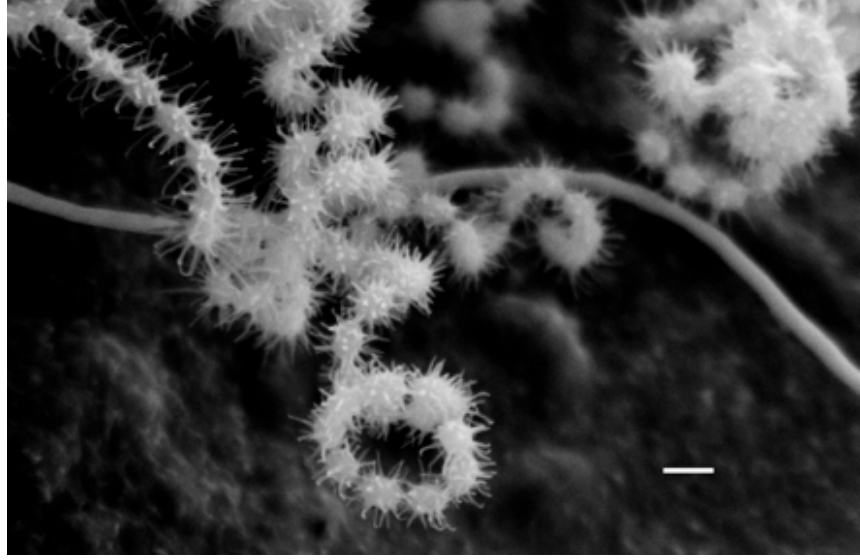
Şekil 3.2. *Bacillus spp.*'nin besin ortamında üremesi.

3.1.1.3 *Streptomyces spp.*

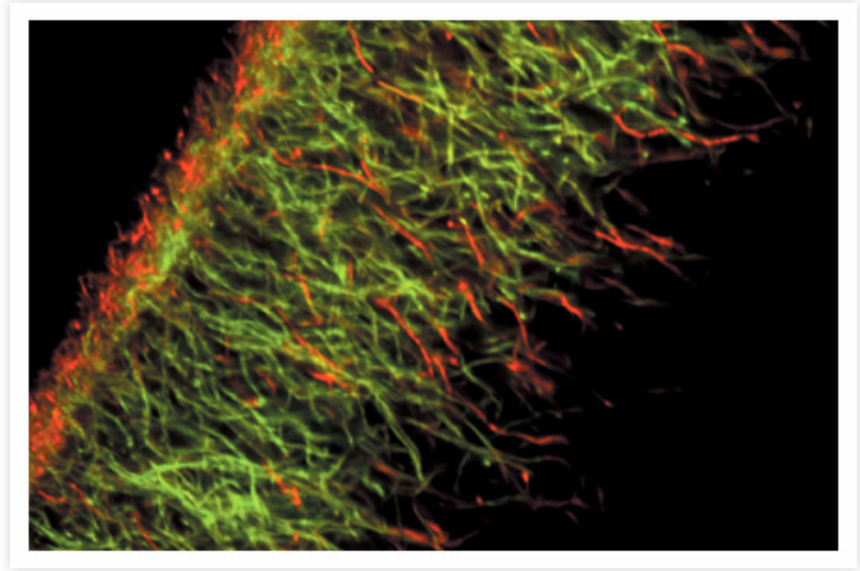
Waksman ve Henrici (1943)' nin tanımlamasına göre *Streptomyces* cinsi, morfolojik özellikleri, hücre duvarındaki kimyasal yapılarına ve spor formlarına göre tanımlanmış *Streptomycetaceae* familyasının bir üyesidir (Gündoğdu 2006; Kim ve ark., 2004; Williams ve ark., 1983).

Nümerik kemotaksonomik ve moleküler sistematik yöntemlerin ışığı altında *Streptomyces* cinsi; hava miselyumu oluşturan, hücre duvarında glisin ve L-diaminopimelik asit içeren, geniş dallı substratlı, %66-78 mol Guanin + Sitozin içeren, oksitatif, gram pozitif bir bakteri türü olarak tanımlanmaktadır (Gündoğdu 2006; Saintpierre-Bonaccio ve ark., 2004; Lee ve ark., 2005; Chun ve ark., 1997) (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4).

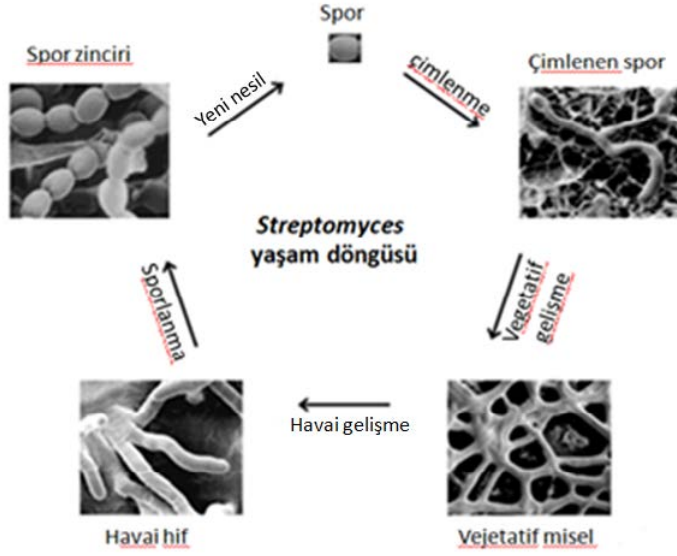
Streptomyces cinsi gelişmiş misel yapısına sahip olup, nadiren fragmentlidir. Hava miselyumları düzenli aralıklarla halka şeklinde bulunup, uzun ve düz filamentlere sahiptirler. *Streptomyces* sporları tekli, salkım halinde veya vertisillat olarak üç farklı yapıda bulunmaktadır. Spor yüzeyleri düz, siğilli, tüysü, girintili-çukuntılı veya dikensi olabilmektedir (Gündoğdu 2006; Backer ve ark., 1965; Shirling ve Gottlieb, 1968; Chun ve ark., 1997) (Şekil 3.5).



Şekil 3.3. *Streptomyces africanus* sp.nov.'nin spor zinciri.

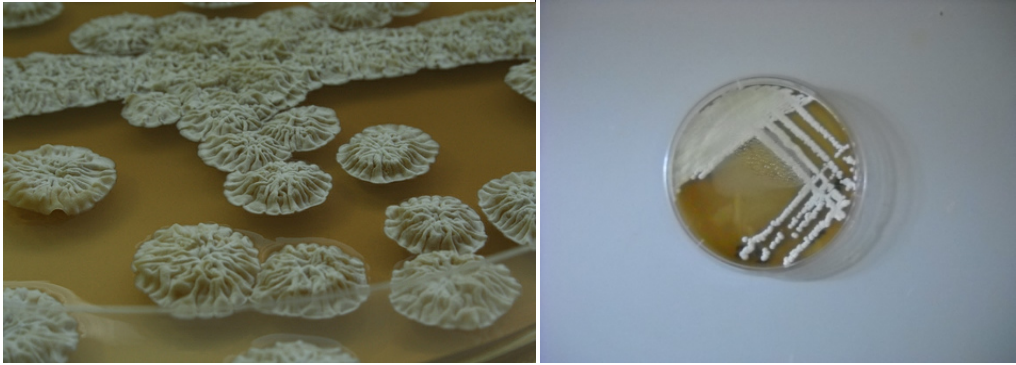


Şekil 3.4. *Streptomyces antibioticus* ETH7451'in boya kiti ile misellerinin boyanması.



Şekil 3.5. *Streptomyces spp.*'nin yaşam döngüsü.

Streptomyces türlerinin kolonileri başlangıç aşamasında düz daha sonraki aşamalarda pamuksu veya tozsuz yapıda olabilmektedir. Ayrıca koloniler dairemsi, derimsi veya likensi şekillerde görülebilmektedir. Bu bakteriler önemli sekonder metabolitleri ve antibiyotik kaynaklarıdır (Gündoğdu 2006) (Şekil 3.6).



Şekil 3.4. *Streptomyces spp.* kolonisi.

Streptomyces türleri çoğunlukla 25 ve 35 °C arasındaki sıcaklıkları arasında ve pH 6.5-8.0 değerleri arasında optimum gelişme göstermektedirler. Ayrıca bazı termofilik özellik gösteren *Streptomyces* türlerinin 65 °C' de gelişme gösterdiği de gözlemlenmiştir (Gündoğdu 2006; Kim ve ark., 1999).

3.1.2 Kullanılan besiyerleri, çözeltiler ve kimyasallar

3.1.2.1 Kullanılan besiyerleri

GYA (Glycerol yeast extract agar)

Gram pozitif spor formu bakteriler için kullanılan genel besi ortamlarından birisidir. Ortamın bileşenleri Çizelge 3.2' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. GYA besiyeri içeriği*.

Bileşenler	Miktar
Yeast extract	2.0 g/l
K ₂ HPO ₄	0.1 g/l
Pepton	25 g/l
Gliserol	5.0 ml
Agar-agar	15.0 g/l

* 25 °C de pH 8.0 olmalıdır.

Nutrient agar

In vitro standart mikrobiyolojik analizlerde kullanılan genel katı besiyeridir. Ortamın bileşenleri Çizelge 3.3, 3.4, 3.5 ve 3.6' da gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Nutrient agar besiyeri içeriği 1.bileşenler*.

Bileşenler	Miktar (g/l)
Et ekstraktı	1.0
Maya ekstraktı	2.0
Pepton	5.0
Tuz(NaCl)	5.0
Agar-agar	15.0

* pH 7.4±0.2 olmalıdır.

Çizelge 3.4. Nutrient agar besiyeri içeriği 2.bileşenler*.

Bileşenler	Miktar (g/l)
Et ekstraktı	10.0
Pepton	10.0
Tuz(NaCl)	5.0
Agar-agar	15.0

*pH 7.5±0.2 olmalıdır.

Çizelge 3.5. Nutrient agar besiyeri içeriği 3.bileşenler*.

Bileşenler	Miktar (g/l)
Et ekstraktı	3.0
Pepton	5.0
Agar-agar	15.0

*pH 6.8±0.2 olmalıdır.

Çizelge 3.6. Nutrient agar besiyeri içeriği 4.bileşenler*.

Bileşenler	Miktar (g/l)
Et ekstraktı	3.0
Pepton	5.0
Tuz(NaCl)	8.0
Agar-agar	15.0

*pH 7.±0.2 olmalıdır.

Kanlı agar

In vitro standart mikrobiyolojik analizlerde ilk başta zor gelişen mikroorganizmaların geliştirilmesi ve hemoliz reaksiyonlarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu besiyerinin içeriği Çizelge 3.7' de belirtilmiştir.

Çizelge 3.7. Kanlı agar içeriği*.

Bileşenler	Miktar (g/l)
Nutrient substartı (kalp ekstraktı ve peptonlar)	20.0
NaCl	5.0
Agar-agar	15.0

* 25 °C de pH 6.8±0.2 olmalıdır.

Mac Conkey agar

In vitro mikrobiyolojik analizlerde koliform grup bakteriler ve *E.coli*'nin geliştirilmesi ve sayılması için kullanılan bir besiyeridir. Bu besiyerinin içeriği Çizelge 3.8'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.8. Mac Conkey agar içeriği*.

Bileşenler	Miktar (g/l)
Pepton	20.0
Laktoz	10.0
Tuz (NaCl)	5.0
Bile salts No.3	1.5
Nötral kırmızısı	0.03
Kristal viyole	0.001
Agar	13.5

*pH 7.1±0.2 olmalıdır.

SFM (Soya flour manitol agar)

Streptomyces spp. için kullanılmış seçici bir besi ortamıdır. Bileşenler Çizelge 3.9'da verilmiştir.

Çizelge 3.9. SFM içeriği*.

Bileşenler	Miktar (g/l)
Agar	20.0
Manitol	20.0
Soya unu	20.0

* 25 °C de pH 8.5-9.0 olmalıdır.

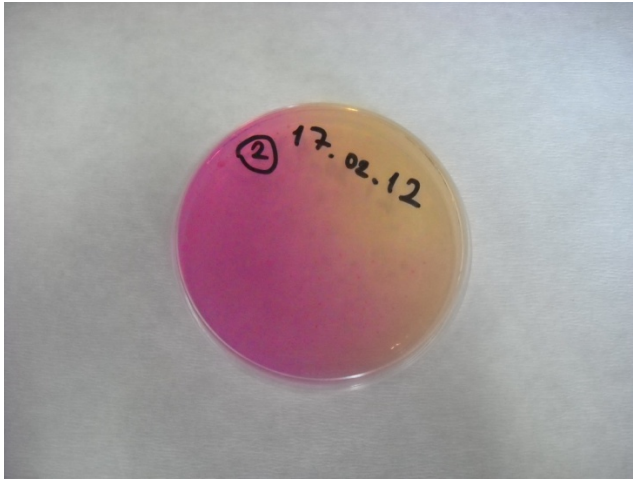
Üre agar

Mikroorganizmaların, özellikle *Enterobacteriaceae*' nin üreaz üretim aktivitesini tespit etmekte kullanılan besi ortamıdır. Üre agar, Christensen tarafından enterik basillerin tespiti için katı bir besiyeri olarak geliştirilmiştir. Hızlı üreaz pozitif *Proteaeae* organizmaları (*Proteus spp.*, *Morganella morganii* subsp. *morganii*, *Providencia rettgeri* ve bazı *Providencia stuartii*) ve diğer üreaz pozitif mikroorganizmaların (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, bazı *Bordetella*, *Brucella*) dışındaki bakterileri ayırt etmektedir. Mikroorganizmalar, besiyerindeki üreyi kullandığında, inkübasyon sırasında, pembe-kırmızı renk oluşturarak bu besiyeri reaksiyonunu bazik yapan amonyakı oluşturmaktadır (Şekil 3.7). Bu nedenle, üreaz üretimi fenol kırmızısı göstergedeki değişim ile saptana bilmektedir. Ortamın içeriği Çizelge 3.10' da belirtilmiştir.

Çizelge 3.10. Üre agar besin ortamının içeriği*.

Bileşenler	Miktar (g/l)
Üre	20.00
Sodyum Klorit	5.00
Monopotasyum Fosfat	2.00
Jelatin Pepton	1.00
Dekstroz	1.00
Fenol kırmızısı	0.012

* 25 °C de pH 6.8±0.2 olmalıdır.



Şekil 3.7. *Streptomyces spp.*' nin üre agar ortamında gösterdiği renk değişimi.

3.1.2.2 Cözeltiler

Üreaz aktivitesi ve protein tayini için aşağıda belirtilen çözeltilerden yararlanmıştır.

Üreaz aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler

Üreaz aktivitesi tayininde üre çözeltisi, fenol reaktifi ve alkali hipoklorit çözeltisi kullanılmıştır. Üre çözeltisi; 10 ml distile suda 25.5 mg üre çözeltiyle hazırlanmaktadır. Fenol reaktifi ise iki çeşit reaktifin (reaktif A ve reaktif B) 1:1 oranda karıştırılmasıyla elde edilir. Reaktif A 25 ml distile suda 2.5 gr fenol çözeltiyle; reaktif B ise 25 ml distile suda 0.0125 gr Na-nitroprussid çözeltiyle hazırlanmaktadır. Alkali hipoklorit çözeltisi hazırlanırken, 1:1 oranda reaktif A ve reaktif B karıştırılmaktadır. Reaktif A; %5'lik (w/v) NaOH kullanılarak hazırlanırken, reaktif B litresinde 2 gr NaOCl içeren klorak kullanır ve bu ticari çözeltilerden 2.9 ml alınıp 100 ml' ye distile su ile tamamlanarak hazırlanır.

Protein tayininde kullanılan çözeltiler

Protein tayininde Bradford protein ölçüm yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde çözelti olarak Bradford boyası kullanılmaktadır (Bradford., 1976).

3.1.2.3 Kimyasallar

Üreaz aktivitesi tayininde kullanılan Berthelot yönteminde fosfat tamponu, fenol, Na-nitroprussid, NaOH ve NaOCl kullanılmıştır.

Protein tayininde kullanılan Bradford yönteminde ise Brilliant mavisi G-250, etanol (%95-100) ve O-fosforik asit (%85) kullanılmıştır.

3.2 Metot

Üreaz aktivitesi tayini için Berthelot yöntemi (Anonim, 2013b), protein tayini için ise Bradford yöntemi (Bradford., 1976) kullanılmıştır.

3.2.1 Berthelot yöntemi

Berthelot yöntemi ile üreaz aktivitesinin tayininde, öncelikle 0.1 M pH 7.0 olan fosfat tamponu, üre çözeltisi ve 0.3 mg/ml ticari katı enzimden hazırlanan ve seyreltmeler yapılmış enzim çözeltisi hazırlanmıştır. Kullanılan fosfat tamponu, üre çözeltisi ve enzim çözeltisinin kör ve örneklerde kullanılan miktarları Çizelge 3.11' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.11. Berthelot yönteminde kullanılan çözeltilerin kör ve örneklerde kullanılan miktarları.

Çözeltiler	Kör	Örnekler
Fosfat tamponu	1.99 ml	1.89 ml
Üre çözeltisi	10 µl	10 µl
Enzim çözeltisi	-	0.1 ml

Hazırlanan çözeltiler 25 °C'de 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Bu uygulamadan sonra 500 µl fenol reaktifi eklenip karıştırılarak, 500 µl alkali hipoklorit çözeltisi hazırlanıp eklenilmiş ve vorteks ile karıştırılmıştır. Bu karışım 50-60 °C' de 5 dakika inkübe edilmiş ve ardından soğuması beklenmiştir. Bu işlemler sonucu 630 nm' de spektrofotometrik ölçümler yapılmış ve absorbans değerleri okunmuştur. Bu yöntem sonucu açığa çıkan NH₃ miktarından gidilerek üreaz aktivitesi tayin edilmiştir.

3.2.2 Bradford yöntemi

Protein miktarı tayini için Bradford (1976) metodu kullanılmıştır. Bu metodun seçilmesinin nedeni 0.01–0.05 mg/ml konsantrasyonundaki protein miktarlarına olan hassasiyetinden kaynaklanmaktadır.

100 mg Commasie Blue G–250 50 ml metanolde çözülmüştür. Bu solüsyona 100 ml %85 H₃PO₄ eklenmiş ve 200 ml distile su ilave sonrası filtre edilerek Dye-binding çözeltisi hazırlanmıştır, bu çözelti 1:4 distile su ile seyreltilerek buzdolabı şartlarında (0-4 °C) saklanmıştır. Protein miktarı belirlenecek örneklerden 150 µl alınarak üzerine 3 ml dye-binding çözeltisi ilave edilmiş ve 10 dakika beklenmiştir. Böylece peptid bağlarının stabil şekilde bağlanması sağlanır. Koyu yeşil renkteki dye-binding çözeltisi protein içeren

örneklere konulduğunda mavi renge dönüşmektedir. Örneklerin absorbansları 595 nm' de okunmuştur. Kör için 150 µl distile su üzerine 3 ml dye-binding çözeltisi konmuş ve kör ile ilk okuma sıfırlanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Bulgular

4.1.1 Mikroorganizmaların ön seçimi

Araştırmanın bu aşamasında tek kolonilerin elde edilmesi için Nutrient agar hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyeri, Petri' lere ve yatık olarak tüplere döküldükten sonra, *Bacillus spp.* (EgeB.2.1.F, EgeB.1.1.F, B.1.d.4, B.2.d.5, B.1.4.a) (Şekil 4.1) ve *Klebsiella oxytoca* ekimi yapılmıştır. *K.oxytoca*'nın petrilere ekiminde, genç ve yaşlı stoklarından örnek alınarak ekim yapılmıştır. Mikroorganizmalar, 24 saat boyunca üremeleri için +30 °C deki inkübatörde bekletilmiştir.

K.oxytoca'yı Nutrient agar ve seçici ortamları olan Mac conkey ve Kanlı agar besiyerlerine birer petri olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu besiyerlerine *K.oxytoca* ekimi yapıldıktan sonra üremeleri için +30 °C' deki inkübatörde 48 saat bekletilmiştir (Şekil 4.2).

Ekim sonrası üreyen mikroorganizmalardan tek koloniler elde edildikten sonra parafilmleterek stok halinde buzdolabında +4 °C' de saklanılmıştır.



Şekil 4.1. Nutrient agar besiyerine inoküle edilmiş *Bacillus spp.*



Şekil 4.2. *K. oxytoca*'nın nütrient agar, Mac conkey agar ve Kanlı agar besiyerlerindeki üremesi.

Streptomyces spp.'ler; azot kaynağı kullanım ortamı (Williams ve ark., 1983), Bennett' s Agar (Jones, 1949), inorganik tuz-nişasta agar (Inorganic Salts-Starch Agar: Shirling ve Gottlieb, 1966), karbon kaynağı kullanım ortamı (Shirling ve Gottlieb, 1966), nişasta-kazein agar (Küster ve Williams, 1964), oatmeal agar (Shirling ve Gottlieb, 1966), pepton-yeast extract iron agar (Shirling ve Gottlieb, 1966), tyrosine agar (Shirling ve Gottlieb, 1966), yeast extract-malt extract agar (Shirling ve Gottlieb, 1966), nutrient agar ve SFM (Soya Flour Mannitol) gibi besiyerlerinde üreme ve farklı aktiviteler göstermektedirler.

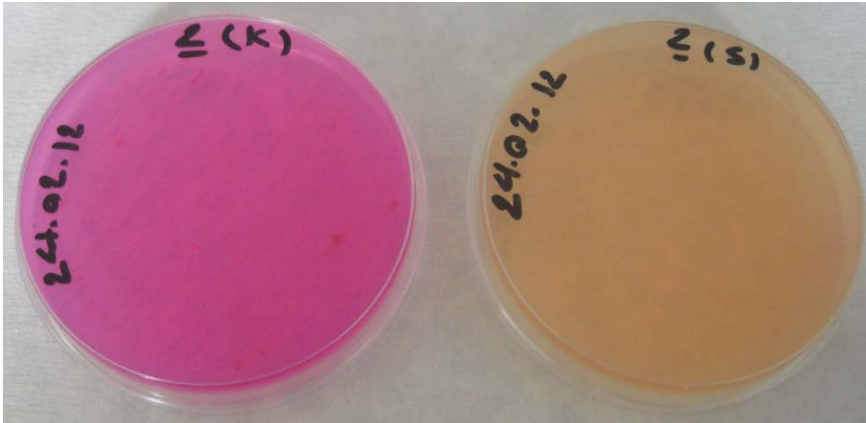
Bu çalışmada *Streptomyces spp.*'lerin üremesi için SFM besiyeri kullanılmıştır. SFM besiyerini hazırladıktan sonra -20 °C' de stok halinde bekletilen on türün (136sy-s, 2M21, M125-1, M-127-2, S3, 1M1, M80, M107, M136K-2, M-123-2) izolatlarının sporları alınarak, tek koloni oluşturmak için çizgi ekim yöntemi ile besiyerine inoküle edilmiştir. İnoküle edilmiş SFM besiyerleri +30 °C' deki inkübatörde 48 saat boyunca gözlemlenerek, üremelerinin

tamamlandığı tespit edilmiştir. Kolonilerin yaşlanmaması için, inoküle edilmiş besiyerleri buzdolabında +4 °C' de stoklanmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. *Streptomyces spp.*'nin SFM besiyerinde çizgi ekimi.

Besiyerlerinde üreme gösteren genç ve buzdolabında stoklanmış mikroorganizmaların üreaz aktivitelerini belirlemek amacıyla, mikroorganizmalar üre agar besiyerlerine inoküle edilmiştir. *Bacillus spp.* ve *K.oxytoca* üre agar ortamına inoküle edildikten 24 saat sonra ve *Streptomyces spp.* inoküle edildikten 48 saat sonra üreme göstermişlerdir. Ortamdaki renk değişimine bakılarak *Streptomyces spp.* izolatlarının üreaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.4) (Çizelge 4.1).



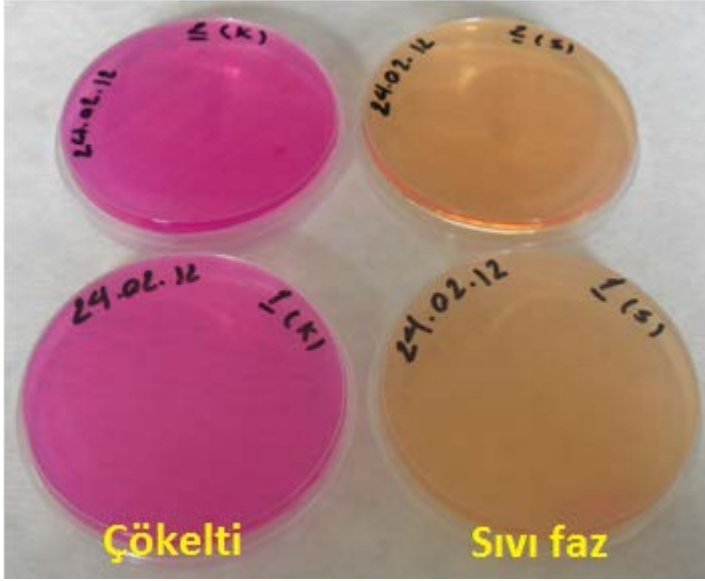
Şekil 4.4. *Streptomyces spp.*'nin üre agar besiyerindeki üreaz aktivitesi.

Çizelge 4.1. Mikroorganizmaların üre agar besiyerindeki üreaz aktiviteleri*.

Mikroorganizma	Üreaz aktivitesi
<i>K. oxytoca</i>	-
<i>Bacillus</i> (EgeB.2.1.F)	-
<i>Bacillus</i> (Ege.1.1.F)	-
<i>Bacillus</i> (B.1.d.4)	-
<i>Bacillus</i> (B.2.d.5)	-
<i>Bacillus</i> (B.1.4.a)	-
<i>Streptomyces</i> (136sy-s)	-
<i>Streptomyces</i> (2M21)	-
<i>Streptomyces</i> (M125-1)	-
<i>Streptomyces</i> (M-127-2)	-
<i>Streptomyces</i> (S3)	-
<i>Streptomyces</i> (1M1)	-
<i>Streptomyces</i> (M80)	-
<i>Streptomyces</i> (M107)	+
<i>Streptomyces</i> (M123-2)	+
<i>Streptomyces</i> (M136K-2)	+

*(+) Üreaz pozitif , (-) Üreaz negatif.

Streptomyces spp.'lerin üreaz aktivitesi gösteren izolatlarının salgıladığı üreaz enziminin hücreiçi veya hücre dışı olarak salgıladıklarını belirleyebilmek için, izolatlar SFM Broth besiyerlerine aktarılmış ve 150 rpm +30 °C çalkalayıcıda üremeleri için bekletilmiştir. İzolatlar 48 saat bekletildikten sonra besiyerlerinden örnek alınarak, 1.5 µl steril Eppendorf tüplere konulmuştur. Eppendorf tüplerindeki örnekler 11000 rpm' de 10 dakika santrifüjlenerek, çökelek ve sıvı faz birbirinden ayrılmıştır. Fazlar ayrı ayrı olarak üre agar besiyerine ekim yapılmıştır. Ekim yapıldıktan 48 saat sonra besiyerlerinin renk değişimine bakıldığında, sadece çökeltinin bulunduğu üre agar besiyerinde renk değişimi gözlemlenmiştir (Şekil 4.5). Bu aşamada izolatlarının üreaz aktivitesinin hücreiçi olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.5. *Streptomyces spp.*'nin çökelti ve sıvı fazın gösterdiği üreaz aktivitesi.

Elde ettiğimiz sonuçları kesinleştirme amacıyla, izolatlar tekrar SFM Broth ortamına ekim yapılarak, 48 saat süresince 150 rpm hızında +30 °C sıcaklığındaki çalkalayıcıda bekletildikten sonra, 1.5 µl steril Eppendorf tüplere üç örnek olacak şekilde konulmuştur. Birinci örnek santrifüj edilip çöken faz üre agarına konulmuştur. İkinci örnekte ise santrifüj işleminde ortaya çıkan sıvı faz ekim yapılmıştır. Son örnekte ise çökelti önce ultrasonikten geçirildikten sonra santrifüjlenmiş ve sıvı faz üre agar besiyerine eklenilmiştir. Ortaya çıkan sonuç elde ettiğimiz ilk bulgular ile benzerlik göstermiştir. Örnekler üç gün boyunca izlenerek her hangi bir renk değişikliğinin olup olmadığı araştırılmıştır ve üç günün sonunda renk değişiminin çöken fazındaki ekimde olduğu görülmüştür.

4.1.2 İzolatların üreaz aktivitelerinin belirlenmesi

Üreaz aktivitesini gösteren *Streptomyces spp.* izolatlarının, üreaz miktarlarını belirlemek amacıyla Berthelot metodu uygulanmıştır.

Enzim aktivitesi gösteren izolatlardan M-136K-2 kodlu tür alınıp, SFM Broth besiyerine aktararak, 48 saat boyunca çalkalayıcıda 150 rpm ve +30 °C sıcaklıkta üredikten sonra Eppendorf tüplere örnekler alınmıştır. Alınan örnekler 2 farklı zamanda (1 dk ve 2 dk) ultrasonik cihazda beklettikten sonra, 11000 rpm' de 10 dk boyunca santrifüjlenerek sıvı ve çöken faz ayrılmıştır. Sıvı fazda Berthelot metodu uygulanarak üreaz aktivitesi tayin edilmiştir. Örneğin 1 dk ultrasonik cihazda bekletildikten sonra ölçülen üreaz aktivitesi 1.022 U/ml olarak

gözlemlenirken, 2 dk uygulamasında ise üreaz aktivitesi 1.021 U/ml olarak tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçta M-136K-2 izolatının hücre dışı olduğu tespit edilmiştir. Üreaz aktivitesi gösteren tüm izolatların hücre dışı özelliklerini gösterip göstermediği araştırılmak üzere, farklı zaman aralıklarında ultrasonik cihazını kullanarak, Berthelot metodu uygulanmış ve izolatların üreaz aktiviteleri tayin edilmiştir.

Çizelge 4.2. *Streptomyces spp.* farklı zaman aralıklarındaki ultrasonik uygulamaları sonucu ve Berthelot metodu uygulanarak elde edilen üreaz aktiviteleri (U/ml).

Tür	Zaman (dk)							
	0 dk	1 dk	10 dk	20 dk	30 dk	40 dk	50 dk	60 dk
M123-2	2.319	2.225	2.215	2.292	2.254	2.276	2.280	2.238
M107	2.259	2.281	2.222	2.203	1.712	2.176	2.253	2.270
M136K-2	2.317	2.266	2.239	2.304	2.313	2.287	2.308	2.323

Çalışmanın sonuçlarına bakıldığında *Streptomyces spp.*'nin M123-2, M107 ve M136K-2 izolatlarının hücre dışı olduğu tespit edilerek, bir önceki çalışmanın sonuçları kesinleştirilmiştir. Önceki çalışmada belirlenen zaman sürecinde ultrasonik uygulamasından sonra elde edilen sonuçlar ile bir saat sürecinde farklı zaman aralıklarında yapılan ultrasonik uygulamasından sonra elde edilen sonuçlar arasında benzerlik gözlemlenmiştir.

Ayrıca Berthelot yöntemi ile *Streptomyces spp.*'lerinin hücre içi veya hücre dışı olduğu sayısal olarak da belirlenmiştir. Üreaz aktivitesi gösteren izolatlar SFM Broth besiyerinde ekim yapılmış, 48 saat sonra Eppendorf tüplerine konulmuş ve 10 dk 10000 rpm' de santrifüj edilmiştir. Sıvı faz ve çökelti birbirlerinden ayrılmış olup, sıvı faz 5 farklı konsantrasyonda seyreltilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3' te gösterilmektedir.

Çizelge 4.3. İzolatların sıvı fazlarının seyreltilmiş üreaz aktiviteleri (U/ml).

İzolatlar	Seyreltme kat sayısı (x)				
	0 x	4 x	8 x	10 x	15 x
M123-2	2.323	1.738	0.992	0.824	0.580
M107	2.327	1.628	1.022	0.806	0.551
M136k-2	2.325	2.089	1.396	1.237	0.761

Çökelti 5 kez fosfat tamponu ile yıkanarak, 10 dk 11000 rpm' de santrifüj edilmiştir. En son tekrarda çökeltinin üzerine 500 µl fosfat tamponu koyularak ultrasonik cihazına götürülmüştür. Ultrasonik çalışmasından sonra santrifüj edilerek, oluşan sıvı fazın analizi yapılmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. İzolatların katı fazlarının seyreltilmiş üreaz aktiviteleri (U/ml).

İzolatlar	Seyreltme kat sayısı (x)				
	0 x	4 x	8 x	10 x	15 x
M123-2	0.106	0.060	0.043	0.032	0.029
M107	0.200	0.050	0.061	0.029	0.020
M136k-2	0.186	0.072	0.037	0.029	0.023

Bu sonuçlara göre üreaz aktivitesi gösteren izolatların hücre dışı oldukları teyit edilmiştir.

4.1.3 NH₃ ile standart grafiği

Bu yöntemde açığa çıkan NH₃ miktarlarına bakılarak, üreaz aktivitesi tayin edilmiştir. Bu nedenle üreaz aktivitesi tayininde NH₃ ile standart grafiği hazırlanmıştır.

NH₃ ile standart grafiği hazırlanırken, 100 ml distile suda 68.8 mg Amonyum sülfat çözülerek, 100 kat seyreltme yapılarak çözeltinin standart grafiği hazırlanmıştır.

Çizelge 4.5. NH₃ ile standart grafiğinde kullanılan standartlar ve tamponlar.

Standart (ml)	Tampon (ml)	Abs (630 nm)
0.1	1.9	-
0.2	1.8	-
0.3	1.7	-
0.4	1.6	-
0.5	1.5	-
0.6	1.4	-
0.7	1.3	-
0.8	1.2	-
0.9	1.1	-
1.0	1.0	-

Kör = 2 ml tampon.

Çizelge 4.5'deki standart ve tamponlara karıştırılarak, karışımın üzerine 500 µl fenol reaktifi eklenmiş ve ardından 500 µl alkali hipoklorit eklenmiştir. Elde edilen karışım 50-60 °C'de 5 dk inkübe edilmiş, soğutularak 630 nm'de kör tampona karşı okuma yapılmıştır.

Üreaz aktivitesini gösteren izolatlarından M107 izolatu standart grafiği için seçilmiştir. Bu seçimin nedeni, üreaz aktiviteleri gösteren izolatların ölçülen enzim miktarlarının birbirlerine çok yakın olmasıdır (Şekil 4.6).

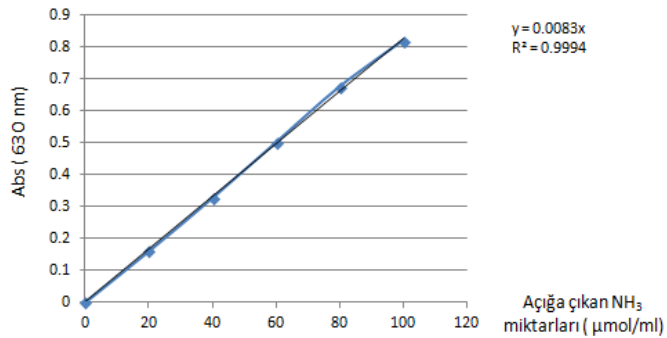
M107 izolatından hazırlanan örneklerde uygulanan, açığa çıkan NH₃ miktarı ile oluşturulmuş standart grafik Çizelge 4.6'da belirtilmiştir.

Elde edilen absorbans değerleri çok fazla değerde çıktıklarından dolayı, bu örneklerde 10 kat seyreltme yapılmıştır.

Çizelge 4.6. M107 izolatının absorbans değerleri.

Standart (ml)	Tampon (ml)	Abs (630 nm)
0.1	1.9	0.074
0.2	1.8	0.143
0.3	1.7	0.215
0.4	1.6	0.300
0.5	1.5	0.359
0.6	1.4	0.418
0.7	1.3	0.488
0.8	1.2	0.554
0.9	1.1	0.614
1.0	1.0	0.658

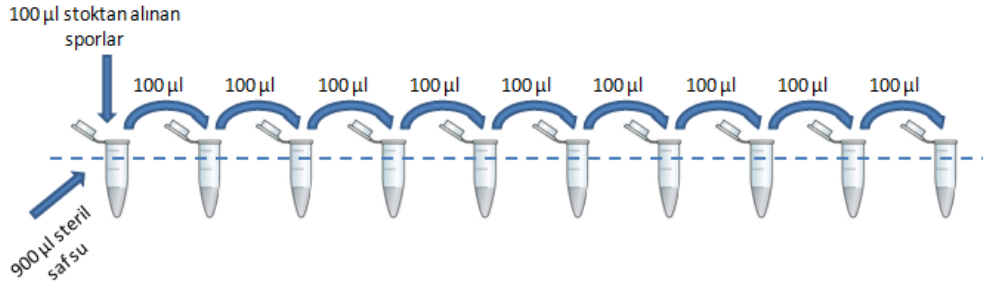
Kör = 2 ml tampon.



Şekil 4.6. M107 izolatının standart grafiği.

4.1.4 İzolatlarda spor sayımı

Üreaz aktivitesi olan izolatların enzim performanslarının birbirleriyle karşılaştırıp en yüksek aktiviteye sahip olan izolatın seçimi amacıyla eşit miktarda sporların ekimleri yapılması gerekmektedir. Bu kapsamda, izolatlar ilk aşamada SFM ortamına normal çizgi ekimi metodu ile aktarılıp +30 °C'deki inkübatörde üreyip, yaşlandırılarak spor oluşumu gerçekleştirilmiştir. İzolatlar SFM besiyerinde sporları oluşturmak amacıyla yaklaşık bir hafta bekletilmiştir. 1500 µl % 20'lik gliserol damlatılarak hazırlanan ve ¼ oranında kesilen bir miktar pamuk besiyerinde gezdirilerek sporlar gliserollü pamuğa toplanmıştır. Gliserollü pamuğun üzerindeki sporlar enjektör yardımıyla falkon tüplerinde aktarılmıştır. Sporların -20 °C'de stoklanmaları amacıyla, sporlar falkon tüplerinden alınıp Eppendorf tüplerine 500 µl olacak şekilde konulmuştur. Derin dondurucuda bulunan Eppendorf tüplerden 100 µl spor alınmış ve üzerine 900 µl steril distile su eklenerek seyreltme yapılmıştır. Seyreltme işlemi 10 kez tekrarlanarak 10 farklı Eppendorf tüplerinde, 10 farklı konsantrasyonda spor sayısı elde edilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Seyreltme metodu.

Elde edilen her seyreltmeden 100 µl alınıp GYA besiyerinin ortasına konulup cam drigalski spatülü ile besiyerinin her tarafına yayılması sağlanmıştır. Böylelikle her izolat için 10 petri olmak üzere toplamda 30 petri GYA besiyerine ekim yapılmıştır. Ekim yapıldıktan sonra petrilerin hepsi 28 °C' de saklanılarak spor sayımı için 3 gün üremeleri beklenilmiştir. Üreme işlemi gerçekleştirilip tek koloniler elde edildiğinde, spor sayısı 30-300 arasında olan petri seçilmiş ve sayım gerçekleştirilmiştir. 7.petri seçildiğinde; M136K-2 izolatında 62, M107 izolatında 146 ve M123-2 izolatında ise 51 spor sayılmıştır. Stok Eppendorf tüplerinde bulunan sporlar ise, M136K-2, M107, M123-2 için sırasıyla 6×10^9 , 1.5×10^{10} ve 5×10^9 olarak gözlemlenmiştir. Spor sayılarını eşitlemek amacıyla tüm izolatların spor sayıları 1.5×10^6 'ya kadar seyreltilmiş ve sporlar SFM Broth

besiyerlerine ekim yapılmıştır. Örnekler +30 °C' de 150 rpm hızındaki çalkalayıcıya 48 saat bekletilmiştir.

4.1.5 Bradford yöntemi

Bradford yönteminde izolatlarda protein tayini gerçekleştirilmektedir. Ekim yapılmış erlenlerden örnek alınıp Eppendorf tüplere konulup 10 dk 11000 rpm hızında santrifüjlendikten sonra üreaz aktivitesi, protein miktarı ve spesifik aktivitesi tayin edilmiştir (Çizelge 4.7, 4.8, 4.9).

Çizelge 4.7. M123-2 izolatının üreaz aktivitesi (U/ml), protein miktarı (mg/ml) ve spesifik aktivitesi (U/mg).

Gün	Üreaz aktivitesi (U/ml)	Protein miktarı (mg/ml)	Spesifik aktivite (U/mg)
2	11.7	2.51	4.66
3	23.5	0.387	60.72
4	28.1	0.352	79.82
5	29.0	0.379	76.51
6	30.9	0.372	83.06
7	28.6	0.398	71.85
10	37.4	0.354	105.6
14	34.8	0.352	98.86

Çizelge 4.8. M107 izolatının üreaz aktivitesi (U/ml), protein miktarı (mg/ml) ve spesifik aktivitesi (U/mg).

Gün	Üreaz aktivitesi (U/ml)	Protein miktarı (mg/ml)	Spesifik aktivite (U/mg)
2	6.8	2.49	2.73
3	18.9	0.389	48.58
4	26.9	0.356	75.56
5	25.6	0.370	69.18
6	28.9	0.362	79.83
7	25.8	0.389	66.32
10	35.9	0.343	104.66
14	41.8	0.337	124.03

Çizelge 4.9. M136K-2 izolatının üreaz aktivitesi (U/ml), protein miktarı (mg/ml) ve spesifik aktivitesi (U/mg).

Gün	Üreaz aktivitesi (U/ml)	Protein miktarı (mg/ml)	Spesifik aktivite (U/mg)
2	12.5	2.50	5.0
3	21.7	0.385	56.36
4	27.5	0.335	82.08
5	29.6	0.351	84.33
6	38.8	0.352	110.22
7	30.5	0.395	77.21
10	33.1	0.357	92.71
14	40.4	0.356	113.48

4.1.6 Biyoçimento üretimi

Berthelot ve Bradford yöntemi ile üreaz aktivitesi ve protein tayini yapılmış izolatlardan biyoçimento üretimi gerçekleştirmek üzere design export programı ile deneme deseni oluşturulmuştur. SFM, SFM Broth ve katı kültür içerisine üre ve Ca^{2+} , 13 tekerrürlü olarak eklenmiştir. İzolatların üreaz aktivitelerinin birbirlerine yakın olduklarından dolayı, spesifik aktivitesi en yüksek olan M107 izolatı biyoçimento üretimi için örnek izolat olarak seçilmiştir. M107 izolatının kültüre alınacağı besiyerlerine eklenen üre ve Ca^{2+} miktarları Çizelge 4.10'da belirtilmiştir.

Çizelge 4.10. M107 izolatına eklenecek üre ve Ca^{2+} miktarları (mM).

Deney	Faktör 1 A:Ca (mM)	Faktör 2 B:Üre (mM)
1	50.00	280.00
2	165.00	165.00
3	280.00	50.00
4	165.00	165.00
5	50.00	50.00
6	165.00	165.00
7	165.00	2.37
8	327.63	165.00
9	165.00	165.00
10	280.00	280.00
11	2.37	165.00
12	165.00	165.00
13	165.00	327.63

4.1.6.1 Katı kültür

Buğday kepeği substrat olarak kullanılan katı kültürde M107 izolatının üremesi gerçekleştirilmiş ve 4, 5, 7 ve 11.tekerrür kullanılarak biyoçimento üretimi denenmiştir. Her tekerrürdeki örneklerin nem miktarları %65 ve pH 6.5' e sabitlenmiştir. Katı besiyerleri otoklavdan çıktıktan sonra 1:1 oranında üre ve Ca^{2+} eklenerek, M107 izolatı 10 kat seyreltilerek inoküle edilmiştir. Katı kültür besiyerleri +30 °C' de inkübatörde bekletilmistir. Yaklaşık 72 saat sonra 4. 7. ve 11.tekerrürde beyaz renkte oluşum görünmüştür (Şekil 4.8). Oluşumun biyoçimento olup olmadığı araştırılmıştır.



(a)

(b)



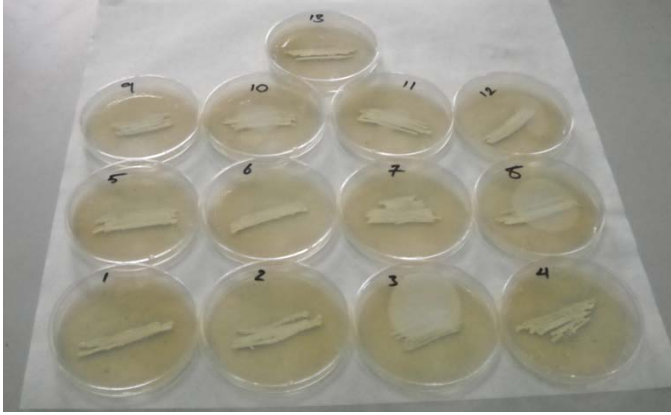
(c)

Şekil 4.8. Katı kültür (a) 4.tekerrür, (b) 7.tekerrür, (c) 11.tekerrür.

15 günün sonunda 4, 7 ve 11.katı kültür besiyerlerindeki beyaz oluşumun kaybolduğu gözlemlenmiştir. Bunun sonucunda oluşumun biyoçimento olmadığına kanaat getirilmiştir.

4.1.6.2 SFM

SFM besiyerleri hazırlanıp, her petriye 10 ml besiyeri dökülüp biraz soğuduktan sonra 13 tekerrürlü ve her tekerrürde 1:1 oranda üre ve Ca^{2+} 0.2 mesh' lik filtreden geçirilerek eklenmiş, pH 8.5-9.0'a ayarlanmış ve M107 izolatu ile ekim yapılmıştır. Örnekler +30 °C'deki inkübatörde yaklaşık 96 saat sonra üremiş olup 3, 8, 10 ve 12.tekerrürlerde zon ve beyaz renkli oluşumlar görülmüştür (Şekil 4.9). Örneklerde zonun varlığı, üreaz aktivitesinin varlığını ve üreyi parçaladığının bir göstergesidir. Ayrıca beyaz oluşumun biyoçimento olup olmadığını belirlemek için, örneklerden beyaz oluşumdan bir miktar alınıp GYA besiyerine aktarılmıştır.



Şekil 4.9. SFM besiyeri.

Örneklerdeki beyaz oluşum GYA besiyerlerine ekim yapıp +30 °C'de 24 saat boyunca inkübatörde beklettikten sonra, GYA besiyerlerin hepsinde üreme görülmektedir. Bu işlemler sonucunda beyaz oluşumlardan alınan örneklerde GYA besiyerinde üreme gerçekleştiğinden, ekim hatası olabileceği ihtimaline karşın, örnekler SFM broth besiyerinde de denenmiştir. Ayrıca petrilereki zonun pH' sı ölçülmüş, üreme olmayan bölgedeki pH ile karşılaştırılarak, üreazın varlığı kanıtlanmış ve biyoçimento elde edilme ihtimalini ortaya çıkartmıştır (Şekil 4.10) (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. Zon pH ile besiyerinin pH' sının karşılaştırması.

Std	Zon olan kısım	Zon olmayan kısım
3	8	7-8
13	7-8	6-7
2	7-8	6-7
10	8	7
1	8	7
12	8	6
7	8	6-7
6	7-8	6
11	8	6-7
4	8	7
5	7	6-7
9	8	7
8	7-8	6



Şekil 4.10. pH kıyaslaması.

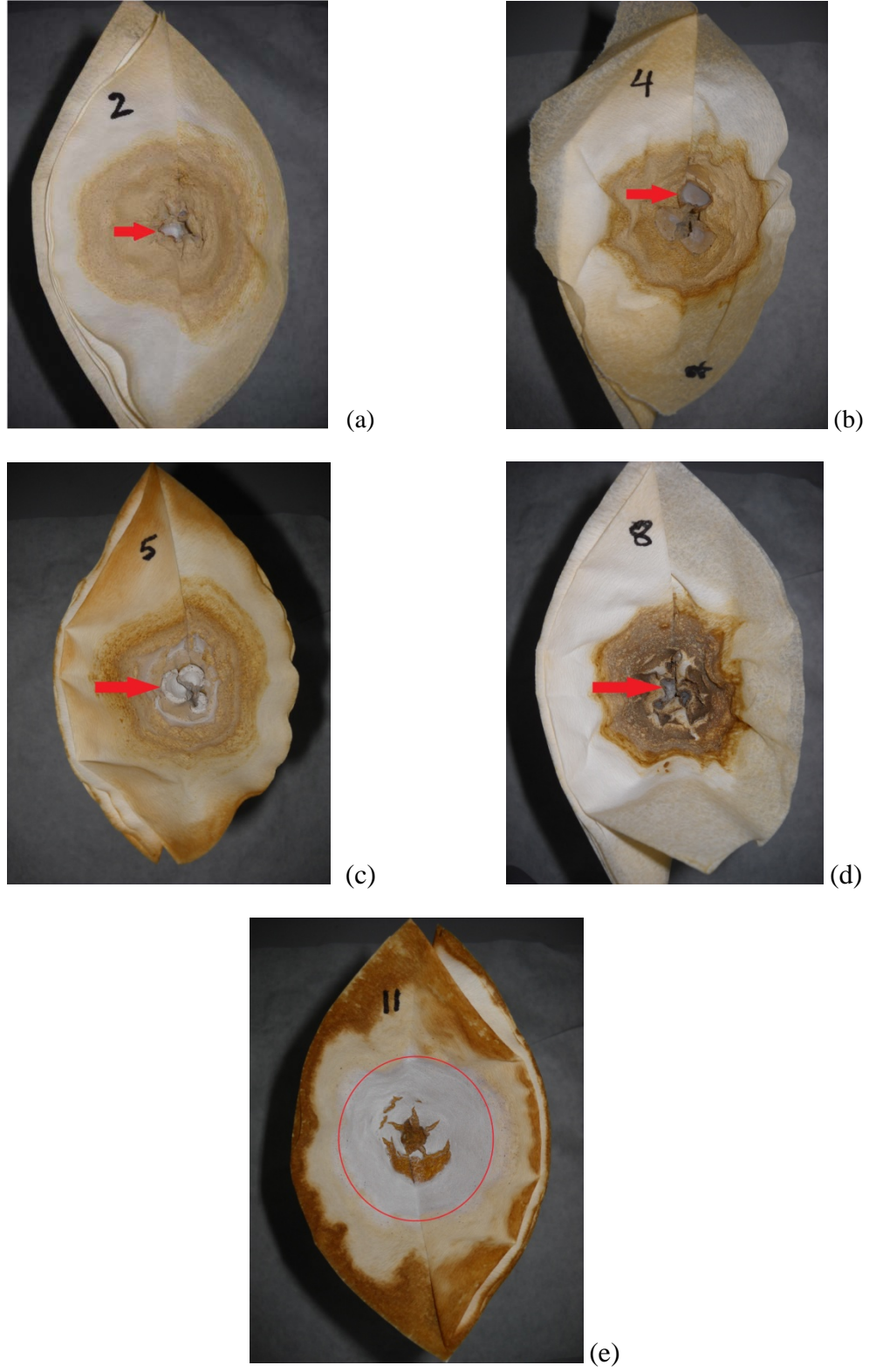
4.1.6.3 SFM broth

Denemesi yapılan son besiyeri, SFM Broth besiyeri olarak hazırlanıp, her erlene 150 ml besiyeri dökülmüştür. Besiyeri erlene döküldükten sonra soğutularak, besiyeri içerisine CaCl_2 direkt olarak ve üreyi 0.2 meshlik filtreden geçirerek, 13 tekerrürlü ve her tekerrürde 1:1 oranda eklenmiştir. Besiyerlerinin

pH' sı 8.5-9.0' a ayarlanmış ve her besiyerine 100 µl M107 izolatu aktarılmış, +30 °C' deki inkübatörde 10 gün bekletilerek biyoçimentonun oluşumu hedeflenmiştir. Örnekler 10.günde aktiviteleri ölçülmüş (Çizelge 4.12), erlendeki örnekler filtre kağıtından geçirilerek, oda sıcaklığında kurutulmuş filtre kağıtları SEM'de analiz edilmiştir. Analizler sonucu 2, 4, 5, 8 ve 11.tekerrürlerde biyoçimento oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 4.11).

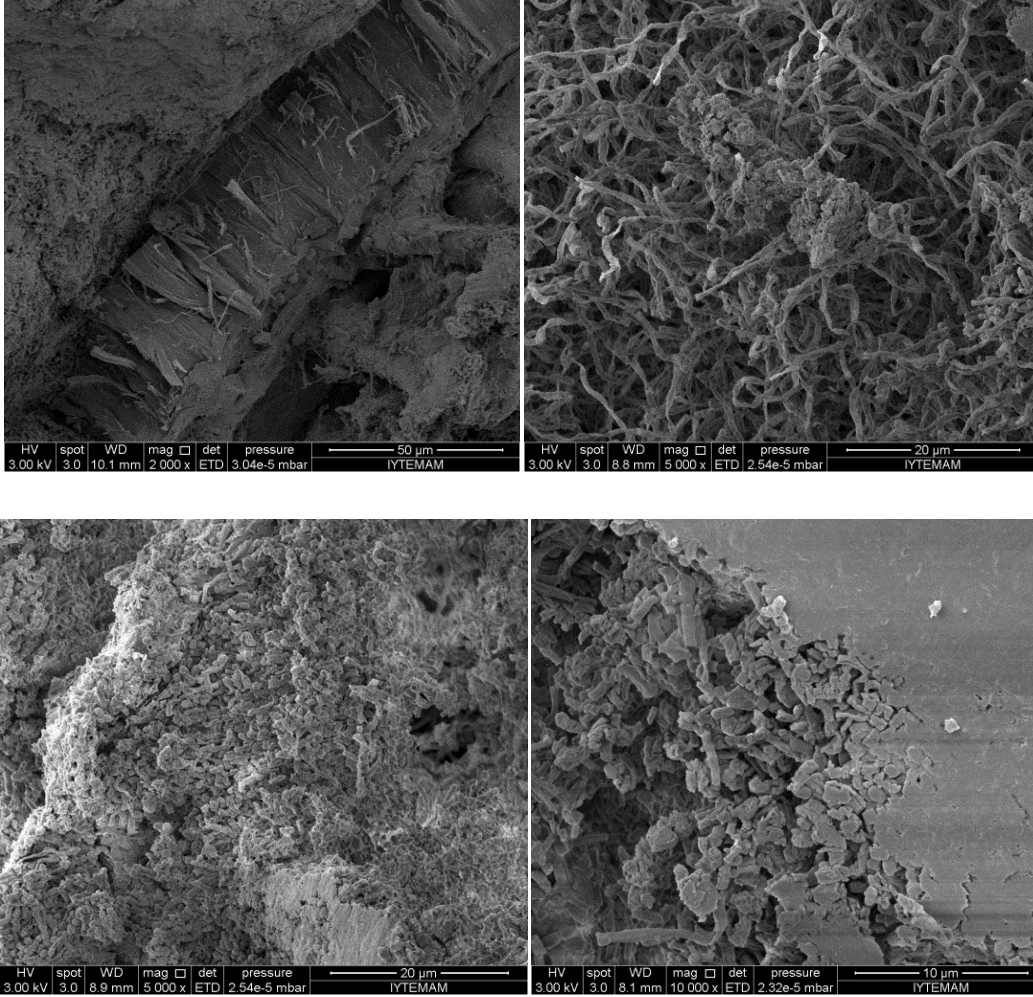
Çizelge 4.12. SFM Broth besiyerinde M107 izolatının üreaz aktivitesi, protein miktarı ve spesifik aktivitesi.

Tekerrür	Üreaz aktivitesi (U/ml)	Protein miktarı (mg/ml)	Spesifik aktivite (U/mg)
1	1.014	0.294	3.448
2	0.465	0.298	1.560
3	0.499	0.255	1.956
4	0.489	0.300	1.63
5	0.502	0.362	1.386
6	0.495	0.265	1.867
7	0.260	0.262	0.992
8	0.472	0.268	1.761
9	0.536	0.288	1.861
10	-	0.295	-
11	0.431	0.419	1.028
12	0.505	0.255	1.980
13	1.098	0.282	3.893

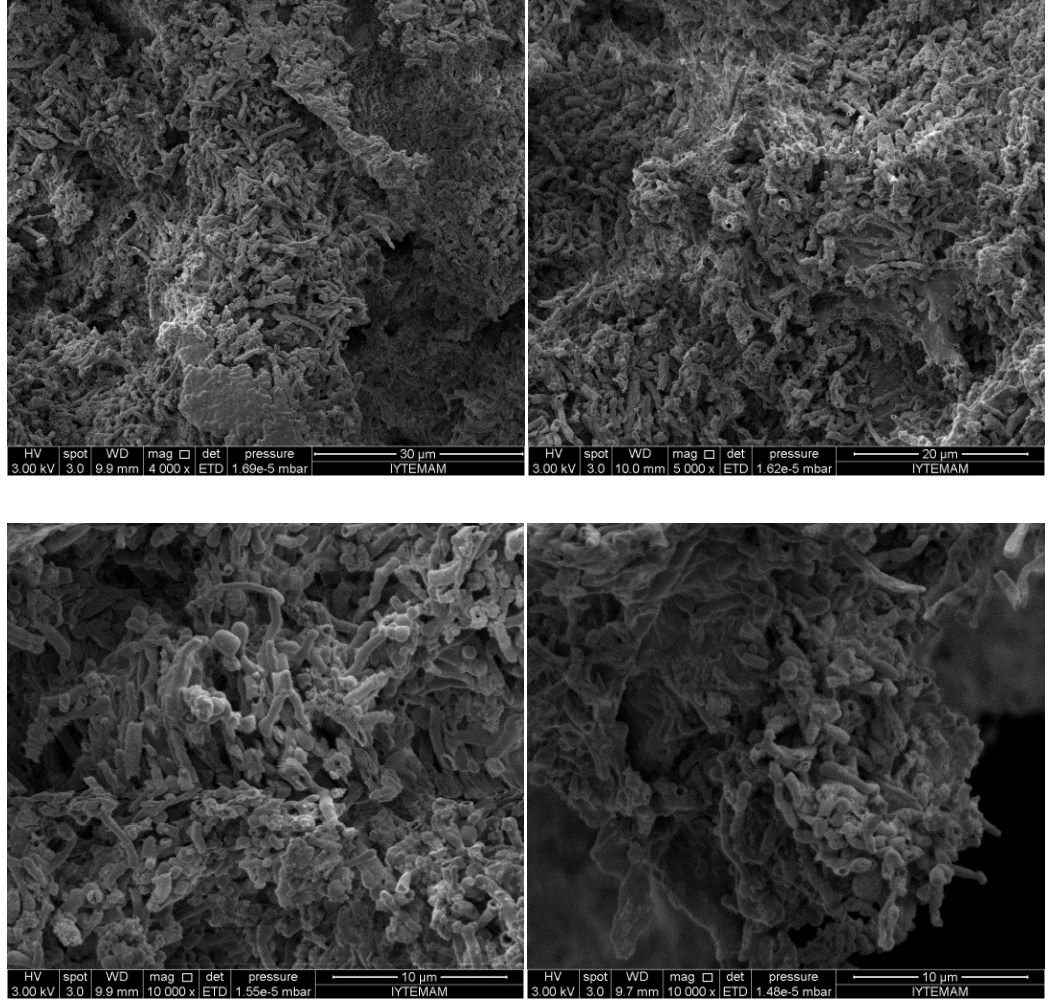


Şekil 4.11. Tekerrürlerin filtreden geçirilerek kurutulmuş durumları. (a) 2.tekerrür, (b) 4.tekerrür (c) 5.tekerrür, (d) 8.tekerrür, (e) 11.tekerrür.

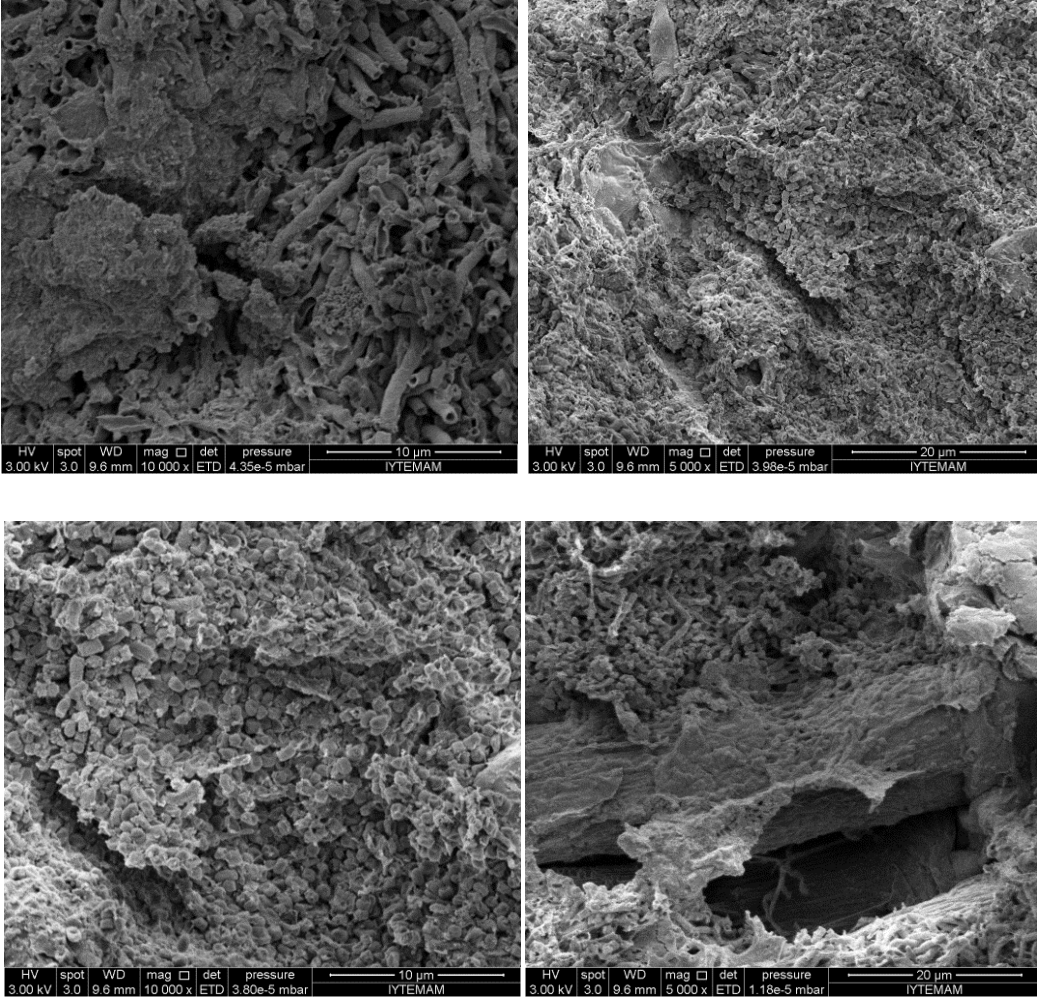
Yukarıda bahsedilen tekerrürlerin SEM ile fotoğrafları çekilmiştir. Çekilen fotoğraflarda biyoçimento oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 4.12, 4.13, 4.14, 4.15, 4.16).



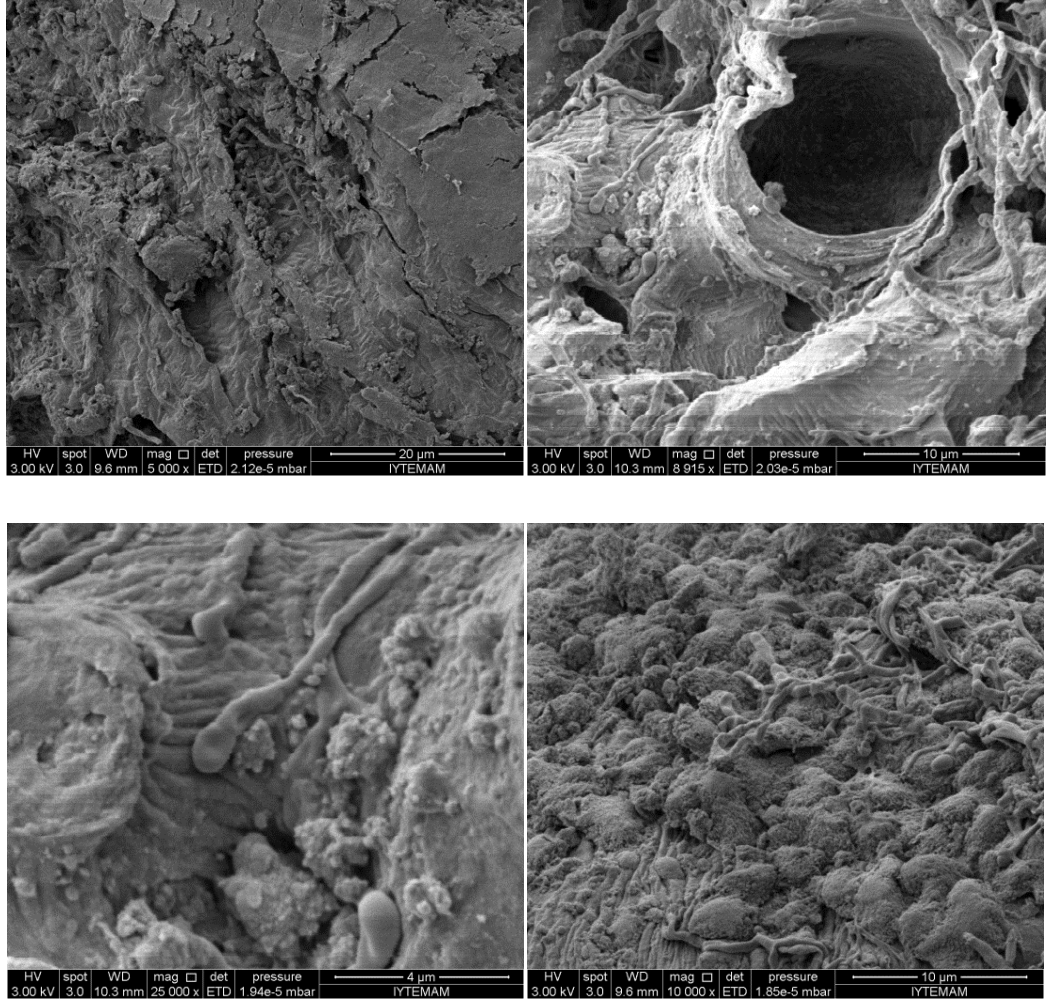
Şekil 4.12. 2.tekerrürün SEM görüntüleri.



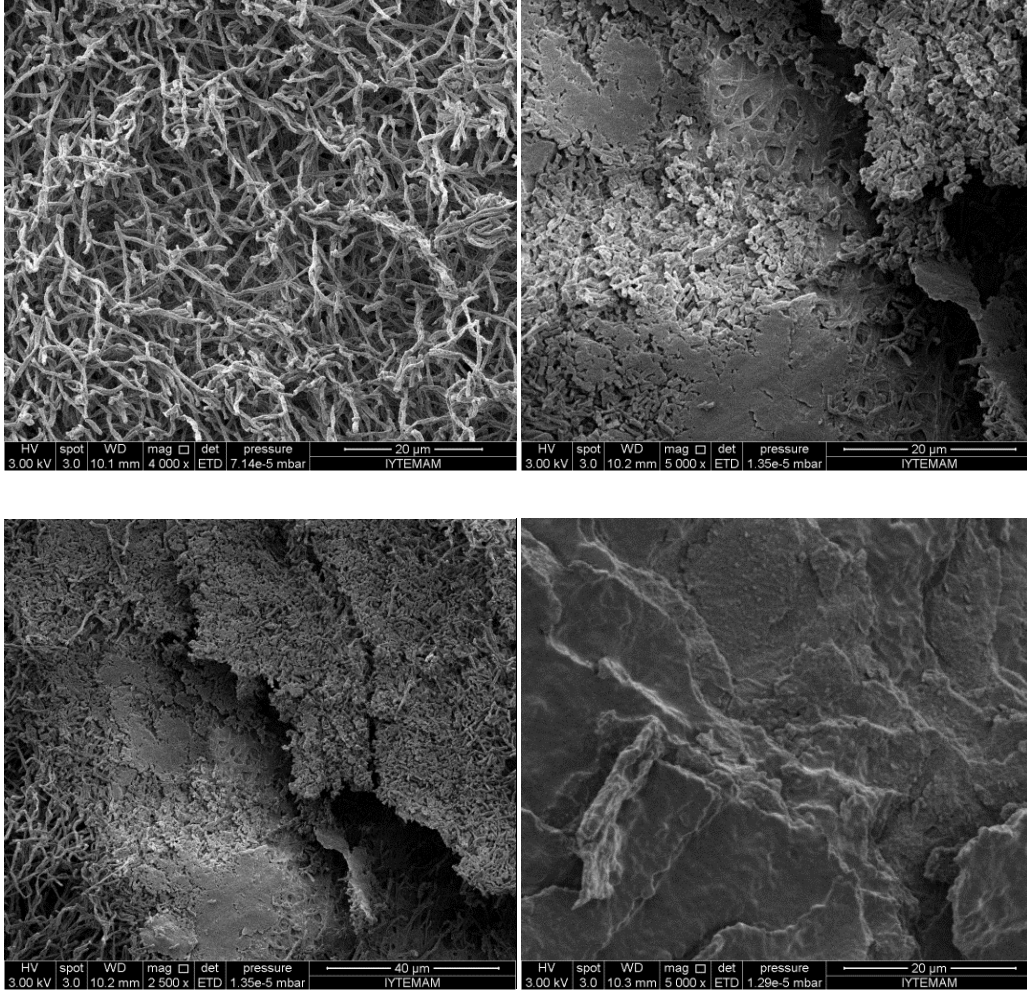
Şekil 4.13. 4.tekerrürün SEM görüntüleri.



Şekil 4.14. 5.tekerrürün SEM görüntüleri.



Şekil 4.15. 8.tekerrürün SEM görüntüleri.



Şekil 4.16. 11.tekerrürün SEM görüntüleri.

4.2 Tartışma

Araştırma sonuçlarımıza göre, *Streptomyces spp.* türlerinin üreaz aktivitesi gösterdiği, *Bacillus* ve *K.oxytoca*'lerin yeteri kadar üreaz aktivitesi göstermediği belirlenmiştir. Bu çalışmada, *Bacillus* ve *K.oxytoca*' ların üreaz aktivitesi göstermemesinin nedeni örneklerin toplandığı yerlerin farklılığı gösterilebilir.

Örneklere *Streptomyces spp.* türlerinin üreaz aktivitesi gözlemlerine bakıldığında M107, M136K-2 ve M123-2 izolatlarında üreaz aktivitelerinin görüldüğü, 136sy-s, 2M21, M125-1, M-127-2, S3, 1M1, M80 izolatlarında ise üreaz aktivitesinin görülmediği belirlenmiştir. M107, M136K-2 ve M123-2 izolatlarının üreaz aktivitelerinin birbirlerine çok yakın olduğu gözlemlenmiştir.

Literatürdeki çalışmalara bakıldığında, bu çalışmada da denenen *Bacillus* ve *K.oxytoca* mikroorganizmalarında üreaz aktivitesi gözlemlenirken; bizim çalışmamızda kullanılan türlerde önemli derecede üreaz aktivitesine rastlanılmamıştır. Bunların aksine bu çalışmayla literatürde ilk defa *Streptomyces spp.*' den üreaz enzimi üretimi gerçekleştirilmiş ve mevcut üreaz aktivitesiyle yine ilk kez biyoçimento üretiminde denenmiştir. Bu tür farklılıkların görülmesi, biyoçimento üretiminde anahtar bileşen olan üreaz enziminin daha etkili ve yüksek aktivitede belirlenmesi için daha fazla çalışmanın yapılması gerekmektedir.

İzolatlardaki üreaz aktivitesinin 14 gün boyunca sabit kalmasının nedeni, izolatların hücre dışı enzim salgılama karakteristiğinde olmalarıdır. İzolatların bu özelliğinden dolayı, yaşam süreçleri boyunca ortama üreaz enzimi salgılayarak, besiyerinde sürekli üreaz enziminin bulunması olarak açıklanabilir.

Üreaz aktivitesine sahip olan *Streptomyces spp.* türlerinin protein tayini sonuçlarına göre, M107, M136K-2 ve M123-2 izolatlarının protein miktarları birbirlerine yakın olarak belirlenmiştir. İzolatların protein miktarları 0.249 mg/ml ile 0.398 mg/ml aralığında bulunmuştur. 14 gün boyunca yapılan analizlerde, izolatların protein miktarlarının sabit kalmasının 2 nedeni olabilmektedir. Birincil nedeni izolatların kendilerine has protein üretiminin bulunması, ikincil nedeni ise besiyerinde soya ununun bulunması olarak düşünülebilir.

Üreaz aktivitesi gösteren M107 izolatının 13 tekerrürlü analizine bakıldığında, 2, 4, 5, 8 ve 11. tekerrürlerinde biyoçimento oluşumu görülmüştür.

Elde edilen sonuçlara göre, *Streptomyces spp.* diğer türlerinde ve farklı üreaz aktivitesi gösteren mikroorganizmalarda biyoçimento üretimi araştırılmalarının daha da artırılması ve standart bir üretim için optimizasyonun sağlanması gerekmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Anonim**, 2013a, http://en.wikipedia.org/wiki/Timeline_of_biotechnology (Erişim tarihi: 22 Haziran 2013).
- Anonim**, 2013b, http://search.cosmobio.co.jp/cosmo_search_p/search_gate2/docs/RAL_/UR1068.20120406.pdf (Erişim tarihi: 07 Eylül 2013).
- Bachmeier, K.L., Williams,A.E., Warmington, J.R. and Bang.S.S.**, 2002, Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation. *Journal of Biotechnology* 93:171–181pp.
- Baskar, S., Baskar, R., Mauclaire, L. and McKenzie, J.A.**, 2006, Microbially induced calcite precipitation in culture experiments: Possible origin for stalactites in Sahastradhara caves, Dehradun, India. *CURRENT SCIENCE*, 90, 1.
- Becker, B., Lechevalier, M.P. and Lechevalier, H.A.**, 1965, Chemical Composition of Cell-Wall Preparations from Strains of Various Form-Genera of Aerobic Actinomycetes. *Applied microbiology*.
- Bradford, M.M.**, 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. Volume 72, Issues 1–2, 248–254.
- Bundeleva, I.A., Shirokova, L.S., Bénézech, P., Pokrovsky, O.S., Kompantseva, E.I. and Balor, S.**, 2012, Calcium carbonate precipitation by anoxygenic phototrophic bacteria. *Chemical Geology* 291:P:116–131.
- Castanie, S., Metayer-Levrel, G.L. and Perthuisot, J.P.**, 1999, Ca-carbonates precipitation and limestone genesis - the microbiogeologist point of view. *Sedimentary Geology*, 126(1–4), 9–23 pp.
- Cheng, L. and Cord-Ruwisch, R.**, 2012, In situ soil cementation with ureolytic bacteria by surface percolation. *Ecological Engineering* 42, 64– 72 pp.
- Chun, J., Youn, H.D., Yim, Y.I., Lee, H., Kim, M.Y., Hah, Y.C. and Kang, S.O.**, 1997, *Streptomyces seoulensis* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology*, 492–498 pp.
- Cuthbert, M.O., Riley, O.M., Handley-Sidhu, S., Renshaw, J.C., Tobler, D.J., Phoenix, V.R. and Mackay, R.**, 2012, Controls on the rate of ureolysis and the morphology of carbonate precipitated by *S. Pasteurii* biofilms and limits due to bacterial encapsulation. *Ecological Engineering* 41, 32– 40 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- De Muynck, W., De Belie, N. and Verstraete, W.,** 2010, Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review. *Ecological Engineering* 36 (2010) 118–136 pp.
- 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 pp.
- 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 pp.
- Dymond, S.,** 2004, Biocement. Murdoch University.
- Ghosh, P., Mandal, S., Chattopadhyay, B.D. and Pal, S.,** 2005, Use of microorganism to improve the strength of cement mortar. *Cement and Concrete Research* 35, 1980 – 1983 pp.
- Gonsalves, G.M.,** 2011, Bioconcrete- A Sustainable Substitute for Concrete?. Master Thesis. universitat politècnica de catalunya.
- Gopal, J.V., Thenmozhi, M., Kannabiran, K., Rajakumar, G., Velayutham, K. and Rahuman, A.A.,** 2013, Actino bacteria mediated synthesis of gold nanoparticles using *Streptomyces* sp. VITDDK3 and its antifungal activity. *Materials Letters* 93, 360–362 pp.
- Gündoğdu, E.,** 2006, Termofilik *Streptomyces* spp.’lerin moleküler taksonomisi. Doktora tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Gürel, D.,** 2006, Rizosferden izole edilen antimikrobiyal aktiviteli *Streptomyces*’lerin nümerik taksonomisi. Yüksek lisans tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Işık, M., Altaş, L., Özcan, S., Şimşek, İ., Ağdağ, O.N. ve Alaş, A.,** 2012, Effect of urea concentration on microbial Ca precipitation. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*.
- Jones, K. L.,** 1949, Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. *J. Bacteriol.*, 57, 141-145.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kalaylı, E. ve Beyatlı, Y.**, 2003, Bacillus Cinsi Bakterilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri, PHB Üretimleri ve Plazmid DNA' ları. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi. 01(12), 24-35.
- Kavitha and Vijayalakshmi, M.**, 2007, Studies on Cultural, Physiological and Antimicrobial Activities of *Streptomyces rochei*. Journal of Applied Sciences Research, 3(12): 2026-2029.
- Kim, B., Sahin, N., Minnikin, D.E., Zakrzewska-Czerwinska, J., Mordarski, M. and Goodfellow, M.**, 1999, Classification of thermophilic *Streptomyces*, including the description of *Streptomyces thermoalcalitolerans* sp. n. ov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 7-17.
- Kim, S.B., Seong, C.N., Jeon, S.J., Bae, K.S. and Goodfellow, M.**, 2004, Taxonomic study of neutrotolerant acidophilic actinomycetes isolated from soil and description of *Streptomyces yeochonensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 211–214.
- 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: Eleucidation of the difference in inhibition activity, *Bioorganic Chemistry* 38, 132–137 pp.
- Küster, E. and Williams, S.T.**, 1964, Selection of Media for Isolation of *Streptomyces*. *Nature* 202, 928-929. doi:10.1038/202928a0.
- Lee, J.Y., Lee, J.Y., Jung, H.W. and Hwang, B.K.**, 2005, *Streptomyces koyangensis* sp. nov., a novel actinomycete that produces 4-phenyl-3-butenic acid. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 257–262.
- Li, W., Liu, L., Chen, W., Yu, L., Li, W. and Yu, H.**, 2010, Calcium carbonate precipitation and crystal morphology induced by microbial carbonic anhydrase and other biological factors. *Process Biochemistry* 45, 1017–1021 pp.
- Macedo, J.M.B., Gottschalk, L.M.F. and Bon, E.P.S.**, 1999, Calcium carbonate mediates higher lignin peroxidase activity in the culture supernatant of *Streptomyces Viridosporus* T7A. *Braz. J. Chem. Eng.* 16(2).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Okwadha, G.D.O. and Li, J.**, 2010, Optimum conditions for microbial carbonate precipitation. *Chemosphere*. 81(9), 1143–1148 pp.
- Saintpierre-Bonaccio, D., Amir, H., Pineau, R., Lemriss, S. and Goodfellow, M.**, 2004, *Streptomyces ferralitis* sp. nov., a novel *Streptomyces* isolated from a New-Caledonian ultramafic soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 2061–2065.
- 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 pp.
- Shirling, E.B. and Gottlieb, D.**, 1966, Methods for characterization Of *Streptomyces* species. *International journal of systematic bacteriology*. 16(3). 313-340 pp.
- Shirling, E.B. and Gottlieb, D.**, 1968, Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. 11. Species descriptions from first study. *International journal of systematic bacteriology*. 18, 69-189 pp.
- Siddique, R. and Chahal, N.K.**, 2011, Effect of ureolytic bacteria on concrete properties. *Construction and Building Materials*, 25, 3791–3801 pp.
- Tünger, A., Çavuşoğlu, Ç. ve Korkmaz, M.**, 2005, Asya mikrobiyoloji. Asya Tıp Kitabevi. ISBN: 9756882174.
- Whiffin, V.S.**, 2004, Microbial CaCO₃ precipitation for the production of biocement. Ph.D thesis. Murdoch University.
- Williams, S.T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E.M.H., Sneath, P.H.A. and Sackins, M.J.**, 1983, Numerical Classification of *Streptomyces* and Related Genera. *Journal of General Microbiology*, 129, 1743-1813.

ÖZGEÇMİŞ

22.07.1984 Orumiyye-İRAN doğumlu Taymaz AZARNO, 2006 yılında Tonekabon Azad Üniversitesi Mikrobiyoloji Bölümünden Mezun oldu. Halen Ege Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisansını yapmaktadır.