

**OTLUKBELİ (ERZİNCAN) GÖLÜNDEKİ
BİYOJEOKİMYASAL DÖNGÜLERDE ROLÜ
OLAN BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE
MOLEKÜLER TANISI**

Ahmet ATICI

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Özlem BARIŞ
2019
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**OTLUKBELİ (ERZİNCAN) GÖLÜNDEKİ BİYOJEOKİMYASAL
DÖNGÜLERDE ROLÜ OLAN BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE
MOLEKÜLER TANISI**

Ahmet ATICI

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Genel Biyoloji Bilim Dalı**

**ERZURUM
2019**

Her hakkı saklıdır



**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TEZ ONAY FORMU

**OTLUKBELİ (ERZİNCAN) GÖLÜNDEKİ BİYOJEOKİMYASAL
DÖNGÜLERDE ROLÜ OLAN BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE
MOLEKÜLER TANISI**

Prof. Dr. Özlem BARIŞ danışmanlığında, Ahmet ATICI tarafından hazırlanan bu çalışma 17/01/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı – Genel Biyoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Mehmet Nuri AYDOĞAN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Özlem BARIŞ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 07/02/2019 tarih ve 06/24 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP, projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 2016/167

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

OTLUKBELİ (ERZİNCAN) GÖLÜNDEKİ BİYOJEOKİMYASAL DÖNGÜLERDE ROLÜ OLAN BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER TANISI

Ahmet ATICI

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

Danışman: Prof. Dr. Özlem BARIŞ

İlk varolduğu günden şimdiki zamana kadar dünyamızda elementler çeşitli formlar oluşturarak jeolojik döngüleri oluşturmaktadır. Bu döngülerin içerisinde canlıların yer aldığı ve bu döngüleri büyük oranda etkilediği bilinmektedir. Özellikle bakterilerin bu madde döngülerinde ki katkıları birçok araştırmacının dikkatini çekmektedir. Özel ekosistemlerde jeokimyasal döngüler ise daha büyük önem arz etmektedir. Bu nedenle bu çalışma ile Otlukbeli (Erzincan) Gölü ve etrafındaki farklılık gösteren kısımlardan örneklemeler yapılarak jeokimyasal döngülere katkısı olduğu düşünülen izolatlar çalışılmıştır. İzole edilen bakterilerin Azot fiksasyonu, İnorganik Fosfat çözünürlüğü, Demir şelasyonu, Kükürt fiksasyonu ve Kalsiyum Karbonat çözme ve oluşturma üzerine etkileri çeşitli testler ile analiz edilmiştir. Aynı ayrı sonuçlar dikkat çekici olmakla beraber çoklu pozitif olan izolatlar seçilerek 16S rRNA gen bölgeleri çoğaltılarak dizi analizleri alınmış ve tanılama işlemleri yapılmıştır. Sonuç olarak 8 toprak ve su örneği ile başlanan çalışmada 76 izolat elde edilmiş ve bu örnekler seçilerek 5 tanesi tanılanmıştır. Tanılama sonucunda; *Bacillus megaterium*, *B. simplex*, *B. atropheus*, *Solibacillus sylvestris* ve *B. licheniformis* türleri elde edilmiştir.

2019, 102 sayfa

Anahtar Kelimeler: Biyojeokimyasal döngü, Otlukbeli gölü, Madde döngüleri, Şelasyon, *Bacillus*.

ABSTRACT

Master Thesis

ISOLATION AND MOLECULAR DIAGNOSIS OF BACTERIA, ROLE IN THE BIOGEOCHEMICAL CYCLES OF OTLUKBELİ (ERZİNCAN) LAKE

Ahmet ATICI

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Department of General Biology

Supervisor: Prof. Dr. Özlem BARIŞ

From the first day until the present time, elements in our world form various forms and form geological cycles. It is known that these cycles take place and affect these cycles to a great extent. Particularly, the contribution of bacteria in these material cycles attracts the attention of many researchers. Geochemical cycles in special ecosystems are of great importance. For this reason, in this study, the isolates which are thought to have contributed to geochemical cycles were studied. Nitrogen fixation, Inorganic Phosphate solubility, Iron chelation, Sulfur fixation and Calcium Carbonate were investigated by various tests. Although the results were remarkable, multiple positive isolates were selected, and 16S rRNA gene regions were replicated and sequenced. As a result, 8 soil and water samples were obtained and 76 isolates were obtained and 5 of them were selected. As a result of the diagnosis; *Bacillus megaterium*, *B. simplex*, *B. atropheus*, *Solibacillus sylvestris* and *B. licheniformis* species were obtained.

2019, 102 pages

Keywords: Biogeochemical cycle, Otlukbeli lake, Substance cycles, Chelation, *Bacillus*.

TEŞEKKÜR

Başta araştırmanın planlanmasından yürütülmesine ve sonuçlarının değerlendirilmesine kadar her aşamasında büyük bir sabırla ve anlayışla yardımlarını, kıymetli zamanlarını ve desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Özlem BARIŞ'a gerek bana kazandırdıkları ve öğrettikleri için gerekse de gösterdiği sabır ve anlayış için teşekkürlerimi arz ediyorum.

Çalışma sırasında bize bölümleriyle birlikte yüreklerini da açan Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji bölümüne ve Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ'a, DAYTAM yönetimi ve tüm çalışanlarına teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Çalışmalarımın farklı aşamalarında desteklerini esirgemeyen bölüm hocalarıma, laboratuvarlarda birlikte çalıştığım ekip arkadaşlarıma ve Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü çalışanlarına teşekkür ederim.

Her gidişimde güler yüzlerini ve yardımseverliklerini esirgemeyen Fen Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım sırasında manevi desteklerini hep yanımda hissettiğim, onlara ayırmam gereken zamanı akademik çalışmalarına ayırdığım ailem, çocuklarım ve mesai arkadaşlarıma ve dostlarıma teşekkür eder sevgilerimi ve saygılarımı sunarım.

Ahmet ATICI

Ocak 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	16
2.1. Ekosistem	16
2.2. Ekosistemin Ögeleri	16
2.3. Ekosistemler	18
2.4. Canlı-Çevre İlişkileri ve Biyolojik Çeşitlilik	19
2.5. Bir Ekosistem Olarak Göller	20
2.6. Oluşumlarına Göre Göller	20
2.7. Otlukbeli Gölü.....	21
2.8. Göl Çevresinin Yapısı ve Jeomorfolojik Özellikleri	26
2.9. Bakteriler ve Bakterilerin Biyojeokimyasal Döngüler Açısından Önemi.....	30
2.9.1. Bakteriler ve bakteri sistematigi.....	30
2.9.2. Tanı ve karakterizasyon için kullanılan yöntemler	32
3. MATERYAL ve METOD.....	39
3.1. Materyal.....	39
3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar	39
3.1.2. Çalışmada kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı	40
3.2. Metod.....	44
3.2.1. Kaynaktan örneklerin alınması ve bakterilerin izolasyonu	44
3.2.2. Kalsiyum karbonat (CaCO ₃) oluşturma özelliklerinin araştırılması	50
3.2.3. CaCO ₃ çözme özelliklerinin araştırılması	50
3.2.4. Azot fiksasyon özelliklerinin araştırılması.....	51
3.2.5. İnorganik fosfat çözünürlüğü özelliklerinin belirlenmesi	51

3.2.6. Siderefor etkilerin ve demir-kükürt oksidasyonlarının belirlenmesi.....	51
3.3. Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi.....	51
3.4. Kültür Özelliklerinin Belirlenmesi.....	52
3.5. İzolatların Bazı Genetiksel Özelliklerinin Belirlenmesi	53
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	56
4.1. İzole Edilen Bakterilerde CaCO_3 Çözme Sonuçları.....	58
4.2. İzole Edilen Bakterilerde CaCO_3 Oluşturma Sonuçları	58
4.3. İzole Edilen Bakterilerin Azot Fiksasyonundaki Etkinlikleri	60
4.4. İnorganik Fosfat Çözünürlüğü Özelliklerinin Belirlenmesi Sonuçları.....	61
4.5. İzole Edilen Bakterilerin Siderofor Etkileri ve Demir Şelasyonu Özelliklerinin Belirlenmesi Sonuçları	62
4.6. İzole Edilen Bakterilerin Kükürt (S) Fiksasyonundaki Etkinliklerinin Belirlenmesi	64
4.7. Seçilen Örneklerin Tanı ve Morfolojik Özellikleri	67
4.8. Seçilen Örneklerin Moleküler Tanı Sonuçları.....	68
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	69
KAYNAKLAR	90
ÖZGEÇMİŞ	103

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre (10 ⁻⁶)
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
ADP	Adenosine-5'-diphosphate
ATP	Adenosine-5'-triphosphate
bp	Base pair (Baz çifti)
cm	Santimetre
CTAB	Hekzadesil trimetil-amonyum bromit
Da	Dalton
dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
Dntp	Deoksinükleotittrifosfat
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
g	Gram
km	Kilometre
L	Litre
m	Metre
mm	Milimetre
M	Molar
m ²	Metrekare
mg	Miligram
mL	Mililitre (10 ⁻³)
mM	Milimolar
N	Normal
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu

rDNA	Ribozomal DNA
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TAE	Tris Asetat EDTA tamponu
TE	Tris-EDTA tamponu
Tris-HCl	Trihidroksimetil amino metan-hidroklorik asit
UV	Ultra Viyole
vb	Ve benzeri
vs	Vesaire



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Madde döngüsü ve güneş enerjisinin etkisi	2
Şekil 1.2. Su döngüsünün genel şeması	3
Şekil 1.3. Karasal ve sucul ortamlardaki karbon döngüsü	5
Şekil 1.4. Doğadaki azotun jeokimyasal döngüsü	7
Şekil 1.5. Doğadaki azotun jeokimyasal döngüsü	8
Şekil 1.6. Doğadaki fosfor döngüsü	9
Şekil 1.7. Doğada demir döngüsünün genel şeması	11
Şekil 1.8. Doğada kükürt döngüsü	13
Şekil 2.1. Ekosistemin biyotik ve abiyotik öğeleri ve etkileşimleri	17
Şekil 2.2. Ekosistemin biyotik ve abiyotik öğeleri ve etkileşimlerin diyagramı	18
Şekil 2.3. Otlukbeli gölünün konum haritası	22
Şekil 2.4. Gölün doğu istikametinden görünümü	22
Şekil 2.5. Gölün güneydoğu istikametinden görünümü ve göle karışan maden suları...	23
Şekil 2.6. Gölün güney istikametindeki kalkerli yapılar ve demir – kükürt içerikli yapının görünümü	23
Şekil 2.7. Gölün güney istikametine akan sular	24
Şekil 2.8. Gölün güney kısmına akan sular. Aynı morfolojik yapı gölün alt kısımlarında da devam etmektedir	24
Şekil 2.9. Göl ve çevresindeki kalkerli yapılar	25
Şekil 2.10. Kalkerli yapılardan ilginç bir görüntü	25
Şekil 2.11. Göl çevresindeki çatlaklar ve bu çatlaklardan çıkan gaz ve maden suları ...	27
Şekil 2.12. Göl çevresindeki traverten oluşumları	27
Şekil 2.13. Traverten oluşumuna sebep olan su kaynakları	28
Şekil 2.14. Traverten oluşumuna sebep olan su kaynakları	28
Şekil 2.15. Göl çevresinde gözlenen biyofilm tabakası	29
Şekil 2.16. Gölün alt kısımlarında bir miktar suyun döküldüğü düden içinde oluşan CaCO_3 sarkıtları	29
Şekil 3.1. Ekimi yapılan bir türün oluşturduğu rhizoid koloni formu.	45

Şekil 3.2. Farklı türlere ait olduğu renk ve koloni morfolojilerinden belli olan bakteriler.....	45
Şekil 3.3. Gölün güney istikametinden çıkıp göle karışan maden suları.	46
Şekil 3.4. Gölün güney istikametinden çıkan suların birikmiş hali	46
Şekil 3.5. Gölün güney istikametine doğru akıp göle karışmayan maden suları.	47
Şekil 3.6. Kaynaklardan bir kısmı göle dökülürken bir kısmı güney istikametine dere yatağına akmaktadır.....	47
Şekil 3.7. Göl çevresinde görülen gaz çıkışları.....	48
Şekil 3.8. Gölün güney istikametinde bulunan gaz çıkışı çatlakları	48
Şekil 3.9. Gölün kuzey tarafındaki yamaçlarda oluşmaya başlamış traventerler.	49
Şekil 3.10. Traverten oluşumları.....	49
Şekil 3.11. Travertenlerde kalsifikasyon oluşumları	50
Şekil 3.12. Hazırlanan dilüsyonlardan gösterilen örnekte seyreltmeden önceki ve sonraki hali görülmektedir.	57
Şekil 3.13. B-4 Besiyerinde CaCO_3 oluşumu	59
Şekil 5.1. 4-1, 3-3, 10-7 ve 4-9 olarak kodlanan izolatlardaki sarı renge dönüşme demir oksidasyonunu göstermektedir.	79

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Örneklerin alındığı araştırma yapılan göl ve çevresindeki bölgelere verilen kodlar, dilüsyon oranları, izolat sayıları ve izolatlara verilen kodlar	57
Çizelge 4.2. Göl ve çevresinden elde edilen bakteri izolatlarının saf kültürlerinin <i>in vitro</i> CaCO ₃ çözme durumları	58
Çizelge 4.3. Göl ve çevresinden elde edilen bakteri izolatlarının saf kültürlerinin <i>in vitro</i> CaCO ₃ oluşturma durumları.....	60
Çizelge 4.4. Göl ve çevresinden elde edilen bakteri izolatlarının saf kültürlerinin <i>in vitro</i> azot fiksasyonundaki etkinlikleri	61
Çizelge 4.5. Göl ve çevresinden elde edilen bakteri izolatlarının saf kültürlerinin <i>in vitro</i> inorganik fosfat çözünürlüğündeki etkinlikleri	62
Çizelge 4.6. Göl ve çevresinden elde edilen bakteri izolatlarının saf kültürlerinin <i>in vitro</i> demir şelasyonundaki etkinlikleri	63
Çizelge 4.7. Göl ve çevresinden elde edilen bakteri izolatlarının saf kültürlerinin <i>in vitro</i> kükürt oksidasyonundaki etkinlikleri	64
Çizelge 4.8. Çalışma sonucunda elde edilen verilerinin toplu halde gösterimi	65
Çizelge 4.9. En iyi sonuç veren ve bu sonuçlara göre tür tayini için AltıGenBio firmasına gönderilen izolatlara ait bilgiler.....	67
Çizelge 4.10. Tür tanımlamaları yapılan izolatlara ait veriler.	68
Çizelge 5.1. CaCO ₃ çözme reaksiyonu gösteren izolatlar	71
Çizelge 5.2. CaCO ₃ oluşturan izolatlar	73
Çizelge 5.3. Azot fiksasyonunda etkin izolatlar	75
Çizelge 5.4. İnorganik fosfat çözünürlüğünde etkin olan izolatlar	76
Çizelge 5.5. Demir şelasyonunda etkin olan izolatlar.....	78
Çizelge 5.6. Kükürt fiksasyonunda etkin izolatlar	81

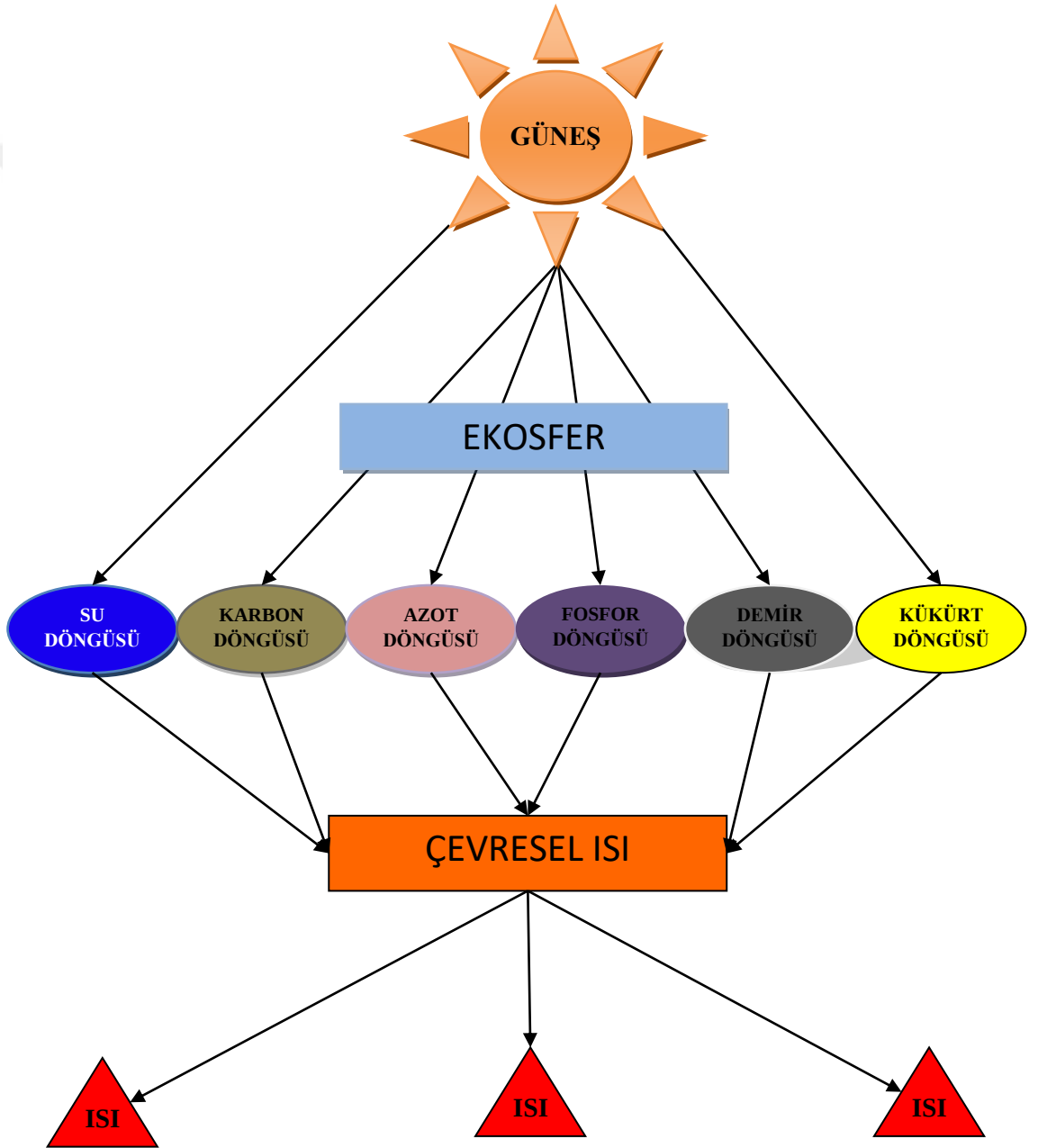
1. GİRİŞ

Bütün canlılar, bulundukları ortam neresi olursa olsun, şartlar ne kadar ağır ve olumsuz olursa olsun yaşamlarını sürdürebilmek, hayatta kalabilmek ve çoğalmak zorundadırlar. Bu zorunluluk onların genetik kodlarında saklanmıştır. Bütün bunların olabilmesi için bulundukları ortamla sürekli besin ve madde alış verişi içerisinde olmaları da bir başka zorunluluktur. Madde, bu zorunluluktan ötürü mutlaka canlılar tarafından alınmalı ve bir başka formuyla ait olduğu yere geri bırakılmalıdır. Maddenin canlı ve cansız çevre arasındaki bu alış-verişine madde döngüsü ya da ekolojik döngü denilmektedir. Doğadaki bu madde döngüleri için sonsuz bir enerji kaynağına ihtiyaç vardır. Bu enerji kaynağı ise güneştir (Cardenas *et al.* 2018) (Şekil 1.1).

Bir maddenin biyotik ve abiyotik çevre arasındaki döngüsüne biyojeokimyasal döngü denilmektedir. Biyojeokimya terimi birkaç yüzyıl öncesinden söyleniyor olsada bu terim ilk defa Vernadsky (1926) tarafından, dünyadaki bütün jeokimyasal olayların herhangi bir yolla canlı yaşam tarafından etki altına alındığını belirtmek üzere kullanılmıştır (Schlesinger 2013). Biyojeokimyasal döngüler, biyosfer, hidrosfer, litosfer ve atmosferden oluşan dört kategorik alan içindeki maddenin taşınması ve dönüştürülmesi ile gerçekleşir. Bu dört alandan ilki olan biyosfer bitki, hayvan, mantar, mikroorganizma gibi canlıların bulunduğu ortamdır. Diğer üç bölge hidrosfer deniz, göl ve nehirleri içeren su alanlarını, litosfer toprak ve yer kabuğunu, atmosfer ise hava ve gazların bulunduğu alanı ifade etmekle birlikte biyosferle yakın ve iç içe ilişkilerinden dolayı canlı organizmaları barındırmaktadırlar (Madsen 2011; Moses 2012).

Biyojeokimyasal döngülere bazen besin döngüsü de denir. Çünkü canlı organizmalara besleyici destek sağlayan bileşiklerin döngülerini de kapsar. Biyojeokimyasal madde döngüleri biyolojik, jeolojik ve kimyasal süreçleri içermektedir ve “Biyojeokimyasal” ismi bu üç sürecin birleşmesiyle ortaya çıkmaktadır. Madde, bu döngüler arası geçişte yok olmadığı gibi bir azalma da söz konusu değildir. Maddesel anlamda şekil ve isim değiştirir. Biyolojik tüketiciler olarak kabul edilen herbivor ve karnivorlar var olmadan önce de bu döngü bugün olduğu gibi devam etmekteydi. Zira bu döngünün kesintiye

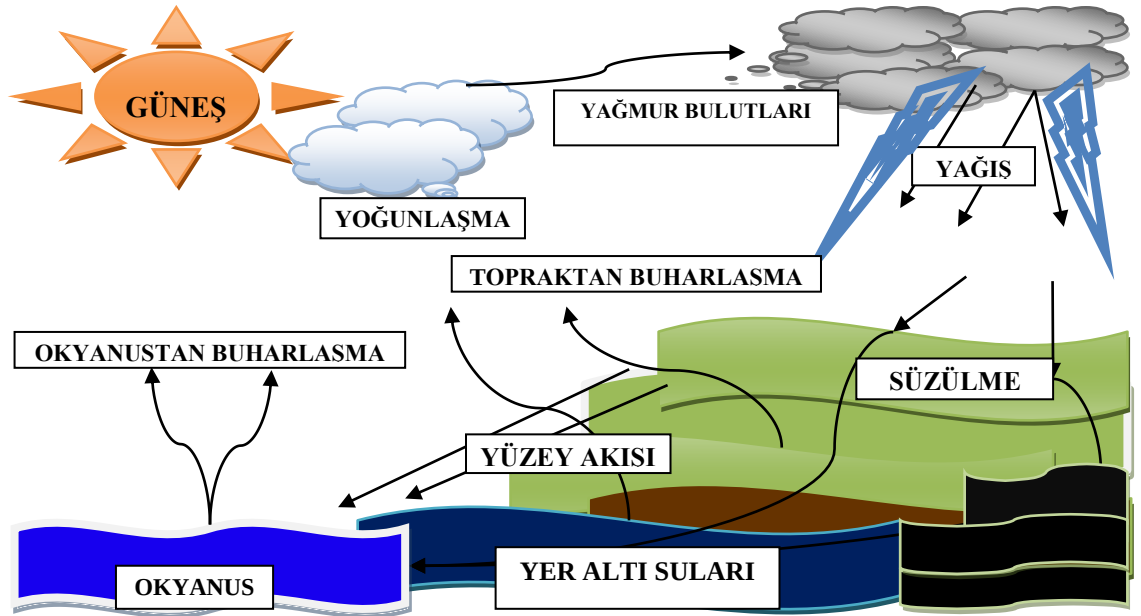
uğraması veya durması demek bugün birçok organik, inorganik veya kimyasal maddenin bulunmaması veya çok az miktarda bulunması anlamına gelirdi. Çünkü doğada sürekli bir yıkım ve harcamanın yanı sıra herbivor ve karnivorlar tarafından da sürekli bir tüketim söz konusudur. Maddenin devamlılığı yüksek oranda bu döngünün devamlılığına bağlıdır (Madsen 2011).



Şekil 1.1. Madde döngüsü ve güneş enerjisinin etkisi

İnsanoğlunun tabiata ilişkin gözlem ve bilgilerinin artmasıyla birlikte bu döngülerin nasıl gerçekleştiği önemli bir merak konusu olmuş ve insanoğlu ilk olarak hayatın vazgeçilmezi olan su döngüsünden işe başlamıştır. Soru veya sorun açıldı aslında; “Hayat kaynağımız olan su, birgün biter mi?” Cevap ta bir o kadar basittir. Bitkiler, yani yaşamın temel üreticileri ototroflar topraktan suyu emer veya diğer canlılar (heterotroflar) biyolojik olarak suyu alır, terleme, diğer salgılama sistemleri (idrar, dışkı vb.) ve solunum ile su atmosfere aktarılır, yağışlarla (yağmur, kar gibi) su tekrar toprakla birleşir, su topraktan süzülerek yer altı suları ile birleşir ve döngü başa döner. Aynı döngü okyanuslar, akarsular ve göller için de geçerlidir. Farklı olarak, bir canlı tarafından alınıp yok veya az miktardadır ve yoğun bir buharlaşma söz konusudur (Divine *et al.* 2010; Bertoni 2011; Huntington and Williams 2012).

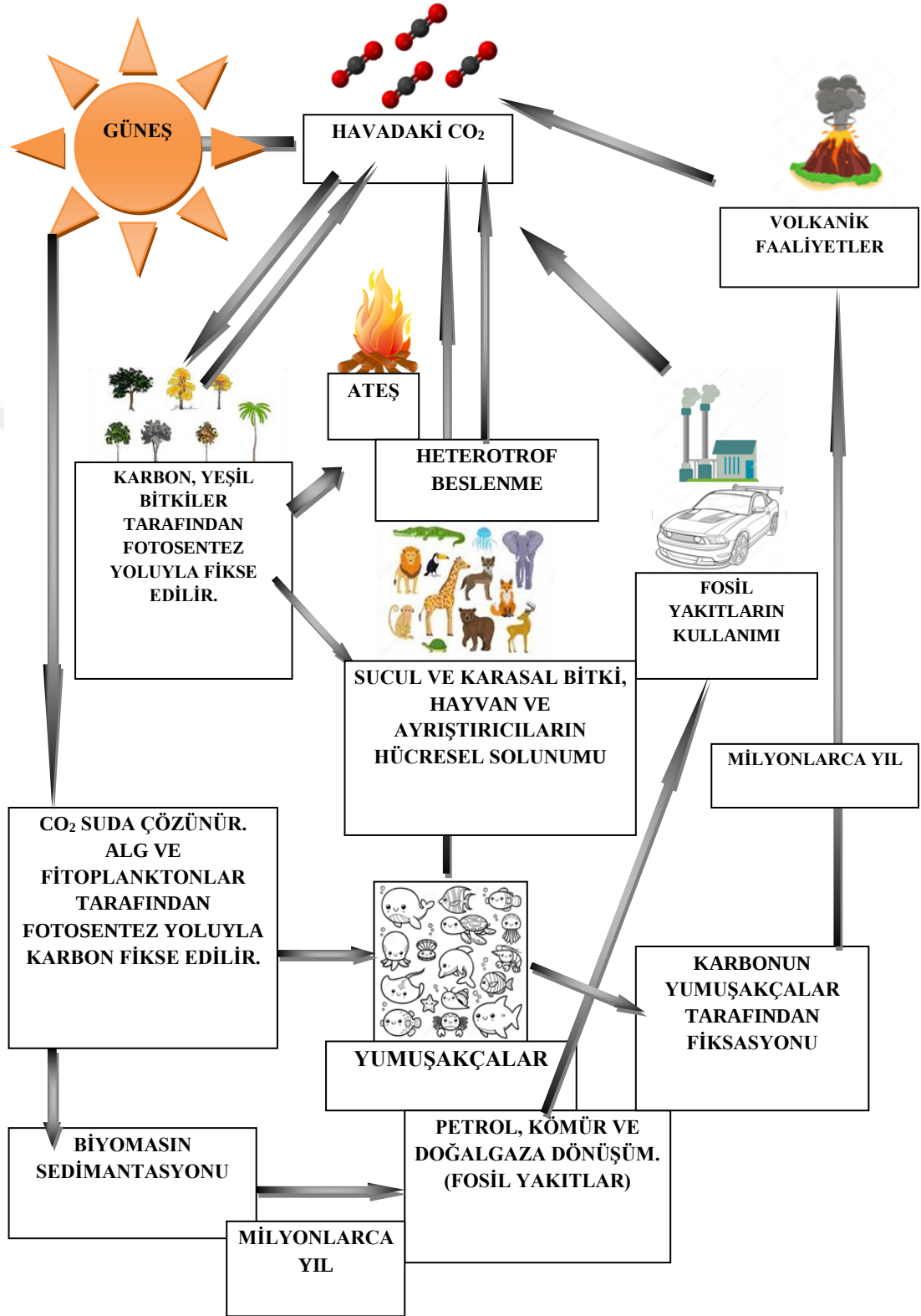
Bu döngü sayesinde yeryüzünün içerdiği su kütlesi sabit kalır ve hiçbir su molekülü yerküre ve atmosferin dışına çıkamaz. Ancak ve ancak yer çekimi ve güneşin etkisi ile doğada belli bir düzen içerisinde hareket eder. Suyun litosfer, hidrosfer ve atmosfer arasındaki bu hareketine su döngüsü veya hidrolojik döngü denilmektedir (Pagano and Sorooshian 2002; Bertoni 2011; Huntington and Williams 2012) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Su döngüsünün genel şeması

Canlılığın temel kaynağı olan su döngüsü aydınlatıldıktan sonra canlıyı oluşturan elementler, yani karbon (C), azot (N), fosfor (P) ve canlının yaşamını sürdürebilmesi için mutlak gerekli olan demir (Fe) ve kükürt (S) gibi iz elementlerin döngüleri merak konusu olmuştur.

Karbon, tüm canlıların bileşiminde bulunan ve hayat için gerekli bütün organik moleküllerin başlıca yapı taşı olan bir elementtir (Spellman 1996). Karbonun litosfer, hidrosfer, atmosfer ve biyosfer olmak üzere 4 büyük kaynağı vardır. Atmosferde karbondioksit, hidrosferde karbondioksit ve bikarbonat, litosferde kömür, doğalgaz, petrol ve kireç taşı halinde, biyosferde ise tüm organik bileşiklerin temel maddesi halinde bulunur. Karbondioksitin litosferdeki doğal kaynağını yanardağlar oluşturur. Karbonat tortullarının okyanuslarda çökmesiyle, insanın doğada yaptığı mekanik etki (fabrikalar, araçlar, yangınlar vs.) ve doğanın kendi içerisindeki metabolik aktiviteleri ile (metabolik faaliyetler, fosiller vb.) ekosistemlerde karbon döngüsü gerçekleşir (Giller and Malmqvist 1998; Ciais *et al.* 2013; Schlesinger and Bernhardt 2013; Varotsos *et al.* 2014) (Şekil 1.3).



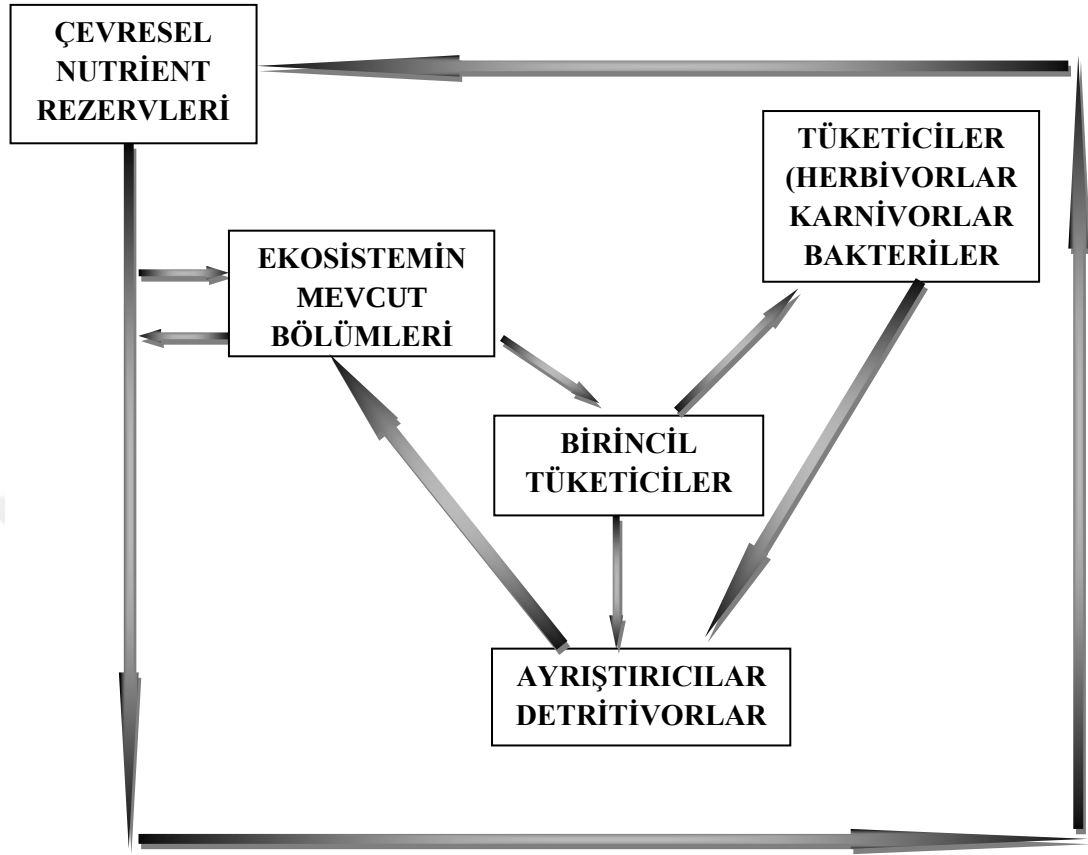
Şekil 1.3. Karasal ve sucul ortamlardaki karbon döngüsü

Canlılığın devamı için ikinci derecede önem arz eden, topraktaki döngüsü açısından öneminin yanı sıra bitki beslenmesinde olmazsa olmaz denilebilecek bir diğer elementte azottur. Azot gerek protein yapıların (ki enzimlerin büyük çoğunluğu) ve gerekse de aminoasitlerin, DNA ve RNA gibi nükleik asitlerin yapısında yer almaktadır. Bu nedenle azot birçok biyokimyasal reaksiyon için de önemli bir elementtir. Azot canlı hücrelerinin başlıca bileşenlerinden biridir ve canlı kuru ağırlığının %5'ini oluşturmaktadır (Horne and Goldman 1994). Azot gazı (N_2), atmosferin yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır. Bu gaz, az kullanıldığı ve su yüzeyi tükenmeyen bir azot kaynağı olan atmosfer ile sürekli temas halinde olduğu için en çok bulunan azot türüdür (Horne and Goldman 1994). Azot gazı (N_2) iki azot atomunu bağlayan üçlü bağ nedeni ile kimyasal olarak kolay tepkime vermeyen bir gazdır ve birçok bitki ve hayvan tarafından kullanılamamaktadır. Ancak azot gazı bazı mikroorganizmalar, bakteriler ve mavi-yeşil alglerce fikse edilerek canlı bünyesine alınabilmektedir. Aynı zamanda yıldırımlar atmosferik azot gazının bir kısmını nitrat türevlerine dönüştürmektedirler. Atmosferde oluşan bu azot formları değişik taşınma mekanizmaları ile yeryüzüne ulaşmaktadırlar. Organizmaların azotu N_2 haliyle kullanmaları imkânsızdır. Kullanım ve sonrasında geriye dönüşüm iki kademelidir.

1.Yıldırımlar (az miktarda), bazı bakteri türleri (*Nitrosomanas vb.*), bazı mavi yeşil algler (*Anabeana vb.*) ve endüstriyel teknolojiler (yapay gübreler) azotu kullanılabilir formlara dönüştürürler. Bu doğal ve mekanik yöntemlerle azot (N_2), amonyuma (NH_4^+) dönüşür. Buna literatürde Amonifikasyon denir. Daha sonra amonyum bazı toprak bakterileri (örneğin; *Nitrosomonas europaea*) ve mantarlar tarafından nitrit (NO_2^-) ve nitrata (NO_3^-) dönüştürülür. Buna ise Nitrifikasyon denir. Bu haliyle azot, bitkiler ve dolayısıyla diğer canlılar tarafınan kullanılabilir forma dönüşmüş olur.

2.Canlının ölümü ile ekosistemin 3. önemli zinciri olan ayrıştırıcılar tarafından bu yapı amonyağa (NH_3) çevrilir ve abiyotik yapıya geri dönmüş olur. Buradan yine bazı bakteriler tarafından (örneğin; *Nitrobacter winogradskyi*) azota dönüştürülür ve tekrar atmosfere döner. Bu ise Denitrifikasyon olarak isimlendirilir (Horne and Goldman 1994; Wetzel 2001; Varotsos *et al.* 2014; Lamba *et al.* 2016). (Şekil 1.4 ve 1.5).

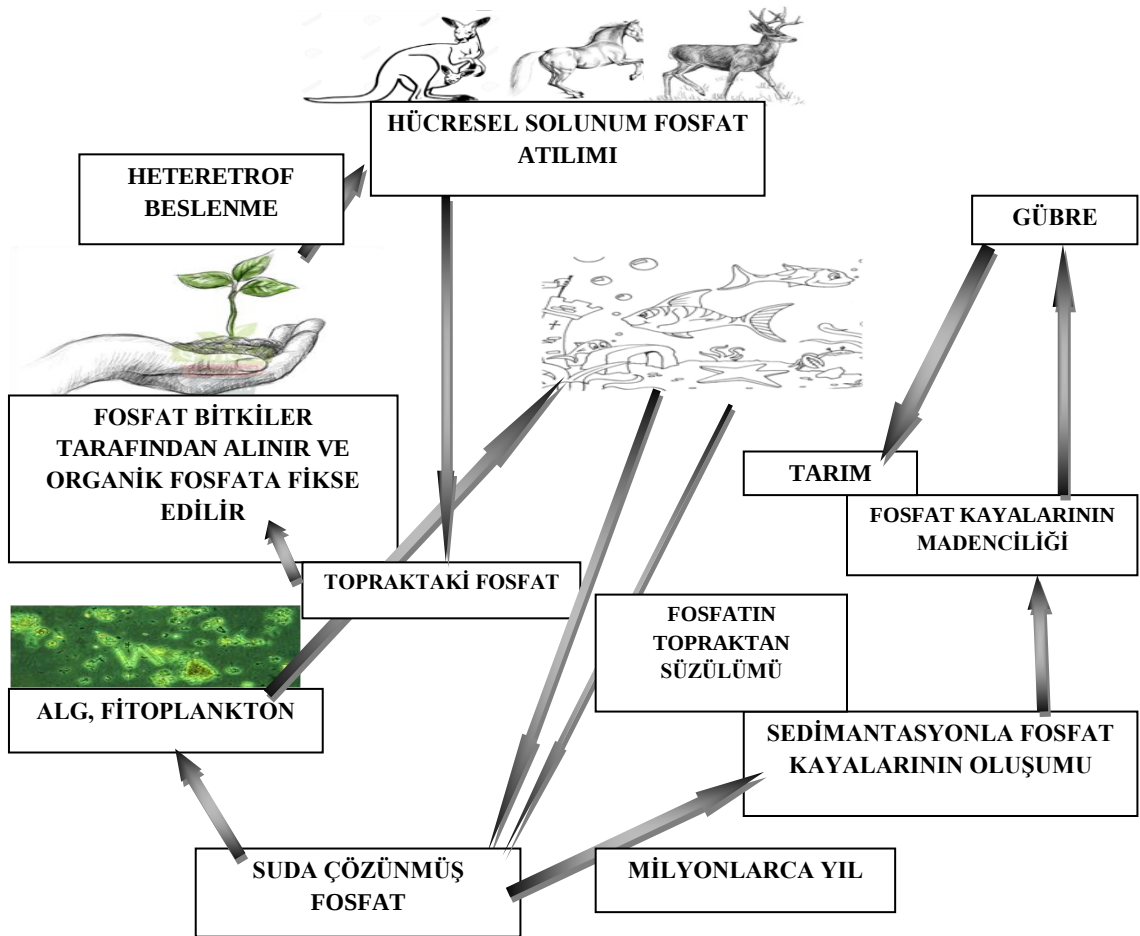
Şekil 1.4. Doğadaki azotun jeokimyasal döngüsü



Şekil 1.5. Doğadaki azotun jeokimyasal döngüsü (Basit Model)

Fosfor, genellikle su, toprak ve tortullarda bulunan bir elementtir. Fosfor yeryüzünde su, toprak ve sedimentlerde, normal basınç ve sıcaklık altında katı fazda bulunmakta ve diğer ametal döngülerindeki durumun aksine fosfor döngüsünde gaz fazı bulunmamaktadır (Horne and Goldman 1994). Toprakta kalsiyum, magnezyum, demir ve alüminyum fosfat gibi inorganik formda ya da organik formlar halinde bulunan maddelerin çözülmesinden meydana gelir. Bitkiler tarafından hidrojen fosfat (HPO_4^{-2}) ve dihidrojen fosfat (H_2PO_4) iyonları halinde alınan fosfor, kök sisteminin gelişmesi ve bitkilerin olgunlaşmasında önemli rol oynamaktadır (Atalay 1982). Ayrıca fosfor nükleik asitlerin yapısına, ATP, ADP yapısına, fosfolipit ve fosfoproteinlerin yapısına, hücre zarı, pek çok hayvan iskeleti ve derisinin yapısına girer (Barao 2014; Pasek *et al.* 2014).

Gaz halinde fosfor bulunmaz ve çoğunlukla karada trikalsiyumfosfat Ca_3PO_4 formundadır. Bunun sebebi, fosforun genellikle standart sıcaklık ve basınç altında sıvı olmasıdır. Fosfor esas olarak su, toprak ve çöktirilerden elde edilebilirken atmosferdeki çok küçük parçacıklar, fosfor veya fosfor bileşiklerini içerebilir. Fosfor yavaş yavaş topraktaki çöktirilere, canlı organizmalara ve daha da yavaş toprağa ve su tortullarına geçer. Bu nedenle fosfor döngüsü jeobiyokimyasal döngülerin en yavaş olanıdır. Fosfat bileşikleri su ile temas ettiklerinde inorganik fosfata dönüşürler. Bitkiler bu inorganik fosfatı kullanarak organik fosfat oluşumunu gerçekleştirir. Tüketiciler fosfatı bitkilerden alır. Bitki ve canlının ölümüyle fosfor ayrıştırıcılar tarafından tekrar inorganik fosfat halinde toprağa döner. Fosfat döngüsünü diğer döngülerden ayıran en önemli farklar çok yavaş oluşu ve gaz formunun olmamasından dolayı atmosfer evresinin olmayışıdır (Wetzel 2001; Barao 2014; Pasek *et al.* 2014) (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Doğadaki fosfor döngüsü

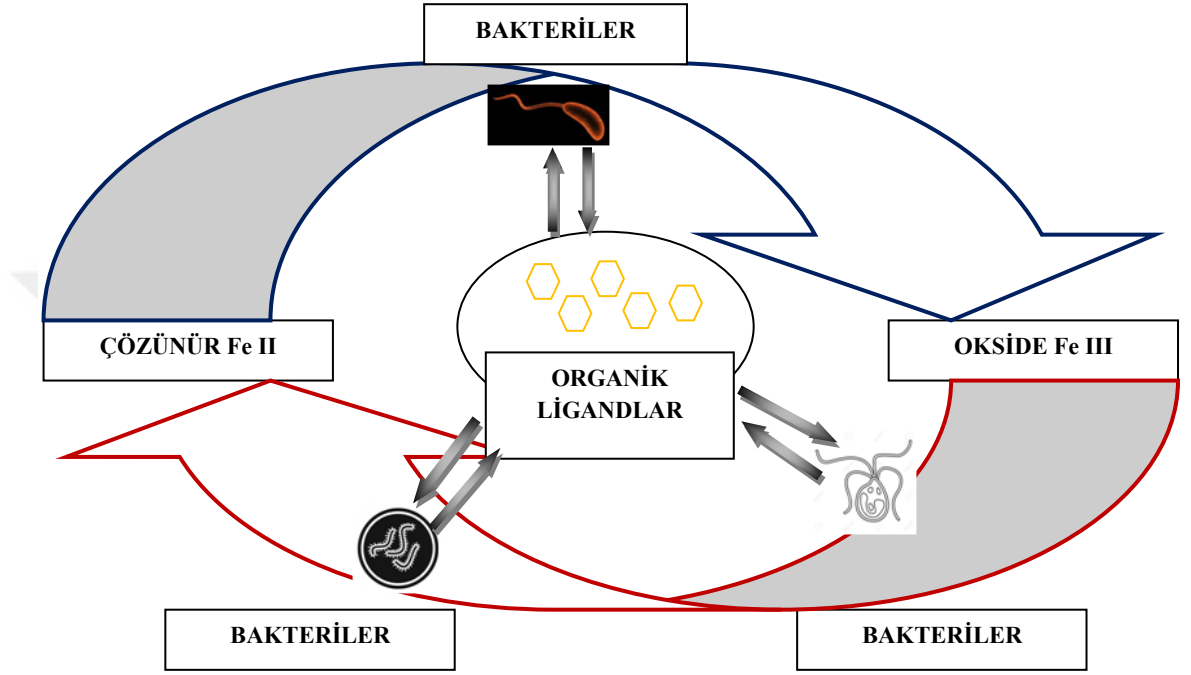
Demir (Fe); Yer kabuğunun. %5'ini oluşturan (Atalay 1982) bitkiler ve hayvanlar için mutlak gerekli bir elementtir. Ancak bütün canlılar tarafından az miktarda ihtiyaç duyulur (Özbek vd 1993). Doğal olarak Ferrus (Fe^{+2}) ve Ferrik (Fe^{+3}) olmak üzere iki oksidasyon formuna sahiptir. Üçüncü oksidasyon formu olan Fe^0 insan aktiviteleri sonucu meydana gelir. En çok bilinen demir filizleri hematit (Fe_2O_3), magnetit (Fe_3O_4), limonit ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), siderit (FeCO_3) ve pirit (FeS_2)'dir. Bunlardan; manyetit (Fe_3O_4) %60-70 oranında, hematit (Fe_2O_3) %40-60 oranında, limonit ($[\text{FeO}(\text{OH})]$) % 30-50 oranında demir içerir. Çoğu sülfür minerali de Fe (II) içerir ve asidik koşullar ($\text{pH} < 3$) altında Fe (II)'nin Fe (III)'e oksitlenmesi genellikle bakteriler tarafından kontrol edilir.

Mikroorganizmalar demiri birkaç yoldan çeşitli formlara dönüştürürler:

- a. Birçok bakteri türü ferrus demiri (Fe^{++}) ferrik düzeyine ($\text{Fe}^{+2} \longrightarrow \text{Fe}^{+3}$) oksitleyebilmektedir. Oksitlenen demir ferrihidroksit şeklinde çökeler.
- b. Birçok heterotrofik tür ise çözünür organik demir tuzlarını etkilemektedir. Bu şekilde demirde az çok çözünür inorganik form halinde çözelti fazında çökeltme gerçekleşir.
- c. Mikroorganizmalar çevrelerindeki oksidasyon - redüksiyon potansiyelini değiştirebilecek potansiyele sahiptirler. Redoks potansiyelinin azalması yüksek düzeyde çözünür ferrik bileşiklerinden ferro bileşiklerinin oluşumuna yol açar.
- d. Mikroorganizmalar çeşitli asitler üretmek suretiyle toprağın asitliğinin artmasına bu da demirin çözelti fazına geçmesine neden olur.
- e. Anaerob koşullarda sülfat ve organik kükürt bileşiklerinden sülfürler oluşur. Bu durumda çözünür fazdaki demir, ferro sülfür halinde çözültiden ayrılır.
- f. Mikroorganizmalar tarafından bazı organik asitler ve diğer karbonlu bileşiklerin serbest bırakılması, çözünür organik demir komplekslerinin oluşumunu etkiler (b'dekinin aksine) (Erbs and Spain 2002; Barış 2009).

Böylelikle doğada demir oksitleyen bakteriler, organik bileşiklerin ayrışmasıyla etken olan heterotrofların aktivitesi, algler, tarafından O_2 'nin serbest bırakılması, alkali reaksiyonların etkileri gibi aktiviteler sonucunda demir çökelebilir. Bunun tersi olarak

asit oluşumu bazı organik bileşiklerin sentezi veya redükte koşulların oluşturulmasıyla çözünürlük artabilir (Erbs and Spain 2002; Barış 2009; Boyd and Bressac 2016; Laufer *et al.* 2016) (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. Doğada demir döngüsünün genel şeması

Kükürt (S) doğada yaygın olarak bir elementtir. En büyük kaynağı ise denizlerde bulunan sülfattır. Diğer önemli kaynakları ise, kükürt içeren mineraller (pirit FeS_2 , kalkopirit CuFeS_2), fosil yakıtlar, yanardağ ve bataklıklardan çıkan hidrojen sülfür gazı (H_2S) ve organik maddelerdir. Mikroorganizmalar için önemli bir element olmakla beraber bitkilerde iz element olarak bulunması ve alınması gerekli, aminoasitlerin dolayısıyla birçok proteinin yapımına ve enzimlerin yapısına katılan bir elementtir.

Doğada kükürt döngüsü aşağıdaki 4 basamakla gerçekleşir.

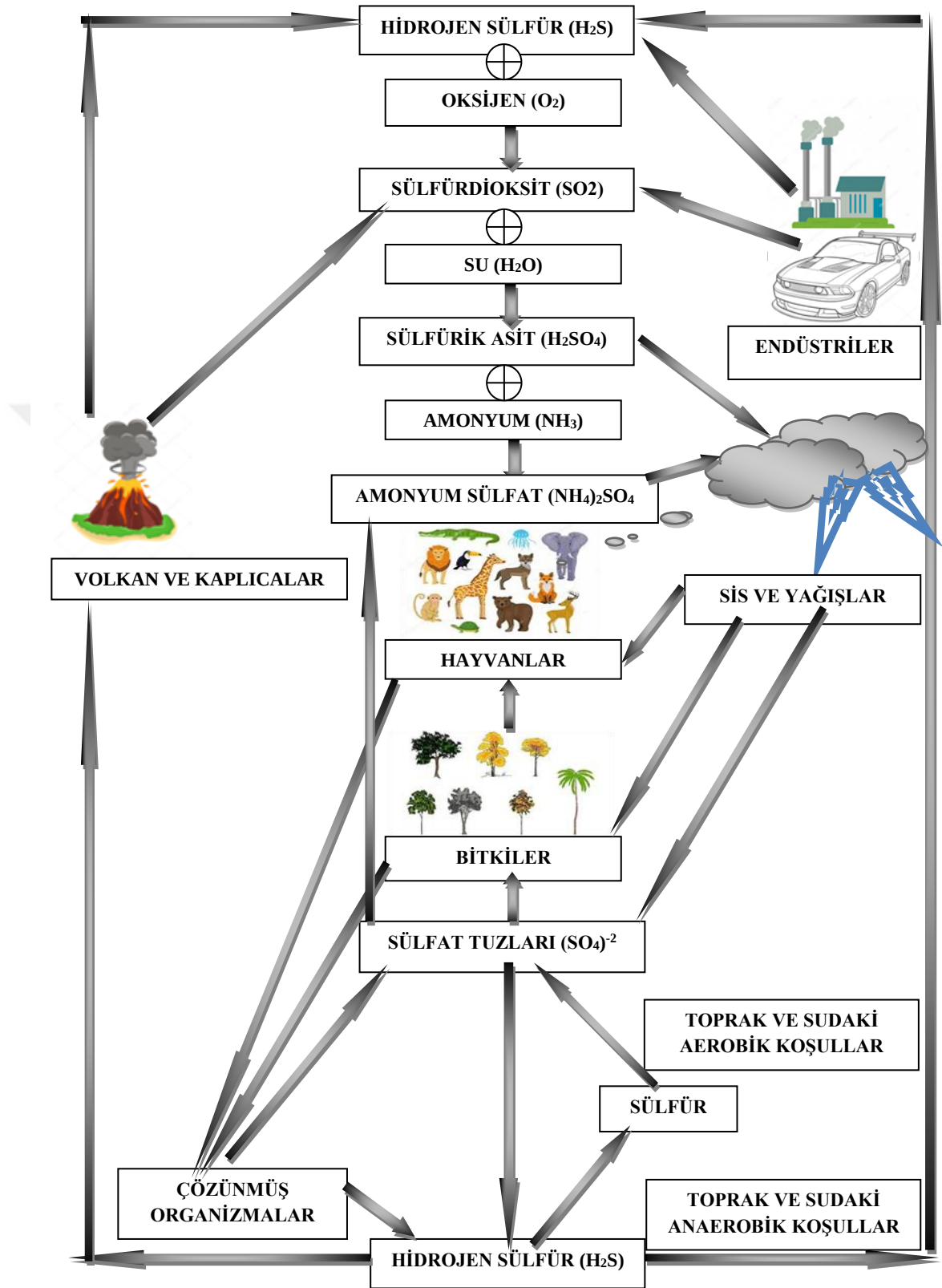
1. Organik kükürtün mineralizasyonu; Birçok mikroorganizma organik kükürtün mineralizasyonundan sorumludur. Aerobik koşullarda organik kükürt oksitlenerek sülfata dönüştürülür.

2. Assimilasyon; (hücre üretimi için kullanma) Mikroorganizmalar hücre ve enzim sentezi için kükürdü kullanır. Anaerobik bakteriler indirgenmiş kükürt bileşiklerini kullanırken, aerobik bakteriler daha çok oksitlenmiş haldeki kükürt formlarını (örneğin sülfat) kullanırlar.

3. Kükürt ve sülfür oksidasyonu; Oksidasyon aşamasında yine bakteriler rol alır. Örneğin aerobik H_2S oksidasyonunda *Thiobacillus thioparus*, anaerobik ortamda *Thiobacillus denitrificans*, düşük pH'larda ise *Acidithiobacillus thiooxidans* (eski adı *Thiobacillus thiooxidans*).

4. Sülfat indirgeme; Sülfat anaerobik şartlarda sülfat indirgeyen bakteriler (*Desulfomonas*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus*) tarafından indirgenerek H_2S 'e dönüştürülür.

Doğal formdaki kükürt katıdır ve bu formdaki kükürt sedimenter döngü ile sınırlıdır. Rüzgâr, su erozyonu ve volkanik patlamalar gibi jeolojik olaylar, insan etkisine bağlı olarak gerçekleşen mekanik vasıtalar ile fiziksel olarak taşınır. Bununla birlikte, kükürt dioksit, sülfürik asit, sülfat tuzları veya organik kükürt gibi bileşiklerinde kükürt, okyanustan atmosfere, karaya ve sonra yağışlar ve nehirler boyunca tekrar okyanusa taşınabilir (Sievert *et al.* 2007; Barış 2009; Meyer *et al.* 2016; Findlay and Kamysny 2017) (Şekil 1.8).



Şekil 1.8. Doğada kükürt döngüsü

Bütün bu döngülerden yola çıkarak şunu söylemek mümkündür: “Döngülerde jeokimyasal değişiklikleri gözlemlemek kolaydır. Ancak döngülerin hemen hiç birinde bir başlangıç noktası belirlemek mümkün değildir”. Döngülerin tamamında başlangıç noktası olmadığı gibi genel itibariyle değişiklikte yoktur ve süreklilik söz konusudur. Madde, bu döngüler arası geçişte her hangi bir yok oluşa ve azalmaya uğramaz. Maddesel anlamda şekil ve isim değiştirir. Bu, aynı zamanda jeokimyasal döngülerin temelidir. Tüm canlılar dünyanın yer kabuğu olarak adlandırılan yüzeyinde ya da bu yüzeye çok yakın ince bir toprak katmanı, bu katman üzerine yayılmış deniz ve göller ile atmosfer arasında kalan alanda yaşarlar ve güneş enerjisinin dışındaki gereksinimlerini bu katmanın içerdiği kaynaklardan karşılarlar. Eğer yaşamın sürmesi için gerekli olan su başta olmak üzere diğer tüm kaynaklar sadece bir kez kullanılmış olsaydı şimdiye kadar hepsi tükenmiş olurdu. Doğanın tüm işlevlerinin bu döngüler ile düzenlenmiş olması bu işlevlerin sonsuza dek yinelenmesini sağlamaktadır. Hava, su, toprak, bitkiler, mikroorganizmalar ve hayvanlar arasında sürekli bir alışveriş olması yeryüzündeki tüm kaynakların tekrar tekrar kullanılabilmesine ve böylelikle yaşamın sürekliliğine olanak verir (Moses 2010; Madsen 2011).

Biyojeokimyasal döngülerin tamamına bakacak olursak, genel olarak şunu söylememiz mümkündür. Döngülerin tamamında insandan bakteriye, en gelişkininden en ilkeline kadar hemen hemen bütün canlıların rolü vardır. Maddenin atmosferde veya biyosferde bulunmasına bakılmaksızın canlıların kullanacağı formlara dönüşümünde bakteriler ne kadar aktif ise bu formların alınıp kullanılmasında ve tekrar doğaya kazandırılmasında da mantarlar, bitkiler, omurgalı veya omurgasız hayvanlar ve insanlar da o kadar aktiflerdir. Fakat tüm bu döngülerde, elementlerin gerek yarayışlı formlara dönüştürülmesi gereksede kullanım sonucu ayrıştırılıp tekrar doğaya kazandırılmasında en büyük rol bakterilerindir. Daha sonrasında mavi-yeşil algler ve su yosunları, mantarlar, karasal habitat ve hayvanlar olarak biyojeokimyasal döngülerde yer alan canlıları sıralamak mümkündür (Offre *et al.* 2013; Wurzbacher *et al.* 2017; Liu *et al.* 2018).

Bu çalışma ile ekosistem dengesi ve canlılığın devamı için büyük öneme sahip biyojeokimyasal döngülerde yer alan mikroorganizmaların özel ekosistemlerden izolasyonu ve moleküler tanısı amaçlanmıştır. Özel ekosistem olarak Erzincan ili Otlukbeli ilçesi sınırları içerisinde yer alan doğal set oluşumuna ve özel alanlara sahip Otlukbeli Gölü ve etrafından örneklemeler yapılmıştır. Bu örneklerden yapılan izolasyonlar farklı amaçlarla kullanılabilirlikleri, olabilecek karbonatlı bileşik oluşturma-çözme, fosfat çözünürlüğü, azot fiksasyonu, kükürt ve demir üzerine etkilerine göre seçilerek etkili izolatlar 16S rRNA gen bölgelerinin DNA dizi analizlerine göre tanımlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Ekosistem

Ekosistemler üzerine araştırmalar 19. yüzyılın sonlarına doğru başlamıştır. Araştırmacılar önceleri ekosistem terimi yerine Mikrokosm, Forbes (1887), Holosenoz, Friederich (1930), Biyosistem, Thienmann (1939), ya da Biyojeosnoz, Rus ekologları (1947) terimlerini kullanmışlardır.

Ekosistem terimi ise ilk kez İngiliz bir botanikçi olan A.G. Transley (1935) tarafından bitki kommunitesi ile ortamın etkileşimini açıklamak amacıyla kullanılmıştır. Bu günkü anlamıyla Ekosistem; “Belli bir alanda yaşayan ve birbirleri ile sürekli etkileşim içinde olan canlılar ile cansız vrelerinin oluşturduğu bütündür” şeklinde tarif edilmiştir (de Jonge 2007; Anand *et al.* 2010).

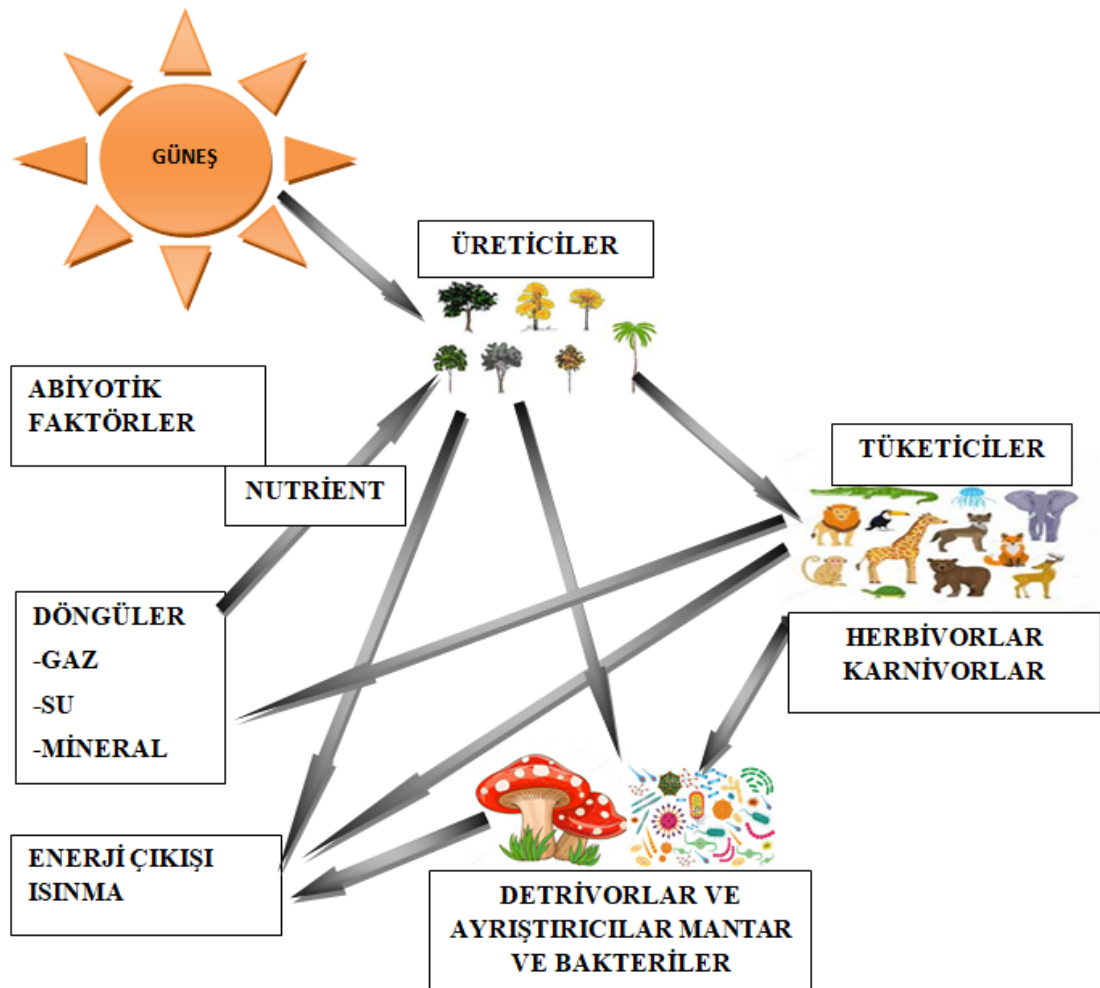
2.2. Ekosistemin ğeleri

Ekosistemlerin genel yapılarından bahsedildiğinde kendilerini oluşturan canlı ve cansız varlıklarla bunların barındırdığı tüm özellikler anlaşılmaktadır. Bu nedenle ekosistemi canlı (biyotik) ve cansız (abiyotik) ğeler oluşturur demek yanlış olmaz.

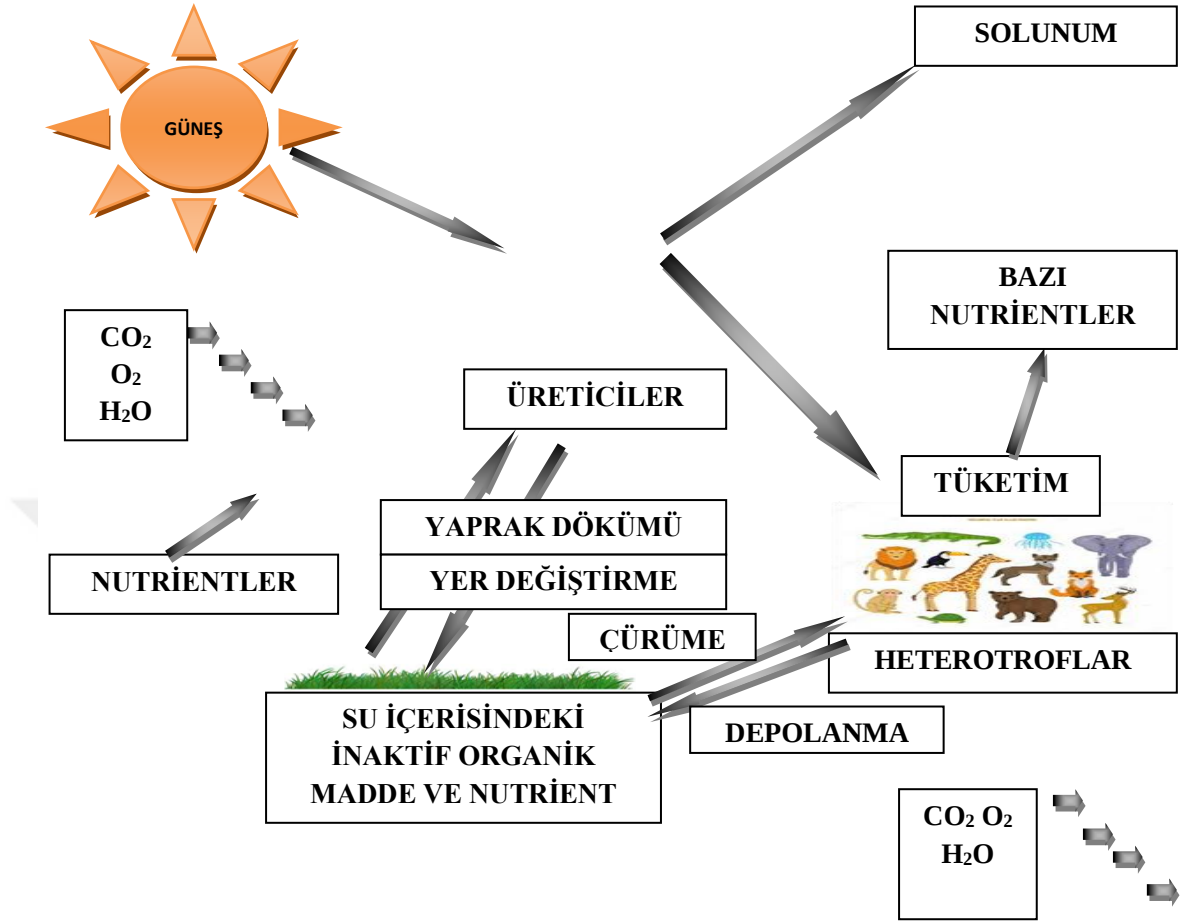
Cansız vre, bir besin ağı ile örülüdür. Bu örgüde besin sürekli bir döngü halindedir. Ekoloji vre bilimi olarak bilinir ve canlıların birbirleri ve vreleriyle ilişkilerini inceler. Ekosistem ise canlı ve cansız vrenin tamamıdır. Ekosistemi de abiotik faktörler (su, hava, iklim gibi cansız faktörler) ve biyotik faktörler (mikrobiota, fauna, flora gibi canlı faktörler) olmak üzere iki faktör oluşturur. Bu tanımlamadaki organizmalar, diğer bir deyim ile canlılar veya canlı vre; insan, hayvan ve bitkilere ait bireyleri veya bunlardan oluşmuş toplumları ifade etmektedir. Tanımlamanın içinde geçen organizmaların içinde yaşadıkları ortam terimi ise cansız vre olarak da ifade edilir ve hava, su, toprak, ışık gibi faktörleri kapsar. Biyotik etmenler içerisinde

Üreticiler, tüketiciler ve ayrıştırıcılar yer alırken abiyotik etmenleri fiziksel etmenler, organik ve inorganik maddeler oluşturur. Ekosistemler ilk bakışta karmaşık birer sistem olarak gözüksede işlevselliklerine bakıldığında bir kaç maddede toparlanacak kadar basit organizasyonlardır.

- (i) Besin zinciri boyunca enerji akışı
- (ii) Besin maddesi döngüsü (biyojeokimyasal döngüler)
- (iii) Ekolojik devamlılık veya ekosistem gelişimi
- (iv) Homeostazi veya geri bildirim kontrol mekanizmaları (Haber 1994; de Jonge 2007; Barış 2009; Anand *et al.* 2010; Claustre *et al.* 2010; Stremke and Koh 2010) (Şekil 2.1 ve 2.2).



Şekil 2.1. Ekosistemin biyotik ve abiyotik öğeleri ve etkileşimleri



Şekil 2.2. Ekosistemin biyotik ve abiyotik öğeleri ve etkileşimlerin diyagramı

2.3. Ekosistemler

Ekosistemleri genel olarak Doğal Ekosistemler ve Yapay Ekosistemler olarak iki gruba ayırabiliriz.

Doğal ekosistemler içerisinde; aşağıdan yukarıya doğru çıkıldıkça canlı sayısının azaldığı ve ekstremleştiği Dağ Ekosistemleri, oksijen oranının düşük oluşu, hidrostatik basıncın yüksekliği ve derinlere inildikçe besin maddelerinin azaldığı Deniz Ekosistemleri, güneş ışınlarını görmeyen neredeyse mümkün olmadığı yoğun bitki popülasyonları içeren Orman Ekosistemleri, organik besin elementlerinin hemen hemen hiç olmadığı Çöl Ekosistemleri, canlı popülasyonun çok az olduğu ve özel bir kaç canlı türünün yaşayabildiği Mağara Ekosistemleri, çok ekstrem bir kaç türün yaşamayı

başarabildiği Buzul Ekosistemleri, canlı ve tür sayısının belkide en fazla olduğu Nehir ve Akarsu Ekosistemleri, içerdikleri elementlerin çeşitliliği ve oluşum şekillerinin özelliği açısından Göl Ekosistemlerini saymak mümkündür.

Yapay Ekosistemler olarakta: Tarımsal alanlar, Su ürünleri yetiştirme havuzları, Kentsel Ekosistemler ve Endüstriyel ekosistemler sayılabilir (Barış 2009; Yvon-Durocher *et al.* 2012).

2.4. Canlı-Çevre İlişkileri ve Biyolojik Çeşitlilik

Canlı türlerini, yapılarını, yaşadıkları çevreyi ve bu çevre ile ilişkilerini araştırmak biyologların en önemli konularındandır. Bir canlının yaşam alanı hem çeşitlilik hemde gerek morfolojik gerekse de moleküler yapı üzerine önemli etkileri vardır. Canlıların yaşam alanları ise biyosfer olarak tanımlanmaktadır (Barış 2009).

Günümüzde biyosferin özellikle farklı bölgeleri (jeotermal menfezler, jeomikrobiyal göller, mağaralar, buzullar, kaplıcalar, derin denizler, tuz gölleri vb.) ile ilgili çok sayıda mikrobiyolojik çalışma yapılmaktadır (Tortora *et al.* 2004; Satyanarayana *et al.* 2005; Adıgüzel 2006; Madigan and Martinko 2006; Barış 2009).

Ortam koşullarının olağandışı olduğu bu bölgelerde çalışmaların yoğunlaşmasının sebepleri ise;

- a) Ortam koşullarının sıra dışı olması, bu ortamlarda yaşayan mikroorganizmaları da, bu ortamlara uygun önemli adaptasyon özelliklerine sahip olması
- b) Bu ortamların henüz yeterince araştırılmamış ve bunun sonucu olarak, biyolojik çeşitliliği hakkında yeterince bilginin bulunmaması
- c) İzole edilen mikroorganizmaların metabolizmalarındaki farklılık
- d) İzole edilen mikroorganizmaların, enzimlerinin ve/veya metabolik ürünlerinin endüstriyel, tıbbi ve/veya zirai amaçla kullanımlarının bulunması gibi sebepler sıralanabilir (Satyanarayana *et al.* 2005).

Mikroorganizmalar içerisinde en iyi adaptasyon yeteneğine sahip olan grup ise bakterilerdir. Biyosferin her yerinden bakterileri izole etmek mümkündür (Ward 2002). Hatta yer üstü, yer altı ve deniz dipleri gibi ortamlardan başka dış dünya kaynaklı (göktaşlarından) olduğu düşünülen bakteriler izole edilebilmiştir (Çiftçioğlu *et al.* 1999).

2.5. Bir Ekosistem Olarak Göller

Türkiye, kapladıkları alanlar göz önüne alındığında, doğal gölleri açısından çok zengin bir ülke sayılabılır. Yapılan ölçümler çeşitli kaynaklara farklı yansımış olmakla birlikte, en iyimser tahminler bile, bataklıklarla birlikte göllerimizin yüzölçümünün 10.000 km²'yi ancak bulabildiğini göstermektedir. Diğer bir deyişle, Türkiye yüzölçümünün %1,2 si göllerle kaplıdır (İzırak 1962, 1984; İnandık 1965; Akkan ve Tuncel 1990).

2.6. Oluşumlarına Göre Göller

Oluşumlarına göre gölleri 3 ana başlık altında toplamak mümkündür.

- a) Yerli Kaya Gölleri (Tektonik, Krater, Buzul ve Karstik)
- b) Doğal Set Gölleri (Lav, Heyelan, Alüvyon ve Lagün)
- c) Yapay Set Gölleri (Baraj Gölleri)

Tektonik kökenli: (Beyşehir, Eğirdir, Burdur, Manyas, Ulubat, İznik...)

Jips dolini gölleri: (Polat Gölü, Erzincan, İliç)

Volkanik göller: (Nemrut, Meke Tuzlası Gölleri, Isparta Gölçüğü, Acıgöl...)

Buzul gölleri: (Buzuldağ, Uludağ, Munzur, Esence, Kaçkar, Bolkar Dağları üzerindeki göller)

Set gölleri: Heyelan setleri (Tortum, Sera gölleri), birikinti konisi setleri (Eymir ve Moğan Gölleri), akarsu setleri (Marmara Gölü, Meriç, Sakarya vadi tabanlarındaki göller), delta gölleri (Kızılırmak, Seyhan-Ceyhan, Yeşilırmak delta ağzlarındaki

göller), kıyı kordonları (Büyük ve Küçük Çekmece, Terkos gölleri), lav setleri (Van, Erçek, Balık, Haçlı, Nazik gölleri) (İzbırak 1962; İnandık 1964; Gastescu 2009; Bertoni 2011; Hakanson 2012; Mitra *et al.* 2014).

Tüm göl sınıflandırmalarına bakıldığında en fazla araştırma set gölleri üzerine yapılmıştır. Hemen hemen bütün araştırmacılar göl çanaklarının oluşumunu sağlayan doğal setlerden bahsederken “lav”, “alüvyal”, “heyelan”, “moren”, “lav-tüf”, “organik”, “kıyı” hatta doğrudan buzulların oluşturduğu setlerden söz etmektedir.

2.7. Otlukbeli Gölü

Erzincan ilinin Otlukbeli (Karakulak) ilçe merkezinin 6 km kadar kuzeybatısında bulunan “ Otlukbeli Gölü”nün oluşumu da bir doğal setleşme sonucudur (Şekil 2). Uzunluğu 150-160 m. genişliği 30-50 m. arasında değişen, yüzölçümü 6500 m² dolaylarında küçük bir göldür. Azami derinliği 15-18 m. dolayındadır (Hoşgören 1994). Göl suyu içerisine güney tarafından maden suları karışıyor olmasına rağmen kuzey tarafından dere suyu ile beslendiğinden tatlı olarak tesbit edilmiştir. Gölü besleyen bu derenin bolca materyal getirdiği ve gölün gittikçe daraldığı gözlemlenmiştir. Gölün literatürde bir ismi yoktur. Bu isim konumu dolayısıyla verilmiştir (Akkan ve Tuncel, 1990). Otlukbeli Gölü, özgünlüğü dolayısıyla 15. 04. 1994 gün ve 612 Sayılı Erzurum Kültür ve Tabiat Varlıklarını Koruma Kurulu kararı ile doğal sit alanı ilan edilerek koruma altına alınmıştır (Akpınar 2016) (Şekil 2.4 – 2.8).



Şekil 2.3. Otlukbeli gölünün konum haritası



Şekil 2.4. Gölün doğu istikametinden görünümü



Şekil 2.5. Gölün güneydoğu istikametinden görünümü ve göle karışan maden suları



Şekil 2.6. Gölün güney istikametindeki kalkerli yapılar ve demir – kükürt içerikli yapının görünümü



Şekil 2.7. Gölün güney istikametine akan sular.



Şekil 2.8. Gölün güney kısmına akan sular. Aynı morfolojik yapı gölün alt kısımlarında da devam etmektedir.



Şekil 2.9. Göl ve çevresindeki kalkerli yapılar

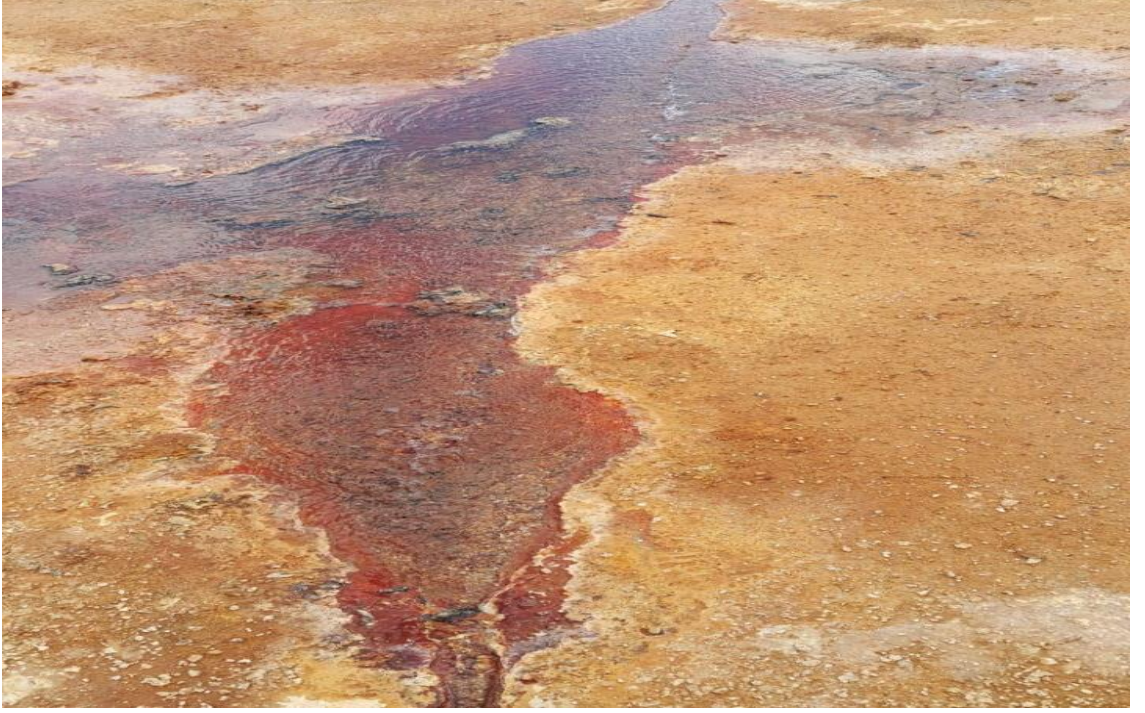


Şekil 2.10. Kalkerli yapılardan ilginç bir görüntü

2.8. Göl Çevresinin Yapısı ve Jeomorfolojik Özellikleri

Otlukbeli Gölü'nün yakın çevresinde yapıyı ofiolit kayaç serisi oluşturur. Genellikle “Erzincan Napı” adı altında toplanan ve çoğunlukla yılan taşı, yeşil silisli kil taşı ve volkanik atık görüntülü yapıdan oluşan bu kayaç serisi Esence (Keşiş) Dağlarının da temel yapısını oluşturur ve buradan Otlukbeli yöresine kadar geniş bir yayılım gösterir (Yılmaz 1985) (Şekil 2.9 – 2.10).

Göl çevresi yapısal olarak incelendiğinde gerek jeolojik yapılara ve gereksede belirgin bir şekilde yer şekilleriyle uyumsuz (kuraklığa bağlı vb.) çatlaklar gözlemlenmektedir. Bu çatlakların bir kısmından basınçlı gaz çıkışı ve bu gaz çıkışıyla birlikte madeni bir koku ve tada sahip su çıkışlarını gözlemlenmiştir (Şekil 2.11). Bu çatlaklar birçok jeoloji literatüründe belirtildiği gibi aktif fayların göstergesidir ve bunun en belirgin kanıtı ise yine Otlukbeli Komları olarak isimlendirilen yörede bulunan yaygın maden suları ve bunların oluşturduğu travertenlerdir. Konum olarak Otlukbeli Gölü, denizden yüksekliği 1855 metrelerde bir vadinin içerisine yerleşmiş bulunmaktadır. Doğusu yöre halkı tarafından Sazlar Deresi olarak isimlendirilmektedir. Gölün kuzey yamaçları karşı cephesine oranla belirgin bir şekilde daha diktir. Bu dik yamaçların üst kısımlarında traverten oluşumuna (Şekil 2.12) sebep olan su kaynakları bulunmaktadır. Saha araştırmaları sırasında gözlemlediğimiz bu su kaynaklarından birinin maden suyu karakterinde ve drenaj kısımlarında yosunlaşmanın fazla olduğu, diğer suyun drenaj kısımlarında ise daha az yosunlaşma olduğu ve maden suyu karakterinde olan suyun hayvanlar tarafından içilmediği gözlemlenmiştir (Şekil 2.13-2.14). Yine gölün aşağı kısımlarında, göl sularının döküldüğü bölgelerde oluşan düdenlerde daha çok mağaralara özgü olan CaCO_3 sarkıtları dikkat çekici bulunmuştur (Şekil 2.16).



Şekil 2.11. Göl çevresindeki çatlaklar ve bu çatlaklardan çıkan gaz ve maden suları



Şekil 2.12. Göl çevresindeki traverten oluşumları



Şekil 2.13. Traverten oluşumuna sebep olan su kaynakları



Şekil 2.14. Traverten oluşumuna sebep olan su kaynakları



Şekil 2.15. Göl çevresinde gözlenen biyofilm tabakası



Şekil 2.16. Gölün alt kısımlarında bir miktar suyun döküldüğü düden içinde oluşan CaCO_3 sarkıtları

Örnekleme yapılan göl çevresi dikkatle incelendiğinde jeolojik farklılıklar dikkat çekicidir. Özellikle kalsifiye alanlar ve kırmızı bölgeler mikrobiyal çeşitlilik açısından önem taşımaktadır. Bu bölgelerde mineral oluşumuna katılan ve demir-kükürt döngüleri için önemli olabilecek bakteriler olduğu düşünülmektedir. Kırmızı kitlelerin oluştuğu kısımların daha alt kısımlarında mukoid biyofilm oluşumu önemlidir (Şekil 2.15).

2.9. Bakteriler ve Bakterilerin Biyojeokimyasal Döngüler Açısından Önemi

Genel olarak bakıldığında farkedilmese de bilimsel olarak ele alındığında en gelişmiş canlıdan en ilkel canlıya kadar tüm canlılar arasında hatta canlı ile cansız varlıklar arasında sürekli bir etkileşim ve iletişim vardır. Dolayısıyla mikrobiyoloji ve jeoloji arasında bir bağ kurmak çok ta zor değildir. Wolf and Bachofen (1991), Kasting (1993) ve Kasting and Siefert (2002), bakterilerin en üst litosfer ve hidrosfer de dâhil olmak üzere, yeryüzünün evriminde önemli rollerinin olduğunu araştıran bilim adamları arasındadırlar. Yaptıkları araştırmalar neticesinde şimdiki atmosferin oluşumunda bakterilerin rolü daha iyi anlaşılabilir. Bu bilim adamlarının yapmış oldukları araştırmalar neticesinde:

- 1) Mikroorganizmaların jeolojik materyallerden elementlerin salınımını veya oluşumunu hızlandırabildiği
- 2) Biyokütle üretimi için gerekli besinleri elde etmek için doğrudan ya da dolaylı olarak pH'ı azaltan metabolitlerin atılımı, kompleks katyonların veya çözeltilerinin yıkanması ve mineral doygunluk durumlarının değiştirebildikleri ortaya çıkarılmıştır (Barker *et al.* 1998; Gambari 2011).

2.9.1. Bakteriler ve bakteri sistematigi

Bakteriler ve bakteri sistematiginden bahsetmeden önce karakterizasyon, sistematik ve taksonomi gibi terminolojik olgulardan bahsetmek yerinde olacaktır. Karakterizasyon, saf bir prokaryotik kültürün tüm özelliklerinin tanımlama amacıyla elde edilmesidir. Yapılan bu tanımlamanın ise iyi karakterize edilmiş ve kabul görmüş bir türe dâhil

edilebilmesidir. Bir izolatu tanılamak için gerekli veri miktarı karakterizasyon için gerekli olandan daha azdır. Bu sebeple tanılama için, bir organizmayı diğerlerinden kesin olarak ayırabilecek karakteristikler seçilir (Dworkin *et al.* 2006).

Canlıların sınıflandırılması sistematik veya taksonomi olarak adlandırılır. Bu iki kelime pratikte birbirinin yerine kullanılmasına rağmen taksonomi daha genel bir ifadedir. Taksonomi, sınıflandırmanın teorik yapısını ve esaslarını ortaya koymakta iken sistematik, türlerin belli sistemlerdeki yerlerine yerleştirilmesini ifade eder. Sistematik, taksonomi ile birlikte ekoloji, biyokimya, genetik, moleküler biyoloji ve mikroskopik kabulleri ihtiva eder (Dworkin *et al.* 2006).

Günümüzde tespit edilen canlıların rRNA sentezi ile ilgili DNA bölgelerinin (rDNA) baz dizileri karşılaştırıldığında, canlıların üç büyük domain altında sınıflandırılacakları tespit edilmiştir. Bunlar; gerçek bakteriler (öbakteriler, *Bacteria*), antik bakteriler (arkealar, *Archea*) ve ökaryotlar (Eukaryotes) olarak isimlendirilmektedir (Woese *et al.* 1990; Skirisdottir 2000; Mora and Amann 2001; Hugenholtz 2002; Barış 2009).

Bu üç temel domain'in oluşturduğu organizma havuzundan zooloji ve botanik'in klasik teknikleri ile çalışılabilen organizmalar çıkarılınca geriye mikrobiyologların çalışma alanlarını oluşturan organizmalar kalır. Bunlar genellikle özel ekipmanlarla (mikroskoplar) görülebilen küçük organizmaları içermektedir (Amann *et al.* 1995).

Bitki ve hayvanlarla mukayese edildiğinde, mikroorganizmaların morfolojileri sağlam bir sınıflandırmaya temel oluşturmak ve güvenilir tanılama için oldukça yetersizdir. Bu nedenle bakterilerin tanınması için, mikroskopik morfolojileri, koloni morfolojileri, endospor oluşturup-oluşturmadıkları, hareketli olup-olmadıkları, Gram reaksiyonları (hücre duvar yapıları), ısı, O₂, ışık ve pH istekleri, karbon kaynağı olarak kullanabildiği moleküller, hücrenin biyokimyasal yapısı ve nükleik asitlere dayalı birden fazla tespitle bulunmak gerekmektedir (Schlegel 1985; Amann *et al.* 1995; Mora and Amann 2001).

Bu özelliklerin belirlenebilmesi için bakterinin kültüre alınabilmesi gerekmektedir. Bazı mikroorganizmaları kültüre almak mümkün olmamaktadır. Bu mikroorganizmaları kültüre almadan kendi doğal ortamlarında tanılamaya olanak sağlayan teknikler (in situ hibridizasyon problemleri) geliştirilmiş ve kullanılmaktadır (Amann *et al.* 1995).

Bu tespitlerden nükleik asitlere (DNA ve RNA) dayalı yöntemler genotipik yöntemleri, diğerleri ise fenotipik yöntemleri oluşturmaktadır. Bakterilerin tanı amaçlı karakterizasyonu için, fenotipik ve genotipik karakterlerin her ikisine ait veriler de kullanılmaktadır. Genotipik ve fenotipik verilerin birbirlerini desteklediği sonuçlar ideal verilerin alındığını göstermektedir. İlk olarak fenotipik gözlemler daha sonra bu verilerden faydalanılarak moleküler incelemeler yapılmaktadır. Bunlar; mikroskopik özellikler (hücre şekli, büyüklüğü, hareketliliği, flagel oluşturup oluşturmadığı, spor oluşturup oluşturmadığı, hücresel inklüzyonlar, renk, koloni morfolojisi, Gram boyanma özelliği), hücre bileşenlerinin kimyasal kompozisyonu (DNA, membran bileşimi, yağ asitleri, eter yağları, alifatik hidrokarbonlar, izoprenoid kuinonlar, sitokromlar, hücre duvarı yapıları ve bileşimi, bakteri antijenleri, lipopolisakkaritler, mikolik asitler, peptidoglikan, elektroforetik protein analizleri, poliaminler), metabolizma ile ilgili özellikler (temel enerji metabolizması, besinsel ve metabolik karakterler, özel besinsel gereksinimler, enzimler, ekolojik parametreler) ve nükleik asit problemleri ile belirlenen karakterler (spesifik nükleik asit problemlerinin sentezi veya izolasyonu, hedef nükleik asit ekstraksiyonu, spesifik nükleik asit problemlerinin çoğaltılması ve gözlemlenmesi, hedef nükleik asitin nükleik asit probu ile hibridizasyonu ve hibridlerin tespiti) veriler olarak sıralanabilmektedir (Woese *et al.* 1990; Vandamme *et al.* 1996; Skirnisdottir 2000; Mora and Amann 2001; Hugenholtz 2002; Logan *et al.* 2002; Martin 2002; Bohannan and Hughes 2003; Chelius and Moore 2004; Coenye *et al.* 2005; Dworkin *et al.* 2006; Singh *et al.* 2006; Barış 2009).

2.9.2. Tanı ve karakterizasyon için kullanılan yöntemler

Tanı ve karakterizasyon için kullanılan yöntemler konvensiyonel ve moleküler yöntemler olarak da sınıflandırılabilir (Adıgüzel 2006).

Moleküler yöntemler, mikroorganizmaları meydana getiren makromoleküllerin içeriklerine, çeşitliliklerine ve oranlarına bağlı olarak elde edilen farklılıkları esas alarak geliştirilmiştir. Moleküler yöntemler karbonhidratları, lipidleri, proteinleri ve genetik materyalleri (DNA ve RNA) çalışma materyali olarak kabul etmekte ve bunlardan birinin veya kombinasyonlarının kullanımıyla mikroorganizmaların tanı ve karakterizasyonu gerçekleştirilmektedir. Özellikle ribozomal operonların (*rrn*) dizi analizleri organizmalar arasındaki filogenetik ilişkiyi belirlemede tercih edilen bir yöntem olmaktadır. Ribozomal operonlar 3 gen içermektedirler. Bunlardan ilki 16S rRNA'yı şifreleyen *rrs* geni, diğeri ribozomun 23S rRNA'yı şifreleyen *rrl* geni, üçüncüsü ise 5S rRNA'yı şifreleyen genidir. Bu üç bölgeden özellikle 16S rRNA bölgesi üzerinde daha yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Lane *et al.* 1985; Vandamme *et al.* 1996; Woese 2000; Mora and Amann 2001; Dworkin *et al.* 2006; Barış 2009).

Serolojik teknikler (Radioimmunoassay, Immunoblot, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Dot Immunobinding Assay, Agglutination ve Immunofluorescence), nükleik asit temelli analiz teknikleri (Randomly Amplified Polimorphic DNA= RAPD, Repetitive Extragenic Palindromic= rep-PCR, Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus= Eric-PCR, Box-PCR, Spesifik PCR, Restriction Fragment Length Polymorphism= RFLP, PCR-RFLP, Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis= ARDRA ve Denaturing Gradient Gel Electrophoresis= DGGE), metabolik enzim ürünlerinin belirlenmesi (Biolog), yağ asit analizleri (Mikrobial Identification System=MIS) gibi moleküler yöntemler son yıllarda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Bunlardan MIS ve BIOLOG tamamen bilgisayar kontrolünde olup, rutin testlerin yapıldığı laboratuarlarda mikroorganizmanın tanı ve karakterizasyonunda kullanılmaktadır. (Vanechoutte *et al.* 1992; Muyzer and Smalla 1998; Adıgüzel 2006; Qiu *et al.* 2008; Rusznyak *et al.* 2008).

Mikroorganizmaların tanılanması ve sınıflandırılması amacıyla uygulanmakta olan farklı birçok fenotipik ve genotipik metodun her biri sırasıyla cinsten, türe, alt türe, ırka kadar belirli oranlarda filogenetik sınıflandırma yapmaya imkân sağlamaktadır. Bununla beraber her yöntem uygulamadaki kolaylık, uygulanabilirlik, ekipman ihtiyacı ve çözülebilirlik seviyesine bağlı olarak, bazı avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Genellikle

DNA temelli metotlar, mikroorganizmaların tanılanması ve sınıflandırılmalarında evrensel olarak uygulanabilen, oldukça güvenilir metotlar olup cins ve tür seviyesindeki ayrımlar, DNA-DNA hibridizasyon yöntemlerine ve artan oranda da 16S rRNA baz dizilimine bağlı modern filogeniye dayanmaktadır (Vandamme *et al.* 1996; Rademaker *et al.* 1997; Daffonchio *et al.* 1998; Mora and Amann 2001). Moleküler teknikler, mikrobiyal ekolojide, bakterilerin, tanılanması, karakterizasyonu ve sınıflandırılmasında büyük öneme sahiptir (Schloter *et al.* 2000; Singh *et al.* 2006).

Moleküler biyolojide ve özellikle de polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction= PCR) teknolojisindeki gelişmeler, mikroorganizmaların genomik analizlerine bağlı olarak belirlenen bir popülasyondaki genetik çeşitliliğin saptanmasında, izolatların sınıflandırılması ve karakterizasyonunda büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Özellikle 16S-23S rDNA-PCR, ITS-PCR (Internaly Transcribed Spacer), ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), T-RFLPs (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism), tRNA PCR (transfer RNA), DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) gibi PCR temelli parmak izi yöntemlerinin geliştirilmesi ve spesifik primerlerin kullanılmasıyla bakterilerin tanı ve teşhisinde büyük ilerlemeler kaydedilmiştir (Vaneechoutte *et al.* 1992; Campbell *et al.* 1997; Muyzer and Smalla 1998; Şahin vd 2000; Qiu *et al.* 2008; Rusznyak *et al.* 2008).

Son zamanlarda, 16S-23S rDNA genini kodlayan “internal transcrib spacer” gen bölgelerini hedef alarak, bakteriyel tanı, tarama uygulamaları ve bir tür içerisindeki izolatların ayırımına yönelik çalışmalarda büyük gelişmeler kaydedilmiştir. Tek bir mikroorganizma grubunun teşhisi ve tanısında yüksek hassaslık ve özgüllüğe sahip olan tekniklerin yerini, ribozomal genlere bağlı tanı yöntemleri almaktadır. 16S ve/veya 23S rDNA bölgelerinin nükleotid dizilerinin belirlenmesiyle, bakterilerin filogenetik sınıflandırılması gerçekleştirilmiştir (Ginard *et al.* 1997; Maiddak *et al.* 1997, 2001; Muyzer and Smalla 1998; Woese 2000, 2004; Mora and Amann 2001; Martin 2002; Harris and Hartley 2003; Adıgüzel 2006; Dworkin *et al.* 2006; Qiu *et al.* 2008; Rusznyak *et al.* 2008).

DNA sekanslama veya dizilimi terimi, bir DNA molekülünde bulunan nükleotid bazlarının yani adenin, guanin, sitozin ve timinin sırasını belirlemek amacıyla yapılan sıralama yöntemleri anlamına gelmektedir. DNA dizileme bilgisi bugün temel biyolojik çalışmalar için yaygın olarak kullanılmakla birlikte DNA sekanslama tekniklerinden yararlanan diğer birçok araştırma dalları ve uygulama konuları için de vazgeçilmezdir. Bu alanlardan bazılarını bir kaç ana başlıkta toplayacak olursak: DNA da meydana gelen kırılma, delesyon ve modifikasyon gibi hataların tespiti, biyoteknoloji, arkeoloji, antropoloji, genetik, moleküler biyoloji, adli biyoloji, kriminalistik, enfeksiyon kontrolleri, filogenetik çalışmalar ve biyolojik sistematik olarak saymak mümkündür (Reinert and Huson 2007; Mellmann *et al.* 2017).

1953 yılında DNA çift sarmalının keşfinden yaklaşık 15 yıl sonra DNA sekanslama tekniği ile tanışılmıştır. Bu gecikmeye rağmen bilim insanları kıtalar arası çalışmalarla birçok hayvan, bitki ve mikrobiyal canlının genomunun sekanslamasını başarmış ve bu başarı İnsan Genom Projesinin ortaya çıkmasını sağlamıştır. 1970 yılında Hamilton Smith ve arkadaşlarının yapmış oldukları enzim keşfi bu sürecin hızlanmasına çok büyük bir katkı sağlamıştır (Reinert and Huson 2007).

DNA sekanslama için 1970 yılında Sanger ve Coulson tarafından geliştirilen ve jel üzerinde elektron yüklerine göre ayırmaya dayandırılan yöntem zaman içerisinde geliştirilerek bugün daha modern, daha kolay, daha doğru sonuç verebilir ve daha hızlı bir hal alarak kullanılmaya devam etmektedir. Bu gelişmelerin ışığında bir bütün olarak bir bakterinin genomunun dizisi Fleischmann ve arkadaşları tarafından 1995'te yayınlanmıştır. Sonraki yıllarda ise ulaşılabilir genom dizileri sayısı hızla artmıştır. Günümüzde, tek nükleotid polimorfizmlerine (SNP'ler) veya allelik değişikliklere (çekirdek genom multilokoz sekansı yazımı [cgMLST]) dayanan iki farklı yaklaşım, genotipik ilişkiyi göstermek için tam genom sekanslama bilgisini çıkartmak için kullanılmaktadır (Eisen 2000; Coenye and Vandamme 2003; Mellmann *et al.* 2017).

Günümüzde birçok bakteri suşu moleküler özelliklerine bakılarak sınıflandırılmaktadır. Bu nedenledir ki moleküler biyoloji bilimi bakteriyoloji biliminin ayrılmaz bir parçası

olmuştur. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) gibi tekniklerin gelişmesi ve yaygınlaşmasıyla bakterilerin ve alt türlerinin tanımlanması ve sınıflandırılması daha kolay bir hal almıştır (Dashti *et al.* 2009).

DNA ekstraksiyonu ve saflaştırılmasıyla başlayan DNA sekanslama bugün hızlı bir şekilde gelişen ve sık olarak kullanılan bilgisayar bilimi alanı olan Biyoinformatik'e aktarımla sonlanır. Biyoinformatik DNA ve protein dizilerinin toplanması, organizasyonu ve analizi ile ilgilenir. Çok sayıda canlının DNA ve protein dizilimini barındıran bu data sistemlerinden yoğun bir şekilde faydalanılmaktadır (Kumar and Duraipandian 2012).

Günümüzde, DNA ve protein dizilerini incelemek için kullanılan en yaygın araçlardan biri de Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)'dur (Altschul *et al.* 1990). BLAST, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) web sitesinde ve buna benzer birçok internet sitesinde kullanılan bir bilgisayar sistemidir. BLAST, mevcut bir sekans veri tabanı ile sorgulanacak bir DNA sekansını hızla hizalayabilir ve karşılaştırabilir. Bu da sürdürülmekte olan genomik araştırmalarda onu vazgeçilmez bir araç haline getirir. Son yıllarda, büyük ölçekli dizileme projelerinin ve BLAST gibi biyoinformatik araçların paralel gelişimi, bilim adamlarının birçok türün genetik organizasyonunun incelemelerini sağlamıştır (Lobo 2008).

BLAST olarak adlandırılan bu teknolojinin amacı belirli bir dizinin başka bir diziye benzer olup olmadığını belirlemektir. Bu işlem yeni diziyi bir veritabanında hâlihazırda rapor edilmiş ve depolanmış olan sekanslar ile karşılaştırmak esasına dayanır. Bu süreç esas olarak veri tabanındaki benzer sekansı ortaya çıkarmak için hizalama prosedürlerini kullanan bir işlemdir. Hizalama ile aynı veya yakın benzerliği olan ve az benzerliğe sahip olan bölgeler belirlenir. Bir anlamda, bu hizalamalar, bir veri tabanının yeni türetilen diziye potansiyel bir homolog diziyi içerip içermediğini belirlemek için kullanılır. Bu amaçla iki hizalama türü kullanılır. Bunlar global ve yerel hizalamadır. Global bir başka deyişle küresel yaklaşım, bir bütün diziyi diğer tüm dizilerle

karşılaştırır. Yerel yöntem ise bir dizinin bir alt kümesini kullanır ve onu diğer dizilerin alt kümesine hizalamaya çalışır. Küresel bir hizalamanın çıktısı iki dizinin karşılaştırmasıdır. Lokal hizalamalar, çok benzer olan bölgeleri ortaya çıkarır, ancak iki dizinin tamamında bir mukayese sağlamaz. Global yaklaşım, küçük bir dizi diziyi karşılaştırırken faydalıdır, ancak karşılaştırmadaki dizinin sayısı arttıkça hesaplama açısından pahalı hale gelir. Yerel hizalamalar, çok büyük veritabanlarını başarıyla araştırmak için daha uygun olan sezgisel programlama yöntemlerini kullanır, ancak bunlar en uygun çözümü vermezler. Bu sınırlama söz konusu olsa bile, lokal hizalamalar genomik alanlar için çok önemlidir, çünkü birbirinden farklı iki dizi arasındaki iniş ile ilgili olan homoloji bölgelerini ortaya çıkarabilirler (Altschul *et al.* 1990; Lobo 2008).

Sınıflandırma kuramları içerisinde söz edilen taksonomi, genellikle sistematik veya biyosistematikğin eş anlamlısı olarak kullanılır. Üç temel basamak taksonomiye ortaya çıkarır.

- 1) Sınıflandırma, organizmaların benzerliklerine göre düzenlenmesi,
- 2) İsimlendirme, düzenlenen organizmanın etiketlenmesi,
- 3) Bilinmeyen organizmanın, tanımlanan ve etiketlenen organizmalardan herhangi birine ait olup olmadığının belirlenmesi.

Modern sistematik ise bunlara ek olarak filogenetik ve populasyon genetiğinden yararlanır. Son yıllarda bakteri sınıflandırmada 16S veya 23S rRNA dizisinde kodlanan filogenetik ilişkiler bakteriler arasındaki benzerlik veya farklılıklar açısından genel kabul görmüştür (Vandamme *et al.* 1996; Uilenberg and Goff 2006; Mares 2015).

Genel olarak bir bakteriye ait tüm genotipik, fenotipik ve filogenetik bilgiler polifazik taksonomide değerlendirilebilir. Bilindiği gibi genotipik bilgi hücredeki nükleik asitlerden (DNA ve RNA), fenotipik bilgi protein ve proteinlerin fonksiyonlarından elde edilir. Guanin sitozin veya DNA – DNA hibridizasyon çalışmaları gibi klasik yöntemler hemen hemen tüm bakteri taksonomi analizlerinde kullanılırken Amino asit dizilemesi

gibi özel yöntemler sınırlı sayıda takson üzerine uygulanmıştır. Çünkü bu tür yöntemler hem zahmetli ve zaman alıcı hem de teknik olarak zorlayıcıdır. Konuyu biraz daha açmak gerekirse genotipik yöntemler, DNA ve RNA moleküllerine yöneliktir. Teknolojik ilerlemenin bir sonucu olarak taksonomik çalışmalarda ilerlemiş bir metoddur. DNA baz oranının belirlenmesi, DNA – DNA hibridizasyon çalışmaları, rRNA homoloji çalışmaları ve DNA tabanlı yazılım yöntemleri genotipik yöntemler içerisinde. Fenotipik yöntemler protein protein fonksiyonları ile birlikte kemotaksonomik teknikleri de içerir. Genel anlamda “Kemotaksonomi” bakterileri sınıflandırmak için hücrenin çeşitli kimyasal bileşenleri hakkında analitik yöntemlerle bilgi toplamayı ifade eder. Tür teşhislerinde genellikle klasik veya geleneksel fenotipik analizler kullanılmaktadır. Bu yöntemler alt tür ve türlerden cins ve familyaya kadar olan taksonların tanımlanmasında temel oluştururlar. Makro organizmalarda fenotipik veriler çok fazla sorun teşkil etmezken bakterilerde fenotipik veriler tür ayrıştırması açısından sıklıkla sorun oluşturur. Fenotipik yöntemlerde 1950’lerde ortaya çıkan bilgisayar destekli sayısal analizler, hücresel verilerin yazılarak suşların belirlendiği yazma yöntemleri, Gram pozitif ve negatif boyanmalarına göre hücre duvarı özellikleri, hücre duvarı ve çeşitli yapılarında bulunan lipidlerin yağ asidi özellikleri, elektron taşımada önem arzeden isoproneoid kinonlar, protein desen özelliklerine bakılarak değerlendirilen hücre protein analizleri, bakteriyal metabolizmada rol oynayan poliamin analizleri ve çeşitli spektrofotometrik ve UV yöntemleri fenotipik yöntemlerin geleneksel veya klasik analizlerindendir (Vandamme *et al.* 1996).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

Bu çalışmada, Erzincan ili Otlukbeli (Karakulak) ilçe merkezinin “Otlukbeli Komları” yöresinde bulunan Otlukbeli gölünden örnekler alınmıştır. (40° 01’ 01’ N, 39° 58’ 52’ E) Bakteri izolasyonu için gereken genel ve özel besiyerleri, izole edilen bakterileri tanı ve karakterizasyonu işlemlerinde kimyasallar, sarf malzemesi ve kitler kullanılmıştır. Ayrıca moleküler denemelerde çalışmaya özel primerler ve enzim preparatları kullanılmıştır.

3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar

Çalışma esnasında kullanılan alet ve cihazlar:

İnkübatör (Binder BD53, GERMANY)
 Otoklav (HMC Hirayama Hiclava HV-50L, JAPAN)
 Mikroskop (Boeco BM 180, GERMANY)
 Steril Kabin (Esco AHC-4D1, SINGAPORE)
 Çalkalayıcı (JSR JSSI 300C, KOREA)
 Magnetik Karıştırıcı (Heidolph M10, GERMANY)
 pH Metre (Mettler Toledo Seven Compact S210, CHINA)
 Derin Dondurucu (Nuaire -86 Ultralow Freezer, NU9483, MEXICO)
 Hassas Terazî (Shimadzu ATX224, JAPAN)
 Buzdolabı (Arçelik 5223-NHEY, TÜRKİYE)
 Saf Su Cihazı (Millipore Direct Q System Overview FRANCE)
 Vorteks (Heidolph Reax Top, GERMANY)
 Dikey Tüp Karıştırıcı (GFL 3025, GERMANY)
 Santrifüj (Hettich Mikro 22R, GERMANY)
 Etüv (Mettmert IPP 55, GERMANY)

PCR (Corbett Research CG1-96, AUSTRALIA)

Jel Görüntüleme Sistemi (DNR BioImaging Systems MiniBis Pro, ISRAEL)

3.1.2. Çalışmada kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı

Çalışma süresince kullanılan besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanma şekilleri aşağıda verilmiştir:

% 0,85'lik NaCl çözeltisi: 8,5 g NaCl 1 L saf suda çözüldü. Çözelti otoklavda steril edildi.

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

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

Gliserollü Nutrient agar (GNA): 28 g nutrient agar karışımı (Oxoid) üzerine 34 ml % 87'lik gliserin ilave edildi ve son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı. Besiyeri otoklavda steril edildi. 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakıldı (Arda 2000).

Trypticase soy broth (TSB): 30 g trypticase soy agar karışımı (Oxoid) 1 L saf su içerisine ilave edildi. Besiyeri otoklavda steril edildi (Barış 2009).

Trypticase soy agar (TSA): 40 g trypticase soy agar karışımı (Oxoid) 1 L saf su içerisine ilave edildi. Besiyeri otoklavda steril edildi. 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakıldı (Barış 2009).

B-4 Besiyeri (250 mL): Kalsiyum asetat 0,625 g, maya ekstraktı 1 g, glukoz 2,5 g, agar 3,75 g, 250 mL saf su içinde çözülüp pH = 7'ye ayarlanarak, otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır (Boquet *et al.* 1973; Barış 2009).

CaCO₃ besiyeri (500 mL): Maya eksrakı 5 g, Glukoz 5 g, CaCO₃ (Kalsiyum Karbonat) 6 g, Agar 9 g, 500 mL saf su içerisinde çözülüp otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır (Orhan 2017).

NFM Besiyeri (500 mL): Sukroz 10 g, FeSO₄-7H₂O (Demir Sülfat Heptahidrat) 0,005 g, MgSO₄-7H₂O (Magnezyum Sülfat Heptahidrat) 0,25 g, CaCl₂ (Kalsiyum Klorür) 0,05 g, NaCl₂ (Sodyum Klorür) 0,1 g, NaMoO₄ (Sodyum Molibdat) 0,0025 g, KH₂PO₄ (Potasyum Hidrojen Fosfat Monobasik) 0,25 g, Agar 9 g 500 mL saf su içerisinde çözülüp otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır (Okon *et al.* 1977; Mehnaz *et al.* 2007; Rafique *et al.* 2015).

Pikovskaya Besiyeri: Glukoz 10 g, Ca₃(PO₄)₂ (Kalsiyum Fosfat) 5 g, (NH₄)SO₄ (Amonyum Sülfat) 0,5 g, NaCl (Sodyum Klorür) 0,2 g, MgSO₄-7H₂O (Magnezyum Sülfat Heptahidrat) 0,1 g, KCl (Potasyum Klorür) 0,2 g, Maya Ekstraktı 0,5 g, MnSO₄-H₂O (Manganez Sülfat Monohidrat) 0,002 g, FeSO₄-7H₂O (Demir Sülfat Heptahidrat) 0,002 g, Agar 18 g 1 L saf su içerisinde çözülüp otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır (Rao 1977).

Nutrient Broth Stok Besiyeri: 0,65 g nutrient broth karışımına 36 mL gliserol eklendikten sonra son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. Magnetik karıştırıcıda karıştırılan besiyeri, otoklavda steril edildi. Aseptik olarak steril 2 mL'lik eppendorf tüplerine 1,2 mL konularak hazırlandı (Barış 2009).

Ashby's Broth: 20 g Sukroz, 0,2 g Dipotasyum Fosfat, 0,2 g Magnezyum Sülfat, 0,2 g Sodyum Klorür, 0,1 g Potasyum Sülfat, 5 g Kalsiyum Karbonat 1 L saf su içerisinde çözülerek pH 7,4 olarak ayarlandı ve otoklavda steril edildi (Rao 1977).

Chorome Azurol S (CAS Medium): 60,5 CAS (HIMEDIA) 50 mL su içinde çözüldü, 10 mL Fe³ solüsyon (1mM FeCl₃ 6 H₂O, 10 mM HCl içinde çözüldü), 72,9 g HDTMA (Hexadecyl trimethyl ammonium bromide) 40 mL içinde çözüldü. Bu 3 çözelti karıştırılarak otoklavlandı. Koyu mavi bir renk oluştu. 100 mL Ashby's Broth, 30,2 g PIPES, 18 g Difco Agar, 750 mL Distile su içerisinde çözüldü. pH 6,8 ayarlanarak otoklavlandı. Önceki karışımla steril erlen içerisinde karıştırılarak petrilere döküldü. +4°C'de 24 saat bekletildi (Louden *et al.* 2011).

%3'lük KOH çözeltisi: 3 g KOH (Potasyum Hidroksit) 100 mL steril saf su içerisinde çözülerek hazırlandı.

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

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

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

Malaşit yeşili: 5 g malaşit yeşili, 100 mL steril saf su içinde çözülerek hazırlandı. Amber şişe içinde buzdolabında muhafaza edildi (Harley and Prescott 2002).

TE (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH: 8) tamponu: 0,3 g Tris-HCl ve 0,093 g EDTA saf su içerisinde çözöldü ve pH 8'e ayarlandı. Son hacim 250 mL'ye tamamlanarak otoklavda steril edildi (Wilson 1997).

%10'luk SDS çözeltisi: 10 g SDS'nin 100 mL steril saf su içerisinde çözünmesiyle hazırlandı. Şişenin ağzı kapatılarak, oda sıcaklığında muhafaza edildi (Wilson 1997).

Proteinaz K: 1 ml steril saf su içerisinde 20 mg proteinaz K olacak şekilde hazırlandı. -20°C'de muhafaza edildi (Wilson 1997).

5 M NaCl çözeltisi: 29,22 g NaCl'ün 100 mL saf su içerisinde çözölmesiyle hazırlandı. Otoklavda steril edildi (Wilson 1997).

% 10 CTAB (Hexadecyl trimetil-ammonium bromide) - 0,7 M NaCl çözeltisi: 80 mL saf su içerisinde önce 4,09 g NaCl (Sodyum Klorür) çözöldü. NaCl tamamen çözöndükten sonra karışıma 10 g CTAB ilave edilerek çözölmesi sağlandı. Toplam hacim 100 mL'ye tamamlandıktan sonra otoklavda steril edilerek, oda sıcaklığında muhafaza edildi (Wilson 1997).

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

20X Dimetil sülfoksit (DMSO): % 100'lük DMSO (Sigma) 2 mL'lik eppendorf tüplere aktararak, kullanılıncaya kadar oda ısısında muhafaza edildi (Wilson 1997).

Primer çalışma konsantrasyonu: Ticari olarak liyofilize halde alınan primerler katoloğı doğrultusunda çözölerek $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ formölü kullanılarak son konsantrasyonu 50 µM olacak şekilde hazırlandı (Adıgüzel 2006).

1X TAE Tamponu: 100 mL 10X TAE'nin (Sigma) hacmi steril distile su 1 L'ye tamamlanarak hazırlandı.

Ethidium bromür çözeltisi: 100 mL steril saf su içerisinde 1 g ethidium bromür magnetik karıştırıcı kullanarak iyice çözüldü. Amber şişede, oda sıcaklığında muhafaza edildi (Adıgüzel 2006).

6X yükleme tamponu: 100 mL için % 100'lük gliserolden 40 mL alıp, 0,1 g bromfenol blue ile karıştırıldı ve hacmi 1x TAE ile 100 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan tampon amber şişe içerisinde, +4°C'de muhafaza edildi (Adıgüzel 2006).

3.2. Metod

3.2.1. Kaynaktan örneklerin alınması ve bakterilerin izolasyonu

Çalışmada; Otlukbeli gölünün ana yapısından, gölün etrafındaki oluşumlardan ve göl suyunun drenaj kısmından su ve toprak parçaları aseptik şartlarda steril tüpler içerisine alınarak, laboratuvara getirilmiş ve çalışma yapılncaya kadar buzdolabında +4°C'de muhafaza edilmiştir. 1 mL su veya 1 g örnek 9 mL steril % 0,85'lik sodyum klorür (NaCl) çözeltisi içerisinde homojenize edilerek, bir seri dilüsyonu (10^{-6} 'ya kadarlık dilüsyon serisi) hazırlanmıştır. Hazırlanan 10^{-1} - 10^{-6} dilüsyonların her birinden üç paralel olmak üzere, araştırma bölgesi bakterilerinin (toprak ve su kaynaklı) izolasyonu için TSA, NA, GNA besiyerlerine ekilerek, 28°C'de iki hafta süresince etüvde inkübe edilmiştir. (Örneklerin alındığı göl ve çevresine ait şekiller: Şekil 3.3 – 3.11)



Şekil 3.1. Ekimi yapılan bir türün oluşturduğu rhizoid koloni formu.



Şekil 3.2. Farklı türlere ait olduğu renk ve koloni morfolojilerinden belli olan bakteriler.



Şekil 3.3. Gölün güney istikametinden çıkıp göle karışan maden suları.



Şekil 3.4. Gölün güney istikametinden çıkan suların birikmiş hali



Şekil 3.5. Gölün güney istikametine doğru akıp göle karışmayan maden suları.



Şekil 3.6. Kaynaklardan bir kısmı göle dökülürken bir kısmı güney istikametine dere yatağına akmaktadır



Şekil 3.7. Göl çevresinde görülen gaz çıkışları



Şekil 3.8. Gölün güney istikametinde bulunan gaz çıkışı çatlakları



Şekil 3.9. Gölün kuzey tarafındaki yamaçlarda oluşmaya başlamış traventerler.



Şekil 3.10. Traverten oluşumları



Şekil 3.11. Travertenlerde kalsifikasyon oluşumları

3.2.2. Kalsiyum karbonat (CaCO_3) oluşturma özelliklerinin araştırılması

-86'da muhafaza edilen izolatlar genel besiyerlerinde tekrar üretilmiştir. İzolatların CaCO_3 oluşumunda (kalsifikasyonda) etkili olup olmadıklarını araştırabilmek için Boquet ve çalışma arkadaşlarının (1973) ilk olarak uyguladıkları, daha sonra birçok araştırmacı tarafından da kullanılan B-4 besiyeri kullanılmıştır. B-4 besiyerine ekilen izolatlar 40 gün boyunca 28°C 'de inkübe edilmiş ve kristal oluşturup oluşturmamaları belirli periyotlarla ışık mikroskop altında gözlemlenmiştir (Boquet *et al.* 1973; Barış 2009) (Şekil 3.13).

3.2.3. CaCO_3 çözme özelliklerinin araştırılması

CaCO_3 çözme özelliklerinin araştırılması için hazırlanan besiyerine (Barış 2009) ekilen bakterilerin çözme özellikleri ışık mikroskobu altında incelenerek zon oluşturma etkinliklerine göre ayrımları yapılmıştır.

3.2.4. Azot fiksasyon özelliklerinin araştırılması

İzolatların azot fiksasyonundaki etkinliklerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemdir. Bu özelliğin belirlenmesinde NFM besiyeri kullanılmıştır (Okon *et al.* 1977; Mehnaz *et al.* 2007; Rafique *et al.* 2015).

3.2.5. İnorganik fosfat çözünürlüğü özelliklerinin belirlenmesi

Saflaştırılması yapılan izolatlardan inorganik fosfat çözünürlüğü özelliklerinin belirlenmesi amacıyla Pikovskaya besiyeri kullanılmıştır (Subba Rao 1977).

3.2.6. Siderefor etkilerin ve demir-kükürt oksidasyonlarının belirlenmesi

Saflaştırılan izolatların bu özelliklerinin belirlenmesi amacıyla CAS besiyeri kullanılmıştır (Louden *et al.* 2011).

3.3. Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi

Bakterilerin bireysel morfolojileri boyutlarının çok küçük olmaları nedeniyle ancak mikroskoplar ile saptanabilir. Bu amaçla, uygun sıvı veya katı ortamlarda saf olarak üretilen bakterilerden hazırlanan preparatlar özel boyalarla boyanarak incelenirler. Mikroskop altında, bakterilerin yapıları (kokoid, çomak, virgül, spiral, pleomorfik, vs.), boyutları, spor durumu (var veya yok, varsa terminal, subterminal, sentral, lateral), boyanma özelliği (Gram negatif veya pozitif, vb.) gibi incelemeler yapılmaktadır (Arda 2000; Harley and Prescott 2002).

a. Hücre morfolojisinin belirlenmesi: Her bir izolattan smear hazırlanarak kristal violet ile basit boyama yapılmış ve hücre yapıları kaydedilmiştir (Temiz 2000; Harley and Prescott 2002; Barış 2009).

b. Hücre boyutlarının belirlenmesi: Basit veya negatif boyama işlemi yapılan

preparatlardaki izolatların immersiyon objektifinde oküler mikrometre yardımı ile hücre boyutları hesaplanmıştır (Temiz 2000; Barış 2009).

c. Endospor varlığının ve hücre içindeki yerinin belirlenmesi: Bazı bakteriler ortam koşulları kötüleştiği zaman, oluşan kötü ortam koşullarına daha dirençli olan endospor adı verilen yapılar oluşturmaktadırlar. Endospor oluşturabilme bakteri sistematğinde önemli bir özelliktir (Harley and Prescott 2002; Hasanekoğlu ve Yeşilyurt 2002). İncelenecek izolatlar uygun ortamlarda yetiştirilerek, endospor oluşumunu sağlayacak şartlarda (sıcak-soğuk, kuruma, yaşlanma vb.) bekletilmiştir. İnceleme için hazırlanan kültürlerden smear hazırlanmış ve kaynayan su banyosu üzerine yerleştirilmiştir. Preparatın üzeri malaşit yeşili ile kaplanarak üzerine kurutma kağıdı koyulmuş ve kurutma kağıdının üstüne malaşit yeşili ilave edilmiştir. Kurutma kağıdının ıslak kalması sağlanarak 5-7 dakika boyama yapılmıştır. Süre sonunda preparatın üzerinde kurutma kağıdı kaldırılıp preparat hafif su akımı ile yıkanarak fazla boya uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemi sonunda preparat safranin ile 20-30 sn. boyanmıştır.

Karşıt boya uygulamasından sonra preparat hafif su akımı ile yıkanıp, kurutulmuş ve immersiyon objektifinde incelenmiştir (Harley and Prescott 2002; Barış 2009).

3.4. Kültür Özelliklerinin Belirlenmesi

Bakterilerin kültürel özelliklerini incelemeye, bunların katı ve sıvı ortamlardaki saf kültürleri kullanılmıştır.

İzolatlar katı besiyerlerine nokta veya çizgi ekim şeklinde kontamine edilip, koloni meydana getirmeleri beklenmiş, koloni morfolojisi, mikroskopla incelenerek üstten görünüşleri, yüksekliği, kenar şekilleri ve rengi tespit edilmiştir (Demirağ ve Demir 2000; Temiz 2000).

Bakteriler sıvı besiyerlerinde üstte pellicül, dipte tortu, veya granüllü bir üreme gösterebilmektedir. İzolatlar nutrient broth (NB) içeren tüplere ekilerek sıvı

besiyerlerinde kültür özellikleri tespit edilmiştir (Arda 2000; Barış 2009).

3.5. İzolatların Bazı Genetiksel Özelliklerinin Belirlenmesi

1. 1 mL genç kültür alınarak 13000 – 16000 arası rpm’de 2 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım pipetle alınarak pelet kısmı tüp içerisinde bırakıldı.
2. Süspanse hücrelerin içerisine 480 µl 50 mM EDTA eklendi
3. Litik enzim (ler) (120 µl) (lizozim) eklenerek 37°C’de 30-60 dk inkübe edildi.
4. İnkübasyonun ardından 13000–16000 arası rpm’de 2 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı pipetle alındı.
5. Tüp içerisinde kalan pelet kısma 600 µl nükleik Lizis solüsyon katılarak pipetle karıştırıldı.
6. 80°C’de 5 dk inkübe edilerek oda sıcaklığında soğutuldu.
7. 3 µl RNase solüsyon eklenerek karıştırıldı. 37°C’de 15 – 60 dk inkübe edilerek oda ısısında soğutuldu.
8. 200 µl protein çökelti solüsyonu eklenerek vortexle homojenizasyonu sağlandı ve 5 dk buz üzerinde inkübasyona bırakıldı.
9. 13000 – 16000 arası rpm’de 3 dk santrifüj edildi.
10. Süpernatanttan 600 µl izopropanol içeren bir tüpe alınarak oda sıcaklığında karıştırıldı.
11. 600 µl %70’lik etanol eklenerek oda sıcaklığında karıştırıldı ve 13000 – 16000 arası rpm’de 2 dk santrifüj edildi.
12. Etanol aspire edildi ve tüp içerisinde kalan pelet 10 – 15 dk havada kurutuldu.
13. Elde edilen DNA peleti 100 µl rehidrasyon solüsyonunda 1 saat 65°C’de rehidre edildi.

Reaksiyonun Hazırlanması

PCR’ı yapılacak her bir örnek için 30 µl’lik reaksiyon hazırlanmıştır. Bir örnek için hazırlanan reaksiyon; 3 µl 10 x PCR tamponu (100 mM Tris – HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, %0,01 jelatin pH: 8,3), 0,6 µl dNTP (deoksinükleotidtrifosfatlar: dATP,

dGTP, dCTP, dTTP – 10 mM), 0,3 µl 50 µM primer 27F (forward 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3'), 0,3 µl 50 µM primer 1492R (reverse 5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -3'), 1,2 µl DMSO, 1,8 µl MgCl₂, 0,3 µl 5 unit/µl *Taq* DNA polimeraz ve 21,5 µl steril saf su ile 29 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlandı. Karışıma son olarak 1 µl kalıp DNA eklenerek son hacim 30 µl'ye tamamlandı.

PCR programı:

Hazırlanan örnekler, 95°C'de 2 dakika denetürasyon, bunu takiben 36 döngü tamamlanacak şekilde 94°C'de 1 dk denatürasyon, 53°C'de 1 dk bağlanma ve 72°C'de 2 dk uzama basamakları ve son olarak 72°C'de 5 dk uzama basamağından oluşacak şekilde programlanan PCR termal döngü cihazına yerleştirildi. Seçilen programda hedef bölgelerin çoğaltılması yapıldı.

16S rDNA PCR ürünlerinin elektroforezi:

1,2 g agaroz üzerine 120 mL 1X TAE tamponu ilave edildi. Karışım mikrodalga fırında iyice çözününceye kadar kaynatıldı. 50°C'ye kadar soğutulan agaroz jeli 0,6 µl etidium bromür eklenerek, içerisine tarak yerleştirilmiş olan elektroforez jel küvetine döküldü. 15-20 dk beklenerek jelin donması sağlandı. Donan jelden taraklar dikkatlice çıkarıldı ve içerisinde 1X TAE tamponu bulunan elektroforez tankının içine yerleştirildi. Jeldeki ilk çukura, DNA markırından [50-100-200-300-400-500-750-1000-1400-1500-2000-3000-4000-6000-8000-10000] (Sigma D7058) 8 µl yüklendi. Diğer çukurlara ise her bir örnek için 2 µl 6X yükleme tamponu, 8 µl PCR ürünü karıştırılarak yüklendi.

Elektroforez jel düzeneği 90 volta ayarlanarak örnekler 75 dakika yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jel, jel dökümantasyon sistemi ile görüntülendi ve bilgisayar ortamında (DNR BioImaging Systems Software) analiz edildi.

DNA dizi analizleri ve BLAST işlemlerinin yapılması

Elde edilen ampliconlar hizmet alımı yoluyla (AltıGenBio Inc.) DNA dizi analizleri yaptırıldı. Analizler sonucu düzenlenen nükleotid dizileri NCBI kütüphaneleri (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) ile homolojilerinin belirlenmesi için BLAST işlemi yapıldı. Sonuç olarak değerlendirmelerin sonunda gen dizileri GenBank'a girilerek kabul numaraları alındı.

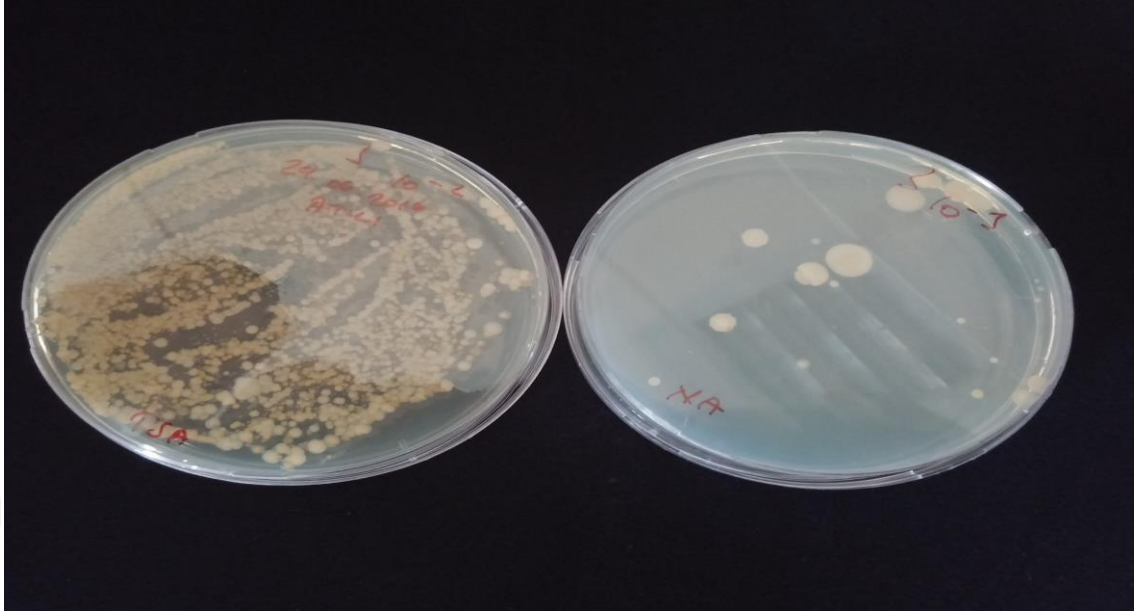


4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çalışmada, Erzincan ili Otlukbeli (Karakulak) ilçe merkezinin “Otlukbeli Komları” yöresinde bulunan Otlukbeli gölü ve çevresinden örnekler alınmıştır. Alınan örneklerden farklı oldukları düşünülen 76 bakteri izole edilmiştir. Alınan örneklerin kaynakları, örneklere ve izolatlara verilen kodlar Çizelge 4.1 de detaylı olarak verilmiştir.

Traverten oluşumundan alınan ve “12” olarak kodlanan örneğin 10^{-2} 'den 10^{-6} 'ya kadar olan dilüsyonlarında yeterince üreme görülmemiştir. Bu nedenle 10^{-1} dilüsyonundan ekim yapılarak farklı koloniler yeni besiyerlerine alınıp saflaştırılmıştır. “3” olarak kodlanan kaynaktan uzak çamurda üreme açısından 10^{-3} uygun bulunarak farklı koloniler tesbit edilip yeni besiyerlerine ekimleri yapılmıştır. “9” olarak kodlanan biyofilm tabakası örneğinin 10^{-2} dilüsyonundan, “6” olarak kodlanan yarıktan gaz ve su çıkışı örneğinin 10^{-2} dilüsyonundan, “8” olarak kodlanan kırmızı renkli toprak ve çamur örneğinin 10^{-3} dilüsyonundan, “4” olarak kodlanan ilk gaz çıkışı bölgesinden, “7” olarak kodlanan büyük kaynak çıkışı kırmızı çamur bölgesinden, “10” olarak kodlanan ve gölden alınan örneklerin 10^{-1} dilüsyonlarından koloniler alınarak saflaştırma yapılmıştır (Şekil 3.1). Örneklerin alındığı yerlerden 1, 2, 5 ve 11 olarak kodlanan bölgelerden alınan izolatların elde edilen izolatlarla morfolojik olarak benzerlik göstermesinden dolayı araştırmadan çıkarılmıştır.

İnkübasyonun; 1., 2., 3., 5., 7. ve 14. günlerinde petri plakları incelenmiştir. Elde edilen saf kolonilerin, koloni morfolojileri ve ışık mikroskopunda basit ve çeşitli differansiyel boyamalar yapılarak mikromorfolojileri karşılaştırılmış, farklı olduğu düşünülen 76 izolat seçilmiş ve diğer karakterizasyon işlemlerine kadar %18 gliserol içeren NB stok besiyerinde -86°C 'de saklanmıştır (Cacchio *et al.* 2004).



Şekil 3.12. Hazırlanan dilüsyonlardan gösterilen örnekte seyreltmeden önceki ve sonraki hali görülmektedir.

Çizelge 4.1. Örneklerin alındığı araştırma yapılan göl ve çevresindeki bölgelere verilen kodlar, dilüsyon oranları, izolat sayıları ve izolatlara verilen kodlar

ÖRNEĞİN ALINDIĞI YER VE VERİLEN KOD NUMARASI	DİLÜSYON ORANI	İZOLAT SAYISI	İZOLATLARIN KODLARI
3 - KAYNAKTAN UZAK ÇAMUR	10^{-3}	23 İZOLAT	3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, 3-9, 3-10, 3-11-A, 3-11-B, 3-12-A, 3-12-B, 3-13, 3-20, 3-21, 3-22, 3-23, 3-24, 3-25, 3-26-A, 3-26-B
4 – İLK GAZ ÇIKIŞI	10^{-1}	9 İZOLAT	4-1, 4-2, 4-3, 4-4, 4-7, 4-8, 4-9, 4-10-A, 4-10-B
6 - YARIKTAN GAZ ÇIKIŞI	10^{-2}	10 İZOLAT	6-1, 6-2, 6-4, 6-5, 6-6, 6-8, 6-9, 6-10, 6-11, 6-21
7 – BÜYÜK KAYNAK KIRMIZI ALAN SU ÇIKIŞI	10^{-1}	1 İZOLAT	7-1
8 - KIRMIZI TOPRAK – ÇAMUR	10^{-3}	6 İZOLAT	8-2, 8-3, 8-4, 8-5, 8-6, 8-7,
9 - KAYNAĞA YAKIN BİYOFİLM TABAKA	10^{-2}	4 İZOLAT	9-1, 9-2, 9-3, 9-4,
10 – GÖL	$10^{-1} - 10^{-2}$	12 İZOLAT	10-3, 10-6, 10-7, 10-8, 10-9, 10-10, 10-11, 10-12, 10-13, 10-X, 10-Y, 10-Z,
12 - 2. KAYNAK TRAVERTEEN OLUŞUMU	10^{-1}	11 İZOLAT	12-1, 12-2-A, 12-2-B, 12-3, 12-4, 12-5, 12-6, 12-7, 12-20-A, 12-20-B, 12-21

4.1. İzole Edilen Bakterilerde CaCO₃ Çözme Sonuçları

Göl ve çevresinde bulunan yapılardan alınan örneklerden izole edilen bakteriler CaCO₃ çözme çöktürme açısından spesifik özellik gösteren besiyerine (Barış 2009) ekilmiş ve *in vitro* olarak CaCO₃ çözme özellikleri belirlenmiştir. Besiyerinde CaCO₃ çözme özelliği gösteren bakteriler belirlenerek kaydedilmiştir. Kültürlerin kurumasını önlemek için petriplakları parafilm ile kaplanmıştır. *In vitro* olarak CaCO₃ çözme özelliği pozitiflik gösteren izolatların sayısı 5 olarak belirlenmiş ve Çizelge 4.2’de detayları verilmiştir. CaCO₃ çözme özellikleri zon oluşturup oluşturmamalarına ve zon çaplarına göre değerlendirilmiştir. Buna göre petrilerde zon oluşmaması – (negatif), 0,5 mm çapa kadar zon oluşması + (zayıf çözme), 0,5 – 1 cm arasında oluşan zon ++ (orta düzeyde çözme), 1 cm’den daha büyük zon oluşması ise +++ (iyi derecede çözme) olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.2. Göl ve çevresinden elde edilen bakteri izolatlarının saf kültürlerinin *in vitro* CaCO₃ çözme durumları

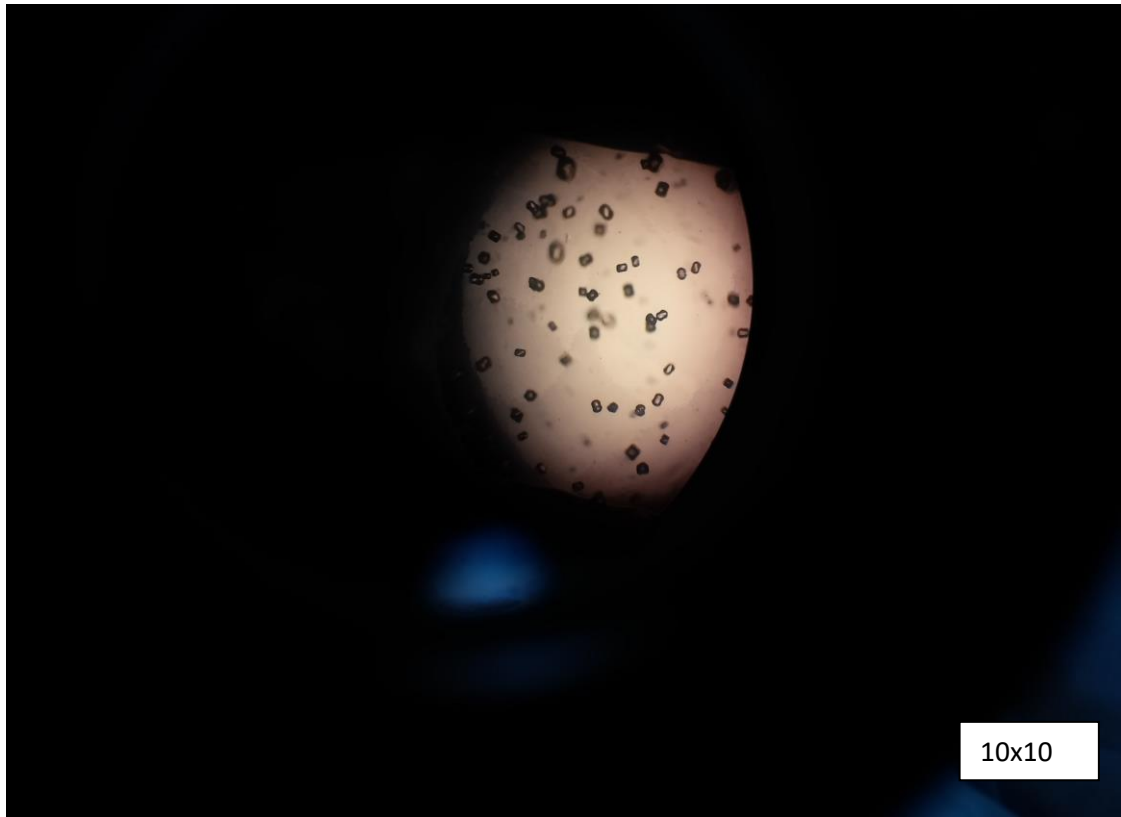
İzolatın Kodu	Kalsiyum Karbonat (CaCO ₃) Çözme	Gün	Alındığı Yerin Kodu	İzolatın Kodu	Kalsiyum Karbonat (CaCO ₃) Çözme	Gün	Alındığı Yerin Kodu
3-1	-	-	3	3-25	-	-	3
3-2	-	-	3	4-2	-	-	4
3-3	-	-	3	4-10-B	-	-	4
3-4	+++	3.gün	3	6-21	+ G	14.gün	6
3-5	-	-	3	7-1	+++	3.gün	7
3-6	-	-	3	8-5	-	-	8
3-7	-	-	3	8-6	-	-	8
3-8	-	-	3	9-1	-	-	9
3-11-A	-	-	3	10-12	+++	3.gün	10
3-13	-	-	3	10-X	-	-	10
3-22	-	-	3	12-1	+++	3.gün	12

- Negatif
 ++ Orta düzey çözme
 G Geç çözme
 + Zayıf çözme
 +++ İyi derecede çözme

4.2. İzole Edilen Bakterilerde CaCO₃ Oluşturma Sonuçları

Göl ve çevresinden alınan örneklerden izole edilen bakteriler CaCO₃ oluşturma açısından özellik gösteren B-4 besiyerine (Boquet *et al.* 1973) ekilmiş ve *in vitro* olarak

CaCO_3 (kristal halde) oluşturup oluşturmadığı belirlenmiştir. B-4 besiyerinde gelişen izolatlar 1., 3., 5., 7., 14., ve 28. günlerin sonunda ışık mikroskobunda incelenerek besiyerinde ve/veya koloni içinde kristal oluşturabilen izolatlar ve kültürün kaçınıcı gününde kristal oluşturdıkları kaydedilmiştir. Kültürlerin kurumasını önlemek için petriplakları parafilm ile kaplanmıştır. İyi derecede kristal oluşturabilen izolatlardan birine ait ışık mikroskobu görüntüsü örnek olması açısından Şekil 3.13'te verilmiştir. *İn vitro* olarak kristal oluşturabilen izolatların sayısı 18 olarak belirlenmiş ve Çizelge 4.3'de detayları verilmiştir. 10X büyütmeyle mikroskop altında bakıldığında Kristal görülmemesi – (negatif), bir görüntü sahasında 1 – 10 arasında kristal görülmesi + (zayıf CaCO_3 oluşumu veya kristalleşme), 10 – 20 arasında kristal görülmesi ++ (orta düzey kristalleşme), 20'den daha fazla kristal görülmesi ise +++ (iyi derecede kristalleşme) olarak değerlendirilmiştir. Bazı izolatlarda ise geç kristalleşme gözlemlenmiş ve G olarak belirtilmiştir.



Şekil 3.13. B-4 Besiyerinde CaCO_3 oluşumu

Çizelge 4.3. Göl ve çevresinden elde edilen bakteri izolatlarının saf kültürlerinin *in vitro* CaCO₃ oluşturma durumları

İzolatın Kodu	Kalsiyum Karbonat (CaCO ₃) Oluşturma	Gün	Alındığı Yer Kodu	İzolatın Kodu	Kalsiyum Karbonat (CaCO ₃) Oluşturma	Gün	Alındığı Yer Kodu
3-1	+++	7.gün	3	3-26-A	+++	7. gün	
3-2	+++	7.gün	3	4-2	+++	7.gün	4
3-3	+ G	28.gün	3	4-9	+++	7. gün	
3-4	-	-	3	4-10-B	+++	7.gün	4
3-5	++	14.gün	3	6-2	++	14. gün	
3-6	+++	7.gün	3	6-21	-	-	6
3-7	+++	7.gün	3	7-1	-	-	7
3-8	+++	7.gün	3	8-5	+++	7.gün	8
3-11-A	+ G	28.gün	3	8-6	+++	7.gün	8
3-13	+++	7.gün	3	9-1	+++	7.gün	9
3-22	+++	7.gün	3	10-12	-	-	10
3-25	++	14.gün	3	10-X	++	14.gün	10
				10-Z	++	7. gün	10

- Negatif
 ++ Orta düzey kristalleşme
 G Geç kristalleşme
 + Zayıf kristalleşme
 +++ İyi derecede kristalleşme

4.3. İzole Edilen Bakterilerin Azot Fiksasyonundaki Etkinlikleri

Azot gazı (N₂) iki azot atomunu bağlayan üçlü bağ nedeni ile kimyasal olarak kolay tepkime vermeyen bir gazdır ve birçok bitki ve hayvan tarafından kullanılamamaktadır (Spellman 1996). Ancak azot gazı bazı mikroorganizmalar, bakteriler ve mavi–yeşil alglerce fikse edilerek canlı bünyesine alınabilmektedir (Spellman 1996). Bütün bu sebeplerden ötürü azot fiksasyonuna etki eden organizmalar ve bunların aktiviteleri her zaman önem arz etmiştir. Bu nedenlerle göl ve çevresinden izole edilen bakterilerin azot fiksasyonlarındaki etkinliklerinin araştırılması kaçınılmaz olmuştur. İzolatların Azot fiksasyonundaki etkinliklerinin belirlenmesinde NFM besiyeri kullanılmıştır (Okon *et al.* 1977; Mehnaz *et al.* 2007; Rafique *et al.* 2015). *In vitro* çalışma sonucunda azot fiksasyonunda etkin 32 bakteri tespit edilmiştir. Fiksasyonda etkili oldukları belirlenen bakteriler Çizelge 4.4’te detaylı olarak verilmiştir. Azot fiksasyonuna ait bulgular petrilerde bakterilerin zon oluşturma durumlarına ve zon çapına göre değerlendirilmiş ve zon oluşmaması – (negatif), 0,5 mm çapa kadar zon oluşması + (zayıf fiksasyon), 0,5 – 1 cm arasında oluşan zon ++ (orta düzeyde fiksasyon), 1 – 1,5 cm zon oluşması +++ (iyi derecede fiksasyon) ve 1,5 cm’den daha büyük zon oluşması ++++ (çok iyi

derecede fiksasyon) olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.4. Göl ve çevresinden elde edilen bakteri izolatlarının saf kültürlerinin *in vitro* azot fiksasyonundaki etkinlikleri

İzolatın Kodu	İzolatın Azot (N) Fiksasyonundaki Etkinliği	Alındığı Yerin Kodu	İzolatın Kodu	İzolatın Azot (N) Fiksasyonundaki Etkinliği	Alındığı Yerin Kodu
3-1	+	3	6-2	+++	6
3-3	+	3	6-8	+	6
3-4	-	3	7-1	+	7
3-8	+	3	8-2	+	8
3-9	+	3	8-3	+	8
3-13	+	3	8-4	+	8
3-20	++	3	8-6	+++	8
3-21	+	3	8-7	+	8
3-22	+++	3	9-3	+	9
3-23	+++	3	10-7	+	10
3-26-A	+	3	10-9	+	10
3-26-B	+	3	10-13	-	10
4-1	+	4	10-X	+	10
4-3	+	4	10-Y	+	10
4-7	+++	4	10-Z	+	10
4-8	+	4	12-3	+	12
4-9	++++	4	12-6	+	12

- Negatif

++ Orta düzey fiksasyon

++++ Çok iyi derecede fiksasyon

+ Zayıf fiksasyon

+++ İyi derecede fiksasyon

4.4. İnorganik Fosfat Çözünürlüğü Özelliklerinin Belirlenmesi Sonuçları

Bitki beslenme açısından değerlendirildiğinde gerek kök sisteminin gelişmesi ve gerekse de bitkilerin olgunlaşmasındaki roller açısından fosfor da önemli bir yer tutmaktadır (Atalay 1982). Bununla birlikte nükleik asitlerin yapısına katılması, fosfolipit ve fosfoprotein yapılarıdaki işlevleri nedeniyle fosfor daha çok önemli hale gelmektedir (Barao 2014; Pasek *et al.* 2014). İnorganik fosfat çözünürlüğünün araştırılması amacıyla Pikovskaya besiyeri kullanılmıştır. Araştırma sonucunda inorganik fosfat çözünürlüğünde öneme sahip 14 bakteri tespit edilmiş ve bu bakterilere ait sonuçlar detaylı olarak Çizelge 4.5'te verilmiştir. İnorganik fosfat çözünürlüğüne ait bulgular petrilere bakterilerin zon oluşturma ve zon çapına göre değerlendirilmiş ve zon oluşmaması – (negatif), 0,5 mm çapa kadar zon oluşması + (zayıf çözünürlük), 0,5 – 1 cm arasında oluşan zon ++ (orta düzeyde çözünürlük), 1 – 1,5 cm zon oluşması +++

(iyi derecede çözünürlük) ve 1,5 cm'den daha büyük zon oluşması ++++ (çok iyi derecede çözünürlük) olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.5. Göl ve çevresinden elde edilen bakteri izolatlarının saf kültürlerinin *in vitro* inorganik fosfat çözünürlüğündeki etkinlikleri

İzolatin Kodu	İzolatin İnorganik Fosfat (P) Çözünürlüğündeki Etkinliği	Alındığı Yerin Kodu	İzolatin Kodu	İzolatin İnorganik Fosfat (P) Çözünürlüğündeki Etkinliği	Alındığı Yerin Kodu
3-1	-	3	6-2	+++	6
3-3	-	3	6-8	-	6
3-4	+++	3	7-1	+	7
3-8	-	3	8-2	++++	8
3-9	+++	3	8-3	-	8
3-13	-	3	8-4	-	8
3-20	+++	3	8-6	-	8
3-21	+	3	8-7	-	8
3-23	+	3	9-3	+++	9
3-26-A	+++	3	10-7	++++	10
3-26-B	-	3	10-9	-	10
4-1	-	4	10-13	+++	10
4-3	-	4	10-X	-	10
4-7	-	4	10-Y	-	10
4-8	-	4	10-Z	++++	10
4-9	+++	4	12-3	-	12
			12-6	-	12

- Negatif
 ++ Orta düzey çözünürlük
 ++++ Çok iyi derecede çözünürlük
 + Zayıf çözünürlük
 +++ İyi derecede çözünürlük

4.5. İzole Edilen Bakterilerin Siderofor Etkileri ve Demir Şelasyonu Özelliklerinin Belirlenmesi Sonuçları

Sideroforlar demir oksihidroksitleri çözebilen küçük organik bileşiklerdir (Neilands 1981a,b; Vala *et al.* 2006; Velasquez *et al.* 2016). Sideroforlar doğadan başka yerde bulunmayan pek çok değişik aminoasitleri yapısında bulunduran 400-1500 Da molekül ağırlığındaki demir bağlayan proteinlerdendir. Sideroforların yapısı türler arasında oldukça büyük değişiklikler göstermektedir. Şimdiye kadar yaklaşık 500 siderofor değişik mikroorganizmalardan izole edilmiştir (Boukhalfa and Crumbliss 2002). Bunlar ferrik demir (Fe³) için son derece yüksek afiniteye sahiptir ve ferrik demir için bağımsız bağlanma sabitleri sergilerler (Reid *et al.* 1993). Demirin Fe-III şeklindeki çözünürlüğü

çok düşüktür ve dolayısıyla organizmalar tarafından kullanılamazlar (Kraemer 2004). Bu nedenlerden ötürü çalışma alanındaki kırmızı toprak ve çamur renginden de anlaşılacağı üzere bölge demir açısından farklı bir bölgedir. Demir oksidasyonu araştırılması için CAS Medium kullanılmıştır (Louden *et al.* 2011). *In vitro* çalışma sonucunda demir oksidasyonunda etkin olan 14 bakteri tespit edilmiş ve detaylı olarak Çizelge 4.6'da verilmiştir. Demir şelasyonu açısından elde edilen bulgular petrilere bakterilerin zon oluşturma, zon çapı ve besiyerinde renk değiştirme durumlarına göre değerlendirilmiş renk değişimi ve zon oluşmaması – (negatif), 0,3 mm çapa kadar zon oluşması + (zayıf şelasyon), 0,3 – 0,6 mm arasında oluşan zon ++ (orta düzeyde şelasyon), 0,6 – 1 cm zon oluşması +++ (iyi derecede şelasyon) ve 1 cm'den daha büyük zon oluşması ++++ (çok iyi derecede şelasyon) olarak değerlendirilmiştir. Zon oluşmasına paralel olarak besiyerlerinde renk değişiklikleride gözlenmiştir.

Çizelge 4.6. Göl ve çevresinden elde edilen bakteri izolatlarının saf kültürlerinin *in vitro* demir şelasyonundaki etkinlikleri

İzolatin Kodu	İzolatin Demir (Fe) Şelasyonundaki Etkinliği	Alındığı Yerin Kodu	İzolatin Kodu	İzolatin Demir (Fe) Şelasyonundaki Etkinliği	Alındığı Yerin Kodu
3-1	-	3	3-26-B	-	3
3-3	+++	3	4-1	++	4
3-4	+++	3	4-3	-	4
3-6	+++	3	4-7	++++	4
3-8	+++	3	4-8	++	4
3-9	+++	3	4-9	++++	4
3-13	+	3	4-10-A	+++	4
3-20	+	3	6-2	+++	6
3-21	+	3	6-8	++	6
3-22	-	3	6-9	+	6
3-23	+	3	7-1	-	7
3-26-A	+++	3	8-2	-	8
8-3	-	8	10-X	-	10
8-4	-	8	10-Y	+++	10
8-6	-	8	10-Z	+++	10
8-7	++	8	12-2-A	++	12
9-3	+++	9	12-2-B	++	12
10-7	+	10	12-3	-	12
10-8	+++	10	12-4	-	12
10-9	-	10	12-5	-	12
10-13	+++	10	12-6	-	12

- Negatif

++ Orta düzey şelasyon

++++ Çok iyi derecede şelasyon

+

Zayıf şelasyon

+++

İyi derecede şelasyon

4.6. İzole Edilen Bakterilerin Kükürt (S) Fiksasyonundaki Etkinliklerinin Belirlenmesi

Kükürt, kireçli ve alkali topraklarda pH'ı azaltan ve bazı besin maddelerinin emilimini kolaylaştıran asitleyici bir elementtir. Bununla birlikte topraktaki sodyum durumunu iyileştirerek bazı bitki patojenlerinin kontrolünde önemli bir rol oynar (Kertesz and Mirleau 2004). Kükürt bakterileri indirgenmiş veya kısmen oksitlenmiş inorganik sülfür bileşiklerini oksitleyebilme yeteneğindedirler. Tiyobasiller bunun için iyi bir örnektir. Oksidasyon sonucunda oluşan sülfat, bitkiler tarafından kullanılabilir ve yine açığa çıkan asit bitki besin maddelerinin çözünmesine yardımcı olur ve alkali toprakları iyileştirir (Hitsuda *et al.* 2005). Kükürt fiksasyonuna ait bulgular petrilere bakterilerin zon oluşturma durumlarına ve zon çaplarına göre değerlendirilmiş ve zon oluşmaması – (negatif), 0,1 mm çapa kadar zon oluşması + (zayıf fiksasyon), 0,1 – 0,2 mm arasında oluşan zon ++ (orta düzeyde fiksasyon), 0,2 – 0,4 mm zon oluşması +++ (iyi derecede fiksasyon) ve 0,4 mm'den daha büyük zon oluşması ++++ (çok iyi derecede fiksasyon) olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.7. Göl ve çevresinden elde edilen bakteri izolatlarının saf kültürlerinin *in vitro* kükürt oksidasyonundaki etkinlikleri

İzolatin Kodu	İzolatin Kükürt (S) Oksidasyonundaki Etkinliği	Alındığı Yerin Kodu	İzolatin Kodu	İzolatin Kükürt (S) Oksidasyonundaki Etkinliği	Alındığı Yerin Kodu
3-1	-	3	6-2	+++	6
3-3	-	3	6-8	-	6
3-4	+++	3	7-1	+	7
3-8	-	3	8-2	++++	8
3-9	+++	3	8-3	-	8
3-13	-	3	8-4	-	8
3-20	+++	3	8-6	-	8
3-21	+	3	8-7	-	8
3-22	-	3	9-3	+++	9
3-23	+	3	10-7	++++	10
3-26-A	+++	3	10-9	-	10
3-26-B	-	3	10-13	+++	10
4-1	-	4	10-X	-	10
4-3	-	4	10-Y	-	10
4-7	-	4	10-Z	++++	10
4-8	-	4	12-3	-	12
4-9	+++	4	12-6	-	12

- Negatif
 ++ Orta düzey oksidasyon
 ++++ Çok iyi derecede oksidasyon
 + Zayıf oksidasyon
 +++ İyi derecede oksidasyon

Çalışmamızın tamamında yer verdiğimiz CaCO_3 çözme ve çöktürme, azot fiksasyonu, inorganik fosfat çözünürlüğü, demir oksidasyonu ve kükürt fiksasyonu çalışmalarında daha önce yapılan araştırmalar ve yayınlanan makalelerdeki benzerlik ve farklılıkları hedeflenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda tespit edilen bakteri türleriyle veya yeni türlerin tespiti amacıyla pozitif sonuç gözlemlediğimiz türler Çizelge 4.8’de gösterdiği gibi toparlanmış ve içlerinden en iyi ve ortak sonuç veren 5 izolat seçilerek tür tayini için tanımlama amacıyla moleküler testlere tabi tutulmuştur.

Çizelge 4.8. Çalışma sonucunda elde edilen verilerinin toplu halde gösterimi

İzolatin Kodu	CaCO_3 Çözme	CaCO_3 Çöktürme	Azot Fiksasyonu	İnorganik Fosfat Çözünürlüğü	Demir Oksidasyonu	Kükürt Fiksasyonu
3-1	-	+++	+	-	-	-
3-2	-	+++	-	-	-	-
3-3	-	+G	+	-	+++	-
3-4	+++	-	-	+++	+++	+++
3-5	-	++	-	-	-	-
3-6	-	+++	-	-	+++	-
3-7	-	+++	-	-	-	-
3-8	-	+++	+	-	+++	-
3-9	-	-	+	+++	+++	+++
3-10	-	-	-	-	-	-
3-11-A	-	+G	-	-	-	-
3-11-B	-	-	-	-	-	-
3-12-A	-	-	-	-	-	-
3-12-B	-	-	-	-	-	-
3-13	-	+++	+	-	+	-
3-20	-	-	++	+++	+	+++
3-21	-	-	+	+	+	+
3-22	-	+++	+++	-	-	-
3-23	-	-	+++	+	+	+
3-24	-	-	-	-	-	-
3-25	-	++	-	-	-	-
3-26-A	-	+++	+	+++	+++	+++
3-26-B	-	-	+	-	-	-
4-1	-	-	+	-	++	-
4-2	-	+++	-	-	-	-
4-3	-	-	+	-	-	-
4-4	-	-	-	-	-	-
4-7	-	-	+++	-	++++	-
4-8	-	-	+	-	++	-
4-9	-	+++	++++	+++	++++	+++

4.8. Seçilen Örneklerin Moleküler Tanı Sonuçları

Elde edilen DNA dizi analizleri Bioedit yardımı ile işlenmiş ve www.ncbi.nlm.gov.tr adresine gönderilmiştir. Tür tanımlamaları yapılarak aksesyon numaraları, tanı değerleri ve baz sayıları alınan izolatlar Çizelge 4.10’da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Tür tanımlamaları yapılan izolatlara ait veriler.

İzolatın kodu	Bakterinin İsmi	Accession numarası	Tanı Değeri	Baz sayısı (bp)
3-26-A	<i>Bacillus megaterium</i>	MH450135	%100	1374
4-9	<i>B. simplex</i>	MH450136	%99	1374
6-2	<i>B. atropheus</i>	MH450137	%100	1373
10-7	<i>Solibacillus sylvestris</i>	MH450138	%99	1379
10-Z	<i>B. licheniformis</i>	MH450139	%99	1375

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Biyosferin önemli bir parçasını oluşturan su ile kaplı alanlar canlı tür ve çeşitliliği bakımından zengin olmalarının yanı sıra birçok alanda yeterince araştırma yapılmamış olmaması yeni türler ve gen kaynakları açısından büyük önem arz etmektedir (Hairston and Fussmann 2002).

Literatür taramalarında mikrobiyolojik açıdan herhangi bir araştırma ve değerlendirme yapılmadığını gördüğümüz Otlukbeli Gölü de bu kapsamda olan alanlardan birisidir. Araştırmaya konu olan göl ve çevresindeki oluşumlar oldukça dikkat çekici olmasına rağmen gerek konum olarak merkezi yerleşim yerlerine olan uzaklığı gerekse de coğrafi olarak yapılan araştırmalarda bu yapıların göz ardı edilmiş olmaları gölün kısmen bakir veya yeterince çalışılmamış bir yer olarak kalmasını sağlamıştır. Ward ve arkadaşlarının (2017) çalışmalarında ki şekiller ile büyük benzerlik gösteren göl ve çevresindeki oluşumlar araştırmaya değer bulunmuş ve çalışmaya başlanmıştır. Bu çalışmada tespit edilen izolatlar Otlukbeli Gölü ve çevresindeki oluşumlardan alınarak saflaştırılmıştır. Göl ve çevresinde gözlemlenen yapılardaki değişimler, kırmızı ve sarı renkteki toprak ve çamur görünüşleri, traverten oluşumları, sulardaki tat değişiklikleri ve alanda bulunan gaz çıkışları dikkat çekici bulunmuş ve örnekler alınarak bakterilerin izolasyonu, saflaştırılması ve tanılanması amaçlanmıştır (Ward *et al.* 2017).

Bu amaçla göl ve çevresindeki yapılardan örnekler alınmış değişik yapıların oluşumuna katkıda bulunduğu düşünülen organizmaların tanılanmaları hedeflenmiştir. Gerek traverten oluşumlar gerekse de kalsifiye ve kalkerli yapıların varlığı nedeniyle CaCO_3 çözme ve çöktürmeyle çalışmaya başlanılmıştır.

Dünyada yaygın bulunması nedeniyle CaCO_3 , küresel CO_2 döğüsünün de içinde bulunduğu birçok jeokimyasal döngü büyük oranda bu mineralin çözünme ve çökmesiyle ilgilidir. Bu nedenle CaCO_3 çözünürlüğü kapsamlı bir şekilde araştırmalara konu olmuştur. Bu araştırmalara rağmen CaCO_3 çözünme oranında ortak bir değer

bulunamamıştır. Bunun nedeni mineralin kimyasal yapısında ve hidrodinamik ölçüm koşullarındaki değişkenliklerdir (Ölçüm yapılan cihazlar, akışkanlık hızı, doygunluk derecesi, iyonik oran, atmosfer basıncı, tane büyüklüğü vs.) (Morse *et al.* 2007). CaCO_3 biyomineralizasyon ve jeolojik bilimler açısından ilgi çekici bulunmuş ve araştırmalara konu olmuştur. Bunun başlıca sebebi CaCO_3 çözünmesi sonucu açığa çıkan CO_2 'in sucul alanlarda, suda, biyosferin diğer bölümlerinde ise atmosferde ve yeryüzünde iklimsel anlamda yapmış olduğu değişimlerdir. Diğer taraftan günlük hayata baktığımızda da endüstriyel ve teknolojik olarak ta CaCO_3 oluşumu veya çözünmesi etkindir. Buna bir örnek verecek olursak elektronik ısıtma ve soğutma cihazlarında meydana gelebilecek CaCO_3 oluşumları (Örneğin çamaşır makinelerinde oluşan kireçlenmeler) gerek verimliliği düşürerek gerekse de arızalara neden olarak ekonomik anlamda ciddi zararlar verebilmektedir (Gebauer 2008). Endüstrinin birçok alanında, nükleer atıkların kaplanarak depolanması ve portland çimentonun hazırlanması gibi karbonat içeren malzemelerde CaCO_3 'a dayanan bilgi vardır. Bütün bu nedenlerden dolayı çözünürlüğü en çok incelenen CaCO_3 mineralleridir (Arvidson *et al.* 2003).

Boquet *et al.* (1973) ve Rivedeneyra *et al.* (1994) gibi araştırmacılara göre ise CaCO_3 oluşturabilen ve çözebilen bakteriler özel bir konumdadır. Bu çalışmaya konu olan bölgedeki traverten oluşumları ve kalkerli yapılar CaCO_3 açısından değerlendirilebilecek ortamlar olduğundan seçilmiş ve gerek CaCO_3 oluşumu gerekse de çözünmesi açısından araştırılmıştır. Çünkü bakteriler hücre duvarı bileşenleri ve substratlardaki moleküler etkileşimler ile spesifik özellikler gösterebilirler. Bu özellikleri sayesinde belirli bir mineral yüzeye afinite göstererek bağlanabilirler ve silikatlar, oksitler, sülfidler ve karbonatlar gibi mineraller oluşturabilirler. Bu mineraller üzerine birçok araştırma yapılmıştır. Bu araştırmaların tamamında aynı bakteri suşu kullanılmış ve yüzey tanımları araştırılmıştır. *Shewanella oneidensis* MR-1, silikat ve oksit mineral yüzeylerini tanıyabilme özelliğine sahiptir ve bununla birlikte yüzeydeki spesifik yüksek enerji alanlarını da tanıdığı bulunmuştur. Bakteriler bu spesifik yüzeylere olan afiniteleri nedeniyle bağlanma reaksiyonu gösterirler ve bu alanlarda bir biyofilm tabakası oluştururlar. Bu tabakanın oluşmasıyla birlikte mineral yüzeyde çözünmeyi indükleyebilirler. Bu çalışmada da göl çevresinde değişik yoğunluklarda

biyofilm tabakalarının varlığı (Şekil 2.15) dikkat çekici bulunmuş ve çalışmaya değer görülmüştür (Busscher and Weerkamp 1987; Lower *et al.* 2000; Luttge and Conrad 2004; Lower 2005; Gambari 2011).

Araştırmamız için göl çevresindeki kalkerli yapılardan ve traverten oluşumlarından alınan numuneler önce genel besiyerinde üretilerek saflaştırılmış daha sonra Maya eksraktı 5 g, Glukoz 5 g, CaCO_3 6 g, Agar 9 g, 500 mL saf sudan oluşan (Orhan *et al.* 2017) besiyerinde spesifik olarak CaCO_3 çözebilen izolatlar ayrıştırılmıştır. 76 izolat içerisinde iyi derecede ve kısa zamanda çözme gerçekleştiren izolatlar çizelge 11 de verilmiştir. Buna göre alındığı yer kodlarına bakıldığında kaynaktan uzak çamur, göl ve gölü besleyen sularda çözme reaksiyonu gösteren bakteri varlığı tespit edilmiştir. 12 olarak kodlanan traverten oluşumu sağlayan sudan alınan örnekten elde edilen izolatın daha erken çözme reaksiyonu gösterdiği gözlemlenmiştir.

Çizelge 5.1. CaCO_3 çözme reaksiyonu gösteren izolatlar

İzolatın Kodu	Kalsiyum Karbonat (CaCO_3) Çözme	Gün	Alındığı Yerin Kodu
3-4	+++	3.gün	3
6-21	+ G	14.gün	6
7-1	+++	3.gün	7
10-12	+++	3.gün	10
12-1	+++	2.gün	12

+ Zayıf çözme

+++ İyi derecede çözme

++

Orta düzey çözme

G

Geç çözme

Kalsiyum karbonat (CaCO_3), yer kabuğunun yaklaşık % 4'ünü oluşturan bol bulunan bir mineraldir. İnorganik bir mineral olan CaCO_3 hem endüstriyel uygulamalarda hem de çoğunlukla gelişim düzeyinde canlı organizmalar tarafından yaygın olarak kullanılır. Atmosferdeki karbondioksit dengesi mineralize CaCO_3 ve atmosferik karbondioksit arasındaki döngüyle kısmen kontrol edilir. Sulu çözeltilerden katı CaCO_3 oluşumu veya kalsiyum ve karbondioksit (CO_2) içeren bileşikler ekolojik, jeokimyasal ve biyolojik alanlarda ciddi bir öneme sahiptirler. Ayrıca, toz haline getirilmiş CaCO_3 'a olan talep son zamanlarda endüstrinin çeşitli alanlarında artmıştır (Kâğıt, boya, manyetik kayıt, tekstil, deterjan, yapıştırıcı, plastik, kozmetik, gıda vb.) (Hernandez *et al.* 2007; Greer *et al.* 2017).

Biyotasarımli malzemeler doğadan esinlenilmiş bir yapıya sahip ya da doğal materyallerde bulunan özellikler taklit edilerek üretilmiş malzemelerdir. CaCO_3 günümüzde yüksek bir bilimsel ilgiye sahiptir. Doğada biyolojik olarak eklem bacaklılar ve yumuşakçaların kabuklarında bulunduğu bilinmektedir. CaCO_3 partikülleri, ayrıca çevre mühendisliğı, kimya mühendisliğı, biyomühendislik gibi farklı alanlarda kullanılabilmektedir. Bunlarla birlikte CaCO_3 su arıtma alanında da kullanışlıdır (Declet *et al.* 2016).

Prokaryotlar, tüm ana toprak tiplerinde biyokütlenin ana kısmını oluştururlar. Bakteriler, yeryüzündeki her habitatta, toprakta, asidik kaplıcalarda, radyoaktif atık sularda ve yer kabuğunun derinlerinde, organik madde ve canlı bitki ve hayvan gövdelerinde bulunurlar. Çökelme sürecinde bakterilerin birincil rolü, çeşitli fizyolojik aktivitelerle bazik bir ortam oluşturmaktır. Bazı özel fonksiyonel hücre duvarlarına sahip (Ca^{2+} ve Mg^{2+} iki değerlikli katyon bulunan) mikroorganizmalar CaCO_3 oluşumunu desteklemektedirler. Biyolojik hücre dışı polimerik maddeler içinde bulunan spesifik proteinler, farklı CaCO_3 kristallerinin oluşumuna neden olur. Örneklerin yüzeyindeki bir CaCO_3 tabakasının bakteriyel birikimi, kılcal su alımının azalmasına ve gaz geçirgenliğine neden olmuştur. Bakteri kültürü ve ortam bileşimin türü CaCO_3 kristal morfolojisi üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Mikrobiyal CaCO_3 çökmesi üre hidrolizi, fotosentez, sülfat indirgemesi gibi yaygın mikrobiyal metabolik sürecin bir yan ürünü olarak ortaya çıkar. Bu farklı metabolik süreçler alkaliniteyi (pH ve çözünmüş inorganik karbon) artırır ve orada CaCO_3 çökmesini destekler. CaCO_3 çökmesi, bakteri aleminde uygun koşullar altında genel bir işlemdir. Bazı bakteriler ve mantarlar, fotosentez, amonifikasyon, denitrifikasyon, sülfat indirgemesi ve anaerobik sülfür oksidasyonunu içeren bir dizi işlemle ekstraselüler olarak CaCO_3 'ın çökmesini indükleyebilir.

Prokaryotların metabolik aktivitesi sonucunda ortaya çıkan ürünler, toprağın farklı bileşenleri ile etkileşerek toprak özelliklerini değiştirebilir. Böylelikle toprak iyileştirme ve bazı mühendislik uygulamaları için sürdürülebilir ve çevreye duyarlı bir metodoloji olarak toprak özelliklerinin modifikasyonu için bakteri süreçleri kullanılabilir. Toprak

için en ümit verici biyojeokimyasal tedavilerden biri, toprağa CaCO_3 'ı etkili bir şekilde veren mikrobiyal-indüklü CaCO_3 çöktürmesidir (Böylece gücü ve sertliğini artırır ve su geçirgenliğini azaltır) (Gat *et al.* 2014).

Araştırma bölgesinde bulunan traverten ve kalkerli yapılardan alınan örneklerden yukarıda açıklanan amaçlara yönelik bakterilerin varlığının tespiti ve seçimini yapabilmek amacıyla CaCO_3 çöktürme de dâhil edilmiştir. Alınan numuneler önce genel besiyerinde üretilerek saflaştırılmış daha sonra Boquet ve çalışma arkadaşlarının (1973) ilk olarak uyguladıkları, daha sonra birçok araştırmacı tarafından da kullanılan B-4 besiyerinde kristal oluşturup oluşturmamaları ışık mikroskop altında gözlemlenmiştir. Ekimin 1., 3., 5., 7., 14., ve 28. günlerinde ışık mikroskobu altında incelenen besi yerlerinde kristalleşme gözlenen izolatlar seçilmiştir. 76 izolat içerisinde en iyi kristalleşme sağlayan izolatlar Çizelge 5.2 de verilmiştir. Kalkerli yapıların göl çevresinde yoğun olduğu şekil 3.9, 3.10, 3.11 de görülmektedir. Yine şekil 2.16 da görülen sarkıtlar CaCO_3 oluşumunu göstermektedir.

Çizelge 5.2. CaCO_3 oluşturan izolatlar

İzolatın Kodu	Kalsiyum Karbonat (CaCO_3) Oluşturma	Gün	Alındığı Yerin Kodu
3-1	+++	7.gün	3
3-2	+++	7.gün	3
3-3	+ G	28.gün	3
3-5	++	14.gün	3
3-6	+++	7.gün	3
3-7	+++	7.gün	3
3-8	+++	7.gün	3
3-11-A	+ G	28.gün	3
3-13	+++	7.gün	3
3-22	+++	7.gün	3
3-25	++	14.gün	3
3-26-A	+++	7. gün	3
4-2	+++	7.gün	4
4-9	+++	7. gün	4
3-26-A	+++	7.gün	3
4-10-B	+++	7.gün	4
6-2	++	14.gün	6
8-5	+++	7.gün	8
8-6	+++	7.gün	8
9-1	+++	7.gün	9
10-X	++	14.gün	10
10-Z	++	7. gün	10

+ Zayıf kristalleşme
+++ İyi derecede kristalleşme

++ Orta düzey kristalleşme
G Geç kristalleşme

Azot, toprakta bakteriler tarafından fikse edilerek bitkilerin alabileceği forma dönüştürülen bitki gelişiminde ve büyümesinde çok önemli fonksiyonlara sahip elementlerden birisidir. Bunun yanı sıra proteinlerin, tüm amino asitlerin ve nükleik asitlerin temel bileşenidir. Besin zincirindeki toplam azot miktarı bitki kuru maddesinin %2'sidir. Diğer taraftan atmosferin yaklaşık %80'ini oluşturan azot gazını bitkiler doğrudan kullanamazlar. Bitkiler toprakta bulunan mevcut azotu kökleri yardımıyla amonyum ve nitratlar şeklinde alırlar. Azottan bu sınırlı yararlanma nedeniyle dünya genelinde büyük bir azotlu gübre endüstrisi oluşmuştur. Atmosferdeki azot gazının bitkilerin alabileceği formlara dönüşümünde çeşitli ototrof ve heterotrof prokaryotlar rol oynar. Azot fiksasyonunda rol oynayan bu bakteri türleri oldukça önem arz etmektedir. Çünkü bu bakteriler ekosistemlerde sürdürülebilirlik ve biyojeokimyasal döngüye çok önemli katkı sağlarlar. Aynı zamanda azotlu gübrelerin bir çoğu fosil yakıtlardan elde edilen ürünlerdir. Bu da son derece pahalı bir yöntemdir. Ek olarak endüstriyel olarak elde edilen bu azotlu gübrelerin %30 ile 50'si toprak altı sularına karışarak kirliliğe neden olmaktadır. Bütün bu nedenlerden dolayı endüstriyel azotlu gübrelere alternatif olarak bakteriler tarafından sentezlenen nitrojenaz enzimi azot fiksasyonu açısından önemli bir alternatiftir. (Howarth *et al.* 1988; Dobermann 2007; Westhoff 2009; Figueiredo *et al.* 2013; de Bruijn 2016).

Buradan hareket ederek bu çalışmada izolatlardan azot fiksasyonunda önemli olabilecek bakterilerin tanımlanması ve karakterizasyonunu bu çalışmaya dahil edilmiştir. Elde edilen izolatlar genel besiyerlerinde ürettildikten sonra azot fiksasyonunda etkin olan bakterilerin ayrıştırılması amacıyla spesifik bir besi yeri olan NFM besiyeri kullanılmıştır. (Okon *et al.* 1977; Mehnaz *et al.* 2007; Rafique *et al.* 2015). 76 izolat içerisinde azot fiksasyonunda etkin olan izolatlar seçilmiş ve Çizelge 5.3 de verilmiştir. Gaz çıkışı ve kırmızı çamur bölgelerinden elde edilen izolatlarda daha güçlü pozitiflik gözlemlendiği çizelgeden de anlaşılmaktadır.

Çizelge 5.3. Azot fiksasyonunda etkin izolatlar

İzolatın Kodu	İzolatın Azot (N) Fiksasyonundaki Etkinliği	Alındığı Yerin Kodu	İzolatın Kodu	İzolatın Azot (N) Fiksasyonundaki Etkinliği	Alındığı Yerin Kodu
3-1	+	3	4-8	+	4
3-3	+	3	4-9	++++	4
3-8	+	3	6-2	+++	6
3-9	+	3	6-8	+	6
3-13	+	3	7-1	+	7
3-20	++	3	8-2	+	8
3-21	+	3	8-3	+	8
3-22	+++	3	8-4	+	8
3-23	+++	3	8-6	+++	8
3-26-A	+	3	8-7	+	8
3-26-B	+	3	9-3	+	9
4-1	+	4	10-7	+	10
4-3	+	4	10-9	+	10
4-7	+++	4	10-X	+	10
10-Y	+	10	12-3	+	12
10-Z	+	10	12-6	+	12

+ (Zayıf gelişim)

++

(Orta düzey gelişim)

+++ (İyi derecede gelişim)

++++ (Çok iyi derecede gelişim)

Toprak verimliliğinin artırılması tarımsal ekonomide en çok kullanılan yöntemlerden birisidir. Bitkilerin büyümesi ve gelişmesi açısından en önemli makro besin elementlerinden biriside fosfordur. Fosfat genel olarak çözünebilir ve çözünmez olarak iki kısımda ele alınır. Çözünebilir fosfat toprağa uygulandığında mevcut olmayan formlara sabitlenir ve kullanımı düşer. Çoğunlukla kalsiyum, demir ve alüminyumla (Al) kimyasal kompleksler oluşturur. Bu nedenle toprak yapısı genelde bitkilerin kullanabileceği fosfor açısından fakirdir. Ortalama topraktaki fosfat içeriği yaklaşık %0,05 olmakla birlikte bitkiler bunun yalnızca %0,1'ini kullanabilmektedir. Bir başka deyişle mevcut fosfatın %95 kadarı doğrudan kullanım için uygun değildir. Bu nedenle fosfat eksikliği bitki büyümesini sınırlayan en önemli faktörlerden birisi haline gelmiştir. Topraktaki fosfat eksikliği endüstriyel gübreler ile çözülebiliyor olsa da endüstriyel gübrelerin tamamı toprakta tam olarak çözünemeyebilmekte ve azotta olduğu gibi bunda da çevresel sorunlar çok önemli bir boyuta gelmektedir. Yine bununla birlikte ekonomik anlamda maliyetlerinin yüksekliği nedeniyle alternatif yollar kaçınılmaz olmuştur. Bazı mikroorganizmaların çözünmeyen fosfatın çözünürlüğünde rol oynadıkları bilinmektedir. Bu fosfat çözücü mikroorganizmalar fosfatı asitleme, şelatlama ve çeşitli değişim reaksiyonlarıyla çözünebilir hale getirebilmektedir.

Böylelikle sanayi ürünlerindeki yüksek maliyetin düşürülmesinin yanı sıra önemli bir kirliliğin de önüne geçilmiş olunur. Bu sebeple uzun bir süreden beri mikrobiyologlar ve ekolojistler *Pseudomonas*, *Bacillus* ve *Enterobacter* gibi bakteri türleri ve bazı mantarlar ile fosfat çözünürlüğünü artırmaya çalışmışlardır. Bilindiği gibi torak biyoçeşitliliği karmaşık molekül metabolizmalarında önemli rol oynar ve bitki beslenmesini destekler. Tarımsal üretim açısından yeni genler, biyokimyasal yollar, antibiyotikler, metabolitler ve diğer birçok yararlı molekülleri ortaya çıkarır. Fosfat çözücü mikroorganizmalarda bu nedenlerden ötürü bitki üreticilerinin bitki büyüme ve verimliliği artırma açısından dikkatini çekmiştir. Fosfat çözücü bakteriler döngüye aktif olarak katılır ve topraktan fosfat alınımını artırır (Son *et al.* 2006; Selvi *et al.* 2011; Mardad *et al.* 2013).

Fosfat çözünürlüğü ile ilgili olabilecek bakterilerin elde edilmesi amacıyla genel besiyerlerinde çoğaltılan bakteriler daha sonra Pikovskaya besiyerine (Rao 1977) alınarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan 76 izolat içerisinde inorganik fosfat çözünürlüğünde pozitiflik gösteren 14 izolat seçilmiş ve Çizelge 5.4'te verilmiştir.

Çizelge 5.4. İnorganik fosfat çözünürlüğünde etkin olan izolatlar

İzolatin Kodu	İzolatin Fosfat (P) Çözünürlüğü Etkinliği	Alındığı Yerin Kodu
3-4	+++	3
3-9	+++	3
3-20	+++	3
3-21	+	3
3-23	+	3
3-26-A	+++	3
4-9	+++	4
6-2	+++	6
7-1	+	7
8-2	++++	8
9-3	+++	9
10-7	++++	10
10-13	+++	10
10-Z	++++	10

+ Zayıf çözünürlük

+++ İyi derecede çözünürlük

++ Orta düzey çözünürlük

++++ Çok iyi derecede çözünürlük

Gerek bitkiler gereksede hayvanlar açısından iz element boyutunda olsa da gerekli besin elementlerinden biri olan demir yer yüzünde ağırlıkça en çok bulunan ve litosferde metal olarak alüminyumdan sonra ikinci olarak en çok bulunan elementtir. Makro canlılarda iz element boyutunda iken *Lactobacillus spp.* ve Manyetotaktik bakteriler gibi mikroorganizmalarda tipik bakterilere göre hücresel demir içeriği 11,5 kat daha fazladır. Oksitler, karbonatlar, silikatlar ve sülfidler olarak görülmektedir. Hangi görülme şeklinde olursa olsun demirin canlı tarafından alınması bulunduğu formuyla mümkün değildir. Bu nedenle doğada bulunan +2 formulu demirin +3 formuna oksitlenmesi ve canlı tarafından alınıp kullanılabilir forma dönüştürülmesi gerekmektedir. Demirdeki bu oksitlenme reaksiyonu için doğa yine bakterileri kullanmaktadır. Demir oksidasyonunda etkin olan bakteriler ise Ehrenberg ve Winogradsky gibi mikrobiyologlar tarafından 19. yüzyılda gözlenip kaydedilen prokaryotlardandır. Önceleri Fe II'nin oksidasyonunu Fe III'e katalizleyen bakteriler olarak kabul edilmiş sonrasında ise ferrik demiri ferröz demire indirgeyiciler olarak genişletilmiştir. Sonraki yıllarda ise sadece endüstriyel uygulamalar ve demir döngüsü açısından değil özellikle biyokimyasal açıdan dikkate alınarak önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir. Demir oksidasyonunu katalizleyen bakteriler genel olarak dört fizyolojik grupta toplanırlar.

1. Asidofilik aerobik demir oksitleyiciler
2. Nötrofilik aerobik demir oksitleyiciler
3. Nötrofilik anaerobik demir oksitleyiciler
4. Anaerobik fotosentetik demir oksitleyiciler.

Bitkiler ve bitkiler vasıtasıyla hayvanlar demiri almak için siderofor denilen ajanları kullanırlar. Siderofor Yunanca demir taşıyıcı anlamına gelmektedir. Bu ajanların rolü aslında demiri bulunduğu çevreden uzaklaştırmak ve mikrobiyal hücre için sürekli gerekli minerali oluşturmaktır. Yapılan araştırmalarda aerobik ve fakültatif aerobik mikroorganizmaların en az bir sideroforu sentezlediği keşfedilmiştir (Neilands 1995; Erbs and Spain 2002; Weber *et al.* 2006; Valdes *et al.* 2008; Hedrich *et al.* 2011; Bonnefoy and Holmes 2012; Ward *et al.* 2017).



Şekil 5.1. 4-1, 3-3, 10-7 ve 4-9 olarak kodlanan izolatlardaki sarı renge dönüşme demir oksidasyonunu göstermektedir.

Biyojeokimyasal döngüler ele alınırken demirle birlikte kükürt elementi de genellikle birlikte çalışılır. Bunun nedeni doğada demir ve kükürtün, demirsülfür şeklinde (FeS) çok yaygın olarak bileşik oluşturmasıdır. Tarımsal ve toprak açısından bakıldığında ise kükürt, azot, fosfat ve potasyumdan sonra dördüncü temel besin maddesi olarak kabul edilmektedir. Sistein ve Metiyonin gibi esansiyel amino asitlerin bileşenlerinden biridir ve proteinlerin, vitaminlerin ve enzimlerin oluşumunda önemli bir rol oynar. Kükürt, kireçli ve alkali toprakların pH'ını azaltan ve bazı besin maddelerinin emilimini kolaylaştıran bir toprak asitlendiricidir. Sülfür ayrıca topraktaki sodyum durumunu iyileştirir ve bazı bitki patojenlerini kontrol eder. (Kertesz *et al.* 2004). Kükürt indirgenmiş formlarda yüksek reaktivite gösterir ve birkaç kararlı oksidasyon durumunda ortaya çıkar. Doğadaki kükürtün büyük bir kısmı su ve toprakta sülfat veya sülfür ve atmosferdeki kükürt dioksit şeklinde bulunur. Sülfat organik bileşiklerde indirgenmiş olarak bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından kükürt kaynağı olarak

kullanılır. Canlılarda kükürt en indirgenmiş hallerde bulunur. (Örneğin Sistein aminoasidinde Sülfid olarak) Kükürt ilk aşamada aerobik koşullarda oksitlenir ve sülfat olarak salınır. Anaerobik şartlarda ise sülfat, hidrojen sülfid olarak açığa çıkar. Hidrojen sülfid, sülfat indirgeyici bazı bakterilerin organik bileşiklerin ve moleküler hidrojen oksidasyonu sonucu sülfat indirgemesiyle de ortaya çıkmaktadır. Bazı sülfat tipleri demirsülfür olarak çökelir ve pirit oluşur. Ancak bu daha sonra elemental kükürt yoluyla tekrar oksitlenir. Bu, sülfidi bir elektron vericisi olarak kullanan fototrofik bakteriler tarafından anaerobik koşullarda ve ışık altında gerçekleşir. Bu yolla açığa çıkan elektronlar organik bileşiklere dönüştürülmüş olur. Kükürt bakterileri indirgenmiş ya da kısmen oksitlenmiş inorganik sülfür bileşiklerini yüksek oranda oksitleyebilme kabiliyetindedirler. *Thiobacillus* toprakta kükürt oksidasyonunda önemli rol oynar ve toprak verimliliğini artırır. Oksidasyon sonucunda bitkilerin kullanabileceği sülfat oluşumu gerçekleşirken açığa çıkan asit besin maddelerinin çözünmesinde ve toprağın alkaliliğinin düzelmesinde önemli rol oynar. Yapılan araştırmalarda *Acidithiobacillus*, *Thiomicrospira* ve *Thiosphaera* gibi Gram negatiflerin yanı sıra *Paracoccus*, *Xanthobacter*, *Alcaligenes* gibi heterotroflar, *Thiobacillus thiooxidans*, *T. ferrooxidans*, *T. thioparus* ve *T. denitrificans* zorunlu kemoototroflar izole edilmiştir. Kükürt asimilasyon metabolizması sadece prokaryotlarda görülmez. Aynı zamanda bitkiler, algler ve mantarlarda da görülür. İnorganik sülfür bileşiklerinin oksidasyonunda rol oynayan çok çeşitli mantar cinsleri de bulunmuştur. (*Absidia*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Amanita*, *Aspergillus*) (Kuenen *et al.* 1985; Middelburg 2000; Rawlings 2005; Priyanka *et al.* 2014; Dahl 2017; Xu *et al.* 2018).

Yapılan araştırmalardan yola çıkarak demirsülfür bileşiklerinin doğada sık görülen bir bileşik olduğu kanaatine varıldı. Araştırma bölgemizde bulunan yapılardan dolayı demir oksidasyonu sağlayan bakterilerin varlığı olasılığı, dolayısıyla kükürt indirgeyici bakterilerin de birlikte olabileceklerini düşündürdüğünden kükürt indirgenmesi de araştırma konuları içerisine alınmıştır. Çalışmamız sonucunda kükürt indirgenmesinde etkin olduğunu düşündüğümüz saflaştırılan izolatlar içerisinde pozitiflik gösteren izolatlar seçilmiş ve Çizelge 5.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 5.6. Kükürt fiksasyonunda etkin izolatlar

İzolatin Kodu	İzolatin Kükürt (S) Fiksasyonundaki Etkinliği	Alındığı Yerin Kodu
3-4	+++	3
3-9	+++	3
3-20	+++	3
3-21	+	3
3-23	+	3
3-26-A	+++	3
4-9	+++	4
6-2	+++	6
7-1	+	7
8-2	++++	8
9-3	+++	9
10-7	++++	10
10-13	+++	10
10-Z	++++	10

+ (Zayıf fiksasyon) ++ (Orta düzey fiksasyon)
 +++ (İyi derecede fiksasyon) ++++ (Çok iyi derecede fiksasyon)

Yapılan araştırmalar göstermiştir ki mikroorganizmaların doğadaki rolleri sadece ayrıştırma değildir. Mikroorganizmalar elementlerin canlılar tarafından alınabilmesi ve kullanılabilir formda dönüştürülmesinde ve ekosistemdeki biyojeokimyasal döngülerde önemli roller oynamaktadırlar. Bu önemli görevlerde rol oynayan bakteriler değerlendirilen makaleler ve incelenen araştırmalarda gözlemlenmiştir. Bu mikroorganizmalardan bazıları şu şekildedir: *Acidithiobacillus sp.*, *Leptospirillum sp.*, *Thiobacillus sp.*, *Azotobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Chromatiaceae* and *Ectothiorhodospiraceae*, *Lactobacillus spp.* (Kuenen *et al.* 1985; Erbs and Spain 2002; Luttge and Conrad 2004; Lower 2005; Rawlings 2005; Chahal *et al.* 2011; Gambari 2011; Hedrich *et al.* 2011; Bonnefoy and Holmes 2012; Gat *et al.* 2014; Priyanka 2014; de Bruijn 2016; Dahl 2017).

Toprak bakterileri toprak ekolojisinin şekillenmesinde merkezdedirler. Topraktaki mikroorganizma mevcudiyeti, yoğunluğu ve çeşitliliği toprak besin maddelerinin ayrışması, döngüsü ve dolayısıyla bitki gelişimini doğrudan etkilemektedir. Toprak içerisindeki bakteri çeşitliliği ve fonksiyonları toprakta çeşitli etkileşimlere neden olurlar. Bir çok bakteri türü toprakta varlıklarını sürdürebilmek için çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Spor veya kapsül oluşturma, antibiyotik direnci geliştirme, bir biyofilm tabakası oluşturma bu mekanizmalardan bazılarıdır (Rosenberg

et al. 2016). Toprak bakterileri bir taraftan varlıklarını sürdürebilmek için çeşitli mekanizmalar geliştirirken diğer taraftan da büyüme, gelişme ve çoğalmaları, mikrobiyal popülasyonun yapısı ve etkinliği ile toprak yapısıyla da doğrudan ilişkilidir. Bu yapı içerisinde mikroorganizmalar beslenir, canlanır, diğer organizma ve canlılarla rekabet eder, işbirliği yapar ve yakın çevredeki değişikliklere karşı tepkiler verirler (Balser *et al.* 2010). Bitki kökleri ile ilişkilendirilen ve bitki büyümesi üzerine önemli etkiye sahip olan bakteriler rizobakteriler olarak adlandırılır. Bu tür bakteriler nitrojeni bitkinin alabileceği şekilde düzenler, hormonları ve antibiyotikleri salgılar, fosfat ve çözünemeyen demir formlarını çözerek kullanılabilir formlara dönüştürür. Birçok *Bacillus spp.* kirlenmiş topraklarda ağır metalleri tecrit ederek veya harekete geçirerek bitki toksisitesinin önüne geçer (Kayasth *et al.* 2013; Schwartz *et al.* 2013).

Yapılan izolasyonlar sonucunda çoklu pozitiflik gösteren izolatlar içerisinde 3-26-A, 4-9, 6-2, 10-7 ve 10-Z seçilerek AltıGenBio firmasına gönderilmiş ve NCBI tarafından aksesyon numaraları alınmıştır. Tanı yöntemi olarak 16s rRNA gen bölgelerinin DNA dizi analizleri kullanılmıştır. Çıkan sonuçlar *Bacillus megaterium*, *B. simplex*, *B. atropheus*, *Solibacillus silvestris* ve *B. licheniformis* hakkında araştırmalar yapılmış araştırma bölgemizle benzerlik ve farklılıklar karşılaştırılmıştır.

Elde edilen türler tek tek ele alınacak olursa:

Bacillus megaterium 1884'te De Bary tarafından *Escherichia coli*'nin yaklaşık 100 katı büyüklüğünde olması sebebiyle büyük hayvan veya büyük canavar olarak tanımlamıştır (De Bary 1884). *B. megaterium*, 4µm boyunda ve 1,5µm çapında olup topraktan deniz suyuna, baldan çeşitli bitkilere kadar canlı ve cansız birçok ortamdan izole edilebilen Gram pozitif, esas olarak aerobik spor oluşturan bir bakteridir. Bugün bilinen tüm basil türlerinin en büyüğüdür. Hücre yapısı nedeniyle protein lokalizasyonu, sporulasyon ve membran çalışmaları için ideal bir bakteridir (Vary 1994; Vary *et al.* 2007; Bunk *et al.* 2010). *B. megaterium* gübre endüstrisinde oluşan ve çevre kirliliğine yol açan fosfojipsin ayrıştırılmasında önemli rol oynamaktadır. Fosfojips fosforik asidin bir yan ürünüdür ve yüksek oranlarda demir, bakır, çinko, manganez, kobalt, nikel ve krom gibi

ağır metaller içermektedir. Yüksek konsantrasyonlarda bu metaller tüm organizmalar için toksik etki gösterirler. Bu metallerin ortamdaki uzaklaştırılması ya da toksik etkilerinin azaltılmasında bakteriler özellikle de *B. megaterium* kullanılmaktadır. *B. megaterium* ağır metallerin biyoremediasyonunda ve biyojeokimyasal döngülerde önemli rol oynar. Normal metabolik süreçlerini kullanan bakteriler organik ve inorganik asitler, yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonları ile kompleks ağır metallerin mobilizasyonuna aktif olarak katılırlar. Yukarıda bahsedilen ağır metallerin varlığında *B. megaterium*'un büyüme sporu geliştirdiğini ve bu bakterinin ürettiği hücre dışı proteinlerde ve hücre biyokütlesinde önemli bir artış olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte bu metallerin varlığında bu bakterinin gelişme gösterdiği ve fosfor oranını azalttığı görülmüştür (Bunk *et al.* 2010; Stefanescu 2015). *B. megaterium* bir başka özelliği ise endofit oluşudur (Bitki içerisinde yaşamasına rağmen bitkiye zarar vermeyen aksine faydası olabilen bakteri veya mantar türlerine verilen genel ad). Bu nedenle bitki hastalıklarının biyokontrolü için potansiyel bir araçtır. Azot fiksasyonu açısından da bazı *Megaterium* suşları tespit edilmiştir. *B. megaterium* alkali topraklarda toprak asitliğini artırarak ve çözünemeyen fosfat formlarını çözerek organik asit ve CO₂ üreterek bitki gelişiminde önemli rol oynar. Bu bakteriye özgü bakteriyofajların varlığı tespit edilmiş ve fosfat çözünürlüğünde etkinliğinin olduğu vurgulanmıştır (Elmaghraby *et al.* 2015). Bununla birlikte yapılan bazı araştırmalarda *B. megaterium*'un azot fiksasyonunda da etkin olduğu, nitrifikasyon açısından ümit vaat edici olduğu ve bu suşun atmosferik nitrojeni sabitleyebilme özelliğinde olduğu vurgulanmıştır (Peela *et al.* 2015).

Biyomineralizasyon, canlı organizmalar tarafında inorganik mineral benzeri materyallerin sentezlenmesi sürecidir. CaCO₃ çökmesi ekstraselüler bakteriyel biyomineralizasyonun iyi bir örneğidir. CaCO₃ bakteriyel mineralizasyonu, metallerle kirlenmiş toprak ve yer altı sularının temizlenmesi, atmosferik CO₂ ekstraksiyonu, toprak ve kumun güçlendirilmesi, eski kireç taşı bina ve taş anıtların onarımı, çimento harcı ve betonlarda oluşabilecek gözenek ve çatlaklardan geçirgenliğin azaltılması, betonun dondurulması ve kül tuğlalarının güçlendirilmesi uygulamalarında kullanılan bir yöntemdir (Dhami *et al.* 2013). Doğal yaşam alanlarından alınan bakterilerin

birçoğunun hem doğal hem de laboratuvar ortamlarında CaCO_3 çökmesini indükledikleri rapor edilmiştir. Mikrobiyolojik olarak uyarılan CaCO_3 çökmesi, organizmalar tarafından üreaz enzimi aktivitesini içeren yeni bir olgudur. Üreaz nikel bağımlı bir enzimdir. Üreaz hidrolize edebilen bakteriler CO_2 ve amonyak varlığında ortam pH'sını artırarak CaCO_3 çökmesini hızlandırırlar. Bu sayede CaCO_3 çökmesiyle yukarda sıralanan olaylar gerçekleşebilmektedir. Tüm bu çalışmalar göstermiştir ki *B. megaterium*'un üreaz enzim aktivitesi varlığında CaCO_3 çöktürmesi pozitifdir (Erbs and Spain 2002; Dhami *et al.* 2013; Chaurasia *et al.* 2014).

Bacillus simplex ilk olarak 1901 yılında Meyer ve Gottheil tarafından tanımlanmıştır. Bu bakteri, özellikle toprakta bulunan çevresel bir mikroorganizmadır. Bugüne kadar insanlarda bulunmamıştır (Croce *et al.* 2014). *Bacillus* türleri toprak iyileştirme ve düzenlemede önem arz eden Rizobakterilerin önemli üyelerindendir. Fosfat çözündürmede de *Bacillus* türleri organik asit üretimi ile pH değişiklikleri yaparak önemli etkilerde bulunmaktadır. En iyi fosfat çözücüler için yapılan araştırmalarda indol-3-asetik asit (IAA) üretebilen türlerden birinin de *B. simplex* olduğu vurgulanmıştır. IAA toprakta *B. simplex* tarafından üretilen bir organik asit olup kök ve gövde büyümesinde önemli bir etkidir. Fosfor bitkilerin büyüme ve birçok metabolik işlevini yerine getirmede temel bir makro besin elementidir. Toprakta yeterince fosfor olduğu halde bitkiler bunun küçük bir miktarına erişebilmektedir. Mikroorganizmaların fosfatı çözebilme kabiliyeti bitkiler açısından önemli bir durumdur. Çünkü bitkiler çözünebilir durumdaki fosfatı kullanabilmektedir. Yapılan araştırmalar *B. simplex*'in fosfor açısından siderofor etkiye sahip ve fosfat çözündürücü etkiye sahip bir *Bacillus* türü olduğunu göstermiştir. (Kaplan *et al.* 2013; Bahadır *et al.* 2018). Eski anıtlarda yapılan taş araştırmalarında *B. simplex*'in CaCO_3 çöktürmede etkin olduğunu göstermiştir. Bu sayede yüzey veya derinlerde oluşabilecek çatlakların doldurulabileceği öngörülmüştür. CaCO_3 ile ilişkili yer altı suları, kaya ve toprak izolatlarında da CaCO_3 , magnezyum kalsit (MgCO_3) ve vaterit oluşturduğu gösterilmiştir. Kontrol çalışmalarında ise abiyotiklerin mineral oluşturmada başarısız olduğu ve biyolojik izolatların %90 üzerinde CaCO_3 oluşturabildikleri vurgulanmıştır (Xia *et al.* 2015; Meier *et al.* 2017). Başka bir araştırmada ise *B. simplex*'in Bakır (Cu),

Çinko (Zn), Nikel (Ni), Krom (Cr) ve Civa (Hg) metallerine karşı dirençli olduğunu göstermiştir (Kacar 2014).

Bakteriler sporlaşarak olumsuz şartlarda hayatta kalma konusunda oldukça yetenekli canlılardır. *B. anthrophaeus* türü de endospor yapan Gram pozitif fakültatif anaerobik bir basildir. Şekli gelişme durumlarına göre değişiklik göstermekle birlikte vejetatif durumda 0,5µm ile 1µm çapında ve 2 - 4µm boyundadır. Çok dayanıklı spor oluşturma kabiliyetinden ötürü sterilizasyonlarda temizlik ve dezenfeksiyon ajanlarının değerlendirilmesinde, içme sularının arıtmalarında bu basil türü biyolojik olarak bir nevi garanti görevi görmektedir. İlk saptanmasında bir nitrojen plağı üzerinde üreme göstermiş olması azot fiksasyonu açısından önemlidir. Nitekim bu basil azot döngüsünde ve bitki gelişiminde önemli bir yere sahip olan *Rhizobium* bakterileri grubundan sayılmış ve azot fiksasyonunda etkin olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte inorganik fosfat çözünürlüğünde de etkin olduğu tespit edilmiştir. İnorganik fosfat çözünürlüğü organik asit üretimiyle gerçekleşen bir reaksiyondur. Dört aşamada gerçekleşen bu olayın basamaklarını şöyle sıralamak mümkündür: i) pH' düşürmek, ii) P ile yarışma, iii) P'a bağlanan katyonların şelasyonunu artırmak, iv) bu sayede çözünemeyen P ile ilişkili Ca, Al, Fe gibi metal iyonlarıyla kompleksler oluşturup inorganik fosfatı serbest bırakmak. Ortamın pH değerindeki düşürülmesi, sitoplazmik zarın dış yüzünde meydana gelen doğrudan oksidasyon yoluyla P çözebilen mikroorganizmalar tarafından organik asitlerin salınımını gösterir. Bu organik asitler P çözünürlüğünde etkin olan mikroorganizmaların oksidatif solunum veya fermentasyon ürünleridir. İnorganik fosfat çözücü bakteriler birçok karasal bitkinin rizosferinden izole edilmiştir. Bu bakteriler tek başlarına inoküle edildiklerinde topraktaki fosfat miktarını artırabilmektedirler. Yapılan araştırmalar *B. anthrophaeus*'un inorganik fosfat çözünürlüğünde etkin olduğunu ve Bakır (Cu), Çinko (Zn), Nikel (Ni), Krom (Cr) ve Civa (Hg) metallerine karşı dirençli olduğunu göstermiştir (Vazquez *et al.* 2000; Melnik *et al.* 2007; Sella *et al.* 2009; Sharma *et al.* 2013; Kacar 2014). Bununla birlikte *B. anthrophaeus*'un CaCO₃ oluşturabildiği yönünde araştırmalar mevcuttur ve CaCO₃ oluşturma pozitif olarak tespit edilmiştir (Barış 2009).

Solibacillus silvestris Gram pozitif, çubuk şekilli, peritrikül yapıda kamçılı, yuvarlak endospor oluşturan, kesinlikle aerobik organizmadır. Yuvarlak sporlar şişmiş bir sporangiumda terminal olarak bulunur. Çubuklar, 0,9-2,0 µm boyunda ve spor çapları 0,5-0,7 µm'dir (Rheims *et al.* 1999). Daha önce Rheims ve arkadaşlarının (1999) *Bacillus* cinsinin bir üyesi olarak kabul ettikleri bu tür, çekirdek özelliklerinin incelenmesi sonucunda *Bacillus* türünün çekirdek özelliklerinden yoksun olması sebebiyle *Solibacillus silvestris* türü olarak yeniden adlandırılması önerilmiştir (Krishnamurthi *et al.* 2009).

Ağır metaller denildiğinde büyük bir element gurubu akla gelse de yaygın olarak 6g/cm³ ve 5g/cm³'ten daha yoğun olarak bulunanlar ele alınır. Düşük yoğunlukta olmaları ve toprakta uzun süre kalmaları toksisiteye neden olmaktadır. Ağır metallerin bir kısmı bitkiler için mikro besin elementi olup metabolik işlevler için eser miktarda gereklidirler. Yüksek konsantrasyonlarda alınmaları toksik etkiye neden olmaktadır. Bununla birlikte kadmiyum ve cıvanın bilinen bir metabolik işlevi yoktur. Bununla birlikte konsantrasyonları ne olursa olsun toksik etkiye sahiptirler. Toksisite açısından ağır metallerin bulundukları form da önemlidir. Çünkü bazı formlar toksik etki göstermezken bazıları göstermektedir. Ağır metaller bulundukları ortam için ciddi ve kalıcı kirleticilerdir. Toprakta temizlenmeleri uzun süreli, zahmetli ve masraflıdır (Binkley and Simpson 2003). Ağır metal kirliliği, sanayileşmeyle ilgili en acil çevresel sorunlardan biridir. Ağır metal kirliliği, kontaminasyonu ve yayılmasını önlemek, bugün önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Metabolik olarak bozulamayan ağır metallerin besin zinciri boyunca ilerlemeleri sonucu konsantrasyonları artmaktadır. Dolaylı yollardan insan ve hayvanlara ulaşan aşırı miktarlar toksisiteye, hücresel işlev bozukluklarına, uzun süren sakatlıklara ve nihayetinde ölüme neden olabilir. Endüstriyel atık sulardan ağır metallerin uzaklaştırılması genellikle kimyasal çöktürme, kimyasal oksidasyon veya indirgeme, elektrokimyasal arıtma, evaporatif geri kazanım, filtrasyon, iyon değişimi ve membran teknolojilerinden oluşan fiziko-kimyasal yöntemlerle yapılmaktadır (Hussein *et al.* 2004; Wood *et al.* 2016). Mikrobiyal yöntemler bu amaçla daha ucuz ve etkili bir alternatif olabilmektedir. Mikroorganizmalar metaller için yüksek afiniteye sahiptir. Mikrobiyal hücrelerin

yüzeyleri, çeşitli anyonik yapılarından dolayı negatif olarak yüklenir ve sonuç olarak metal katyonları bağlayabilir. Bu spesifik mikrobiyal özellik, metabolizmadan bağımsız yollar yoluyla hem canlı hem de ölü mikrobiyal hücrelerde kirleticilerin birikmesine izin verdiği için ağır metallerin kaldırılmasında öne çıkan alternatif teknolojidir. Bu amaçla birçok bakteri kullanılmaktadır. Bunlardan birisi de *S. silvestris*'tir. Bu tür kurşun (Pb) ve kadmiyum (Cd) çözünürlüğü göstermiş ve Pb ve Cd varlığında biyofilm tabakası oluşturmuştur. Bir başka çalışmada kurşun (Pb), kadmiyum (Cd), bakır (Cu), demir (Fe) ve çinko (Zn) ağır metalleri nitrat (NO_3)₂ tuzuyla güçlendirilmiş ve *S. silvestris*'in ağır metallerin uzaklaştırılmasında aktif rol oynadığı tespit edilmiştir (Tanpinar *et al.* 2015; Villegas *et al.* 2018). Yine aynı tür birçok su arıtma tesislerinde kullanılmakta ve aktif çamur oluşumlarında tespit edilmektedir. Bu durum *S. silvestris*'in metal kontaminasyonunda ayrıştırıcı bir mikroorganizma olduğunu göstermektedir (Bukhari *et al.* 2014; Sielaff *et al.* 2017).

Bacillus licheniformis, Gram pozitif ve mezofilik bir bakteridir. Optimum gelişme sıcaklığı 50°C civarında olmakla birlikte daha yüksek sıcaklıklarda da canlı kalabilmektedir. Hareketli, spor oluşturan, fakültatif anaerobik çubuk şeklinde olan *Bacillus subtilis* grubunda yer alan bir bakteridir. *Bacillus anthracis* gibi poli-D-glutamat kapsüle sahiptir. Doğada yaygın olarak bulunabilen saprofitik bir bakteri olup, tozlarla yayılan yüksek dirençli endosporları herhangi bir yerden izole edilebilmektedir (Turhanoglu ve Gur-Vural 2016). Fosfat ve manezyum varlığında daha iyi gelişme göstermektedirler (Forsberg *et al.* 1973). *B. licheniformis* tarafından üretilen hücre dışı polimerin, bir dizi metal için büyük bir afiniteye sahip olduğu bilinmektedir, örneğin: demir (Fe), bakır (Cu), kadmiyum (Cd), nikel (Ni) ve uranyum (U). Metaller, hücre dışı polimer ile kompleks oluşturur ve kolayca birikebilir. Doğada besin döngüsüne etki edecek önemli enzimleri ürettiği bilinmektedir (Binkley and Simpson 2003; Ghani *et al.* 2013). Bazı *B. licheniformis* izolatları denitrifikasyon ve fosfat çözme yeteneğine sahiptir. Saprofit organizmalar, büyüme ve metabolizma için besin olarak çeşitli nitrojen bileşiklerini kullanırlar. Genomunda kodlanan bilgiler ışığında, *B. licheniformis*'in, eksojen proteinler, peptitler, amino asitler, amonyak, nitrat ve nitritten azot elde etme yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir. *B. licheniformis*'de nitrat ve nitrit taşınımı ve

metabolizması için olan yollar, *B. subtilis*'te olduğu gibi gözlemlenmiştir. *B. subtilis*'ten farklı olarak, *B. licheniformis*, nitrik oksit redüktaz kullanmak suretiyle anaerobik solunum yeteneğine sahiptir. Bu özelliğiyle de çok benzerlik gösterdiği *B. subtilis*'ten ayrılmaktadır. Bu gözlemler, bazı *B. licheniformis* izolatlarının denitrifikasyon yeteneğine sahip olduğu belirtilen önceki bulgularla tutarlıdır. Selüloz, yeryüzündeki en bol polisakkarittir ve selülozu hidrolize eden mikroorganizmalar küresel karbon döngüsüne katkıda bulunur. Bu yönüyle de ekolojik döngüdeki önemi yatsınamaz. Su arıtma tesislerinde karbon ve azot kullanımı açısından tercih edilen bir bakteri türüdür. (Rojas *et al.* 2001; Rey *et al.* 2004; Suganthi *et al.* 2013; Pahari and Mishra 2017). *B. licheniformis* ile yapılan birkaç çalışmada ise toprağın azot ve fosfor içeriğini artırmasının yanı sıra siderefor etkiye sahip olduğu ve IAA ürettiği, bitki büyümesini teşvik edici iyi bir bakteri olduğu, bitkinin yan köklerini ve kök tüylerini olumlu yönde etkileyen oksin ürettiği, buna paralel olarak bitkinin azot ve fosfor alımında artış sağladığı tespit edilmiştir. Nitekim bu çalışmada da Pikovskaya besiyerinde fosfat çözünürlüğü açısından üreme göstermiş ve pozitif sonuç vermiştir (Sharma *et al.* 2015; Azman *et al.* 2017; Park *et al.* 2017). CaCO_3 çökmesini artırıcı yönünden yapılan çalışmalarda da *B. licheniformis* olumlu sonuçlar göstermiş harç özelliklerini iyileştirmede ve çimento esaslı malzemelerin mukavemetinin artırılmasında iyi bir aday olduğu öngörülmüştür. Uygulamaların ardından alınan çimento örneklerinde yüzeyde bir CaCO_3 tabakasının oluştuğu, gözenek ve boşlukların dolduğu belirlenmiştir (Vahabi *et al.* 2013). Daha önce de belirtildiği üzere demir toprakta bulunan ve bitkiler için gerekli bir iz element olmasına rağmen bitkilerin direk olarak yararlanamadığı bir elementtir. Demirin bitkiler tarafından alınabilmesi için sidereforlara ihtiyaç vardır. *B. licheniformis*'in bu siderofor etkiyi gösteren şelatörlerden biri olduğu tespit edilmiştir. Tüm bu çalışmaların sonucunda bu bakteri türünün fonksiyonlarının çokluğu nedeniyle iyi bir biyofertilizör olabileceği sonucuna varılabilir (Temirov *et al.* 2003; McMillan *et al.* 2010; Kayasth *et al.* 2013; Pahari and Mishra 2017).

Tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde Otlukbeli gölünden alınan örneklerden yapılan bakteri izolasyonları ile elde edilen 76 izolata, jeomikrobiyolojik bazı özelliklerin değerlendirilmesi için çeşitli uygulamalar yapılmıştır. Bu denemeler

sonucunda her uygulama için pozitif sonuçlar ayrı ayrı değerlendirilmiş ve literatürü ile kıyaslamalar yapılmıştır. Aktif izolat seçiminde ise tüm testlerde belirli oranlarda aktivite ve çoklu pozitiflik gösteren örnekler seçilerek tanılama işlemleri yapılmıştır. Toprak, çamur, su ve diğer farklı yapılardan alınan örneklerden yapılan izolatlarda doğal olarak karşılaşılabilecek türler belirlenmiştir.

Sonuç olarak; elde edilen izolatların

1. Gübre endüstrisi sonucunda ortaya çıkan atıkların mikrobiyal yöntemlerle ayrıştırılabileceği ve kirliliğin önüne geçebileceği
2. Çeşitli endüstriyel faaliyetler sonucunda açığa çıkan metallerin uzaklaştırılması ya da toksik etkilerinin azaltılabileceği
3. pH ayarlamalarına katkılarıyla toprakların iyileştirilmesi ve düzenlenmesinde kullanılabileceği
4. CaCO_3 oluşturma ile de toprak ve kumun güçlendirilmesi, eski kireç taşı bina ve taş anıtların onarımı, çimento harcı ve betonlarda oluşabilecek gözenek ve çatlaklardan geçirgenliğin azaltılması, betonun dondurulması ve kül tuğlalarının güçlendirilmesi gibi inşaat ve restorasyon sektörüne katkı sağlayabileceği
5. IAA gibi hormonların senteziyle bitki gelişimine katkıda bulunabileceği
6. Endofitik özellikleri ile bitkilere fayda sağlarken diğer taraftanda bitki hastalıklarının biyo kontrolünü sağlayabileceği
7. Azot fiksasyonu ile hem maliyetli gübre endüstrisinde maliyetlerin azaltılabileceği hem de atıkların azaltılabileceği
8. Azot, fosfor, demir, kükürt gibi bitki besin elementlerinin bitkilerin alabileceği formlara dönüştürülmesinin sağlanabileceği
9. İçme sularının arıtılmasında kullanılabileceği önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Adıgüzel, A., 2006. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi. Erzurum, 122s.
- Akkan, E. ve Tuncel, M. 1990. Bilinmeyen Bir Doğal Anıt: Otlukbeli Gölü, Coğrafya Araştırmaları, c.1, S. 2.
- Akpınar, E., 2016. Otlukbeli Gölünün Rekreasyon Potansiyeli. Akra Kültür Sanat ve Edebiyat Dergisi (S.9) s.127-134.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology. 215(3):403-410.
- Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K-H., 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological Reviews, 59(1), 143–169.
- Anand M., Gonzalez A., Guichard F., Kolasa J. and Parrott L., 2010. Ecological Systems as Complex Systems: Challenges for an Emerging Science. Diversity (2), 395-410.
- Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi No: 46, 548s.
- Arvidson, R.S., Ertan, I.E., Amonette, J.E. and Luttge, A., 2003. Variation in calcite dissolution rates: A fundamental problem. Geochimica et Cosmochimica Acta, Vol. 67, No. 9, pp. 1623–1634.
- Atalay, İ., 1982. Türkiye Jeomorfolojisine Giriş. Ege Üniversitesi Sosyal Bilimler Fakültesi Yayınları No 9, 284 s, Bornova/İzmir.
- Azman, N.A., Sijam, K., Hata, E.M., Othman, R. and Saud, H.M., 2017. Seedling Development and Growth Promotion of Rice (*Oryza sativa*) by Plant Growth Promoting Bacterial Seed Treatment. International Journal of Agriculture, Environment and Bioresearch Vol. 2, No. 06, p. 195 – 211.
- Bahadır, P.S., Liaqat, F. and Eltem, R., 2018. Plant growth promoting properties of phosphate solubilizing *Bacillus* species isolated from the Aegean Region of Turkey. Turkish Journal of Botany, 42: 183-196.
- Balser, T.C., Wixon, D., Moritz, L.K. and Lipps, L., 2010. The Microbiology of Natural Soils. Soil Microbiology and Sustainable Crop Production, Geoffrey, G.R. and Tilston, E.L. Springer Science + Business Media, London, New York, 27 – 57.
- Banks, Eric D. , Taylor, Nicholas M. , Gulley, Jason , Lubbers, Brad R. , Giarrizo, Juan G. , Bullen, Heather A. , Hoehler, Tori M. and Barton, Hazel A.(2010) 'Bacterial Calcium Carbonate Precipitation in Cave Environments: A Function of Calcium Homeostasis', Geomicrobiology Journal, 27: 5, 444 - 454.
- Barao A.L.P., 2014. Carbon, Nitrogen and Phosphorus Soil Cycle Modelling. Doktora Tezi, Instituto Superior Tecnico, Universidade Technica de Lisboa.
- Baris O., 2009. Erzurum İlindeki Mağaralarda Damla Taşı Oluşumunda Etkili Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Tanısı. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi Erzurum.
- Barker, W.W., Welch, S.A., Chu, S. and Banfield, J.F. 1998. Experimental observations of the effects of bacteria on aluminosilicate weathering. American Mineralogist, 83, 1551-1563.

- Bertoni, R., 2011. Limnology of Rivers and Lakes in Limnology, [Ed. Brij Gobal], in Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), Developed under the Auspices of the UNESCO, Eolss Publishers, Oxford, UK.
- Binkley, J. and Simpson, J.A., 2003. Heavy metals in wastewater treatment processes. Handbook of Water and Wastewater Microbiology, Ed. Duncan Mara and Nigel Horan. Academic Press An Imprint of Elsevier, London, 597 – 610.
- Bohannan, B.J.M. and Hughes, J., 2003. New approaches to analyzing microbial biodiversity data. Current Opinion in Microbiology, 6:282–287.
- Bonnefoy, V. and Holmes, D.S., 2012. Genomic insights into microbial iron oxidation and iron uptake strategies in extremely acidic environments. Environmental Microbiology, 14(7), 1597–1611.
- Boquet, E., Boronat, A. and Ramos-Cormenzana, A., 1973. Production of Calcite (Calcium Carbonate) Crystals by Soil Bacteria is a General Phenomenon. Nature, 246, 527-529.
- Boukhalfa, H. and Crumbliss, A.L. 2002. Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. BioMetals 15:325-339.
- Boyd, P.W. and Bressacş, M., 2016. Developing a Test-Bed for Robust Research Governance of Geoengineering: the Contribution of Ocean Iron Biogeochemistry. Philosophical Transactions of the Royal Society A 374: 20150299.
- Bunk, B., Schulz, A., Stammen, S., Münch, R., Warren, M.J., Rohde, M., Jahn, D. and Biedendieck, R., 2010. A short story about a big magic bug. Bioengineered Bugs 1:2, 85-91.
- Busscher, H.J. and Weerkamp, A.H., 1987. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata, FEMS Microbiology Reviews 46: 165-173.
- Campbell, C.D., Grayston, S.J. and Hirst, D.J., 1997. Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities. Journal of Microbiological Methods, 30, 33-41.
- Cardenas, E., Orellana, L.H., Konstantinidis, K.T. and Mohn, W.W., 2018. Effects Of Timber Harvesting on the Genetic Potential For Carbon and Nitrogen Cycling in Five North American Forest Ecozones. Scientific Reports, 8 (3142), 1-13.
- Chahal, N., Rajor, A. and Siddique, R., 2011. Calcium carbonate precipitation by different bacterial strains. African Journal of Biotechnology Vol. 10(42), pp. 8359-8372.
- Chaurasia, L., Verma, R.K. and Bisht, V., 2014. Microbial Carbonate Precipitation by Urease Producing Bacteria in Cementitious Materials. International Journal of Advanced Biotechnology and Research(IJBR), Vol5, Issue4, p671-679.
- Chelius, M.K. and Moore J.C., 2004. Molecular Phylogenetic Analysis of Archaea and Bacteria in Wind Cave, South Dakota. Geomicrobiology Journal, 21, 123–134.
- Ciais, P., Sabine C., Bala G., Bopp L., Brovkin V., Canadell J., Chhabra A., De Fries R., Galloway J., Heimann M., Jones C., Le Quéré C., Myneni R.B., Piao S. and Thornton P., 2013. Carbon and Other Biogeochemical Cycles. Climate Change The Physical Science Basis, Stocker, T.F., Qin D., Plattner G.K., Tignor M., Allen S.K., Boschung J., Nauels A., Xia Y., Bex V. and Midgley P.M. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, USA, 465-570.
- Ciftcioglu, N., Björklund, M., Kuorikoski, K., Bergström, K. and Kajander, E.O., 1999.

- Nanobacteria: An infectious cause for kidney stone formation. *Kidney International*, 56, 1893-1898.
- Claustre H., Antoine, D., Boehme, L., Boss, E., D'Ortenzio, F., D'Andon, O.F., Guinet, C., Gruber, N., Handegard, N.O., Hood, M., Johnson, K., Körtzinger, A., Lampitt, R., Le Traon, P.Y., Lequere, C., Lewis, M., Perry, M.J., Platt, T., Roemmich, D., Testor, P., Sathyendranath, S., Send, U., Yoder, J. 2010. Guidelines Towards an Integrated Ocean Observation System for Ecosystems and Biogeochemical Cycles. *Proceedings of OceanObs'09: Sustained Ocean Observations and Information for Society, Vol. 1*. Noordwijk, The Netherlands, European Space Agency, 593-612.
- Coenye, T. and Vandamme, P. 2003. Extracting phylogenetic information from whole-genome sequencing projects: the lactic acid bacteria as a test case. *Microbiology*, 149, 3507–3517.
- Coenye, T., Gevers, D., de Peer, Y.V., Vandamme, P. and Swings, J., 2005. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 147–167.
- Croce, O., Hugon, P., Lagier, J.C., Bibi, F., Robert, C., Azhar, E.I., Raoult, D. and Fournier, P.E., 2014. Genome sequence of *Bacillus simplex* strain P558, isolated from a human fecal sample. *Genome Announcements*, 2(6):e01241-14.
- Daffonchio, D., Borin, S., Frova, G., Manachini, P.L. and Sorlini, C., 1998. PCR Fingerprinting of Whole Genomes: the Spacers Between the 16S and 23S rRNA Genes and of Intergenic tRNA Gene Regions Reveal a Different Intraspecific Genomic variability of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis*, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 107-116.
- Dahl, C., 2017. Sulfur Metabolism in Phototrophic Bacteria. *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes*, P.C. Hallenbeck (ed.), Springer International Publishing AG, Germany, 27-66.
- Dashti, A.A., Jadaon, M.M., Abdulsamad, A.M. and Dashti H.M. 2009. Heat Treatment of Bacteria: A Simple Method of DNA Extraction for Molecular Techniques. *Kuwait Medical Journal*, 41 (2): 117-122.
- de Bruijn, F.J., 2016. “Biological Nitrogen Fixation” Book Summary. *Advances in Microbiology*, 6, 407-411.
- de Jonge V.N., 2007. Toward the application of ecological concepts in EU coastal water management. *Marine Pollution Bulletin* 55 (2007) 407–414.
- Declat, A., Reyes, E. and Suarez, O.M., 2016. Calcium Carbonate Precipitation : A Review of the Carbonate Crystallization Proces and Applications in Bioinspired Composites. *Reviews on Advanced Materials Science*, 44 : 87- 107.
- Demirağ, Z. ve Demir, İ., 2000. Genel Mikrobiyoloji Laboratuvarı. Trabzon.
- Dhami, N.K., Reddy, M.S. and Mukherjee, A., 2013. Biomineralization of Calcium Carbonate Polymorphs by the Bacterial Strains Isolated from Calcareous Sites. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(5), 707–714.
- Divine, D.V., Koç, N., Isaksson, E., Nielsen, S., Crosta, X. and Godtliobsen, F., 2010. Holocene Antarctic Climate Variability From ice and Marine Sediment Cores: Insights on Ocean–Atmosphere Interaction. *Quaternary Science Reviews* 29 – 303-312.
- Dobermann, A., 2007. Nutrient use efficiency. Measurement and management. In: Kraus, A., Isherwood, K. and Heffer, P., Eds., *Fertilizers Best Management*

- Practices. Proceeding of International fertilizer Industry Association, Brussels, Belgium, 7-9 March 2007, 1-22.
- Durocher, G.Y., Caffrey, J.M., Cescatti, A., Dossena, M., del Giorgio, P., Gaso, J.M., Montoya, J.M., Pumpanen, J., Staehr, P.A., Trimmer, M., Woodward, G., Allen, A.P., 2012. Reconciling the temperature dependence of respiration across timescales and ecosystem types. *Nature*, volume 487, pages 472–476.
- Dworkin, M. (Editor-in-Chief), Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H. and Stackebrandt, E. (Editors), 2006. *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria Third Edition*. Springer Science, 7000 p (7-volume-set), New York, USA.
- Eisen, J.A., 2000. Assessing evolutionary relationships among microbes from whole-genome analysis. *Current Opinion in Microbiology*, 3, 475-480.
- Erbs, M. and Spain, J., 2002. Microbial iron metabolism in natural environments. *Microbial Diversity*, 2002; 1-19.
- Figueiredo, M.V.B., Mergulhão, A.C.E.S., Sobral, J.K., Junior, M.A.L. and Araújo, A.S.F., 2013. Biological nitrogen fixation: importance, associated diversity, and estimates. In: N.K. Arora (ed.) *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances*, Spring India, Pp. 267-289.
- Findlay, A.J., and Kamyshny, A., 2017. Turnover Rates of Intermediate Sulfur Species (S^{2-}_x , S^0 , $S_2O^{2-}_3$, $S_4O^{2-}_6$, SO^{2-}_3) in Anoxic Freshwater and Sediments. *Frontiers in Microbiology* 8:2551.
- Forsberg, C.W., Wyrick, P.B., Ward, J.B. and Rogers, H.J., 1973. Effect of Phosphate Limitation on the Morphology and Wall Composition of *Bacillus licheniformis* and Its Phosphoglucomutase-Deficient Mutants. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, vol 113, No:2, p. 969-984.
- Gambari, F.S., 2011. Bacterially-Induced Dissolution of Calcite the Role of Bacteria in Limestone Weathering. A Thesis Submitted to McGill University in Partial Fulfillment of the Degree of Master of Science, Department of Earth & Planetary Science, McGill.
- Gastescu, P., 2009. Limnology, Lake Basins, Lake Waters. Lakes, reservoirs and ponds, Romanian Limnogeographical Association vol. 3(1): 7-12.
- Gat, D., Tsesarsky, M., Shamir, D. and Ronen, Z., 2014. Accelerated microbial-induced $CaCO_3$ precipitation in a defined coculture of ureolytic and non-ureolytic bacteria. *Biogeosciences*, 11, 2561–2569.
- Ghani, M., Ansari, A., Aman, A., Zohra, R.R., Siddiqui, N.N. and Ul Qader, S.A., 2013. Isolation and characterization of different strains of *Bacillus licheniformis* for the production of commercially significant enzymes. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol.26, No.4, pp.691-697.
- Giller, P.S. and Malmqvist B., 1998. *The Biology Of Streams and River*. Oxford University Press, 297, New York.
- Ginard, M., Lalucat, J., Tümmler, B. and Römling, U., 1997. Genome Organization of *Pseudomonas stutzeri* and Resulting Taxonomic and Evolutionary Considerations, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 132-143.
- Greer, H.F., Zhou, W. and Guo, L. 2017. Reversed Crystal Growth of Calcite in Naturally Occurring Travertine Crust. *Crystals*, 7, 36.

- Haber, W., 1994. System ecological concepts for environmental planning, in Klijn, F. (Ed.), *Ecosystem Classification for Environmental Management*, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 49-67.
- Hairston, N.G. and Fussmann, G.F., 2002. *Lake Ecosystems*. In: *Encyclopaedia of Life Sciences*, Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group.
- Hakanson, L., 2012. Lakes on Earth, Different Types. In: Bengtsson L., Herschy R.W., Fairbridge R.W. (eds) *Encyclopedia of Lakes and Reservoirs*. *Encyclopedia of Earth Sciences Series*. Springer, Dordrecht.
- Harley, J.P. and Prescott, L.M., 2002. *Laboratory exercises in microbiology*. 5th edition. McGraw-Hill Publishers, pp. 37-237.
- Harris, K.A., and Hartley, J.C., 2003. Development of broad-range 16S rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service. *Journal of Medicinal Microbiology*, 52, 685-691.
- Hasanekoğlu, İ. ve Yeşilyurt, S., 2002. Mikrobiyoloji. Erzurum.
- Hedrich, S., Schlomann, M., and Johnson, D.B., 2011. The iron-oxidizing proteobacteria. *Microbiology*, 157, 1551-1564.
- Hernandez, G.M., Renard, F., Geoffroy, N., Charlet, L. and Pironon, J. 2007. Calcite precipitation from CO₂-H₂O-Ca(OH)₂ slurry under high pressure of CO₂. *Journal of Crystal Growth* 308: 228-236.
- Hitsuda, K., Yamada, M., Klepker, D., 2005. Sulfur requirement of eight crops at early stages of growth. *Agron. J.* 97, 155-159.
- Holmes, B., Costas, M., Ganner, M., On, S.L.W. and Stevens, M., 1994. Evaluation of biolog system for identification of some Gram-negative bacteria of clinical importance. *Journal of Clinical Microbiology*, 32 (8), 1970-1975.
- Horne, A.J., Goldman, C.R., 1994. *Limnology* 2nd Edition. McGraw-Hill, 576 pp, New York.
- Hosgoren, M.Y., 1994. Türküyenin Gölleri. *Türk Coğrafya Dergisi*, Sayı 29 s. 19-51, İstanbul.
- Howarth, R.W., Marina, R. and Judith Lane, J., 1988. Nitrogen fixation in freshwater, estuarine, and marine ecosystems. 1. Rates and importance. *Limnology and Oceanography*, 33 (4, part 2) 669-687.
- Hugenholtz, P., 2002. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biology*, 3(2) 1-8.
- Huntington, T. G. and Williams, R.S., Jr., 2012. The Global Hydrologic Cycle. Supplemental Cryosphere Note 2 in Williams, R.S., Jr., and Ferrigno, J.G., eds., *Satellite image atlas of glaciers of the world: U.S. Geological Survey Professional Paper 1386-A (State of the Earth's Cryosphere at the Beginning of the 21st Century: Glaciers, Snow Cover, Floating Ice, and Permafrost and Periglacial Environments; with two plates: Map of the Earth's Dynamic Cryosphere and Compendium of the Earth's Dynamic Cryosphere and the Earth System 2010*.
- Hussein, H., Ibrahim, S.F., Kandeel, K. and Moawad, H., 2004. Biosorption of heavy metals from waste water using *Pseudomonas* sp. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7:38-46.
- Hutchinson, G. E., 1957. *A Treatise on Limnology. I. Geography, Physics, and Chemistry*. New York: Wiley. 1015 p.
- İnandık, H.- 1965, Türkiye gölleri., İÜ. Coğrafya Enst. Yay., no., 44,214 s., İstanbul.

- İzbırak, R., 1962. Sular Coğrafyası II, Akarsular Göller, Doğu Matbaacılık ve Limited Ticaret Şirketi Matbaası, Ankara.
- İzbırak, R., 1984. Türkiye. (Düz: Cemal KURNAZ). M.E.B Yayınları, Öğretmen Kitapları Dizisi: 196, Milli Eğitim Basımevi, İstanbul.
- Kacar, A., 2014. Bafa Gölü Sedimentlerinden İzole Edilen *Bacillus*'ların Tanılanması ve Ağır Metal Dirençliliklerinin Belirlenmesi. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran 2014, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye.
- Kaplan, D., Maymon, M., Agapakis, C.M., Lee, A., Wang, A., Prigge, B.A., Volkogon, M. and Hirsch, A.M., 2013. A Survey of the Microbial Community in the Rhizosphere of Two Dominant Shrubs of the Negev Desert Highlands, *Zygophyllum dumosum* (Zygophyllaceae) and *Atriplex halimus* (Amaranthaceae), Using Cultivation-Dependent and Cultivation-Independent methods. American Journal of Botany, 100(9): 1713–1725.
- Kasting, J.F. and Siefert, J.L., 2002. Life and the Evolution of Earth's Atmosphere. Science, 296 (5570), pp. 1066-1068.
- Kasting, J.F., 1993. Earth's early atmosphere. Science, 259 (5097), pp. 920 – 926.
- Kayasth, M., Kumar, V. and Gera, R., 2013. Exploring the potential of PGPR strain *Bacillus licheniformis* to be developed as multifunctional biofertilizer. Central European Journal of Experimental Biology, 2 (1):12-17.
- Kertesz, M.A. and Mirleau, P., 2004. The role of soil microbes in plant sulphur nutrition. Journal of Experimental Botany, Vol. 55, No. 404, Sulphur Metabolism in Plants Special Issue, pp. 1939–1945.
- Kraemer, S.M., 2004. Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. Aquatic Sciences 66: 3–18.
- Krishnamurthi, S., Chakrabarti, T. and Stackebrandt, E., 2009. Re-examination of the taxonomic position of *Bacillus silvestris* Rheims *et al.* 1999 and proposal to transfer it to *Solibacillus* gen. nov. as *Solibacillus silvestris* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59, 1054–1058.
- Kuenen, J.G., Robertson, L.A. and Van Gernerden, H., 1985. Microbial Interactions among Aerobic and Anaerobic Sulfur-Oxidizing Bacteria. Advances in *Microbial Ecology*, 8: 1-59.
- Kumar, S. and Duraipandian, M.E., 2012. An Effective Identification of Species from DNA Sequence: A Classification Technique by Integrating DM and ANN (IJACSA) International Journal of Advanced Computer Science and Applications, 3 (8), 104-114.
- Lamba S., Bera S., Rashid M., Medvinsky A.B., Sun G.Q., Acquisti C., Chakraborty A. and Li B.L., 2016. Organization of biogeochemical nitrogen pathways with witch-like adjustment in fluctuating soil redox conditions. R. Soc. opensci. 4: 160768. <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.160768> (17.05.2018)
- Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L. and Pace, N.R., 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. PNAS, 82, 6955-6959.
- Laufer, K., Nordhoff, M., Halama, M., Martinez, R.E., Obst, M., Nowak, M., Stryhanyuk, H., Richnow, H.H., Kappler, A., 2017. Microaerophilic Fe(II)-oxidizing *Zetaproteobacteria* isolated from low Fe marine coastal sediments:

- physiology and composition of their twisted stalks. *Applied and Environmental Microbiology*, 83:e03118-16.
- Liu, T., Zhang, A.N., Wang, J., Liu, S., Jiang, X., Dang, C., Ma, T., Liu, S., Chen, Q., Xie, S., Zhang, T., and Ni, J., 2018. Integrated biogeography of planktonic and sedimentary bacterial communities in the Yangtze River. *Microbiome* 6:16.
- Lobo, I., 2008. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). *Nature Education* 1(1):215
- Logan, N.A., Forsyth, G., Lebbe, L., Goris, J., Heyndrickx, M., Balcaen, A., Verhelst, A., Falsen, E., Ljungh, A., Hansson, H.B. and De Vos, P., 2002. Polyphasic identification of *Bacillus* and *Brevibacillus* strains from clinical, dairy and industrial specimens and proposal of *Brevibacillus invocatus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 953–966.
- Louden, B.C., Haarmann, D. and Lynne, A.M., 2011. Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *Journal of Microbiology and Biology Education*, 12:1-3.
- Lover, S.K., 2005. Directed Natural Forces of Affinity Between a Bacterium and Mineral. *American Journal of Science*, Vol. 305, P. 752–765.
- Lower, S.K., Tadanier, C.J. and Hochella, M.F., 2000. Measuring interfacial and adhesion forces between bacteria and mineral surfaces with biological force microscopy. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 64, No. 18, pp. 3133–3139.
- Luttge, A. and Conrad, P. G. 2004. Direct Observation of Microbial Inhibition of Calcite Dissolution. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, p. 1627–1632.
- Madigan, M.T. and Martinko, J.M., 2006. *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson Education, Inc., NJ. USA, p1088.
- Madsen, E.L., 2011. Microorganisms and Their Roles in Fundamental Biogeochemical Cycles. *Environmental Biotechnology* Edited by Lindsay Eltis and Ariel Kushmaro. *Current Opinion in Biotechnology*, United States, 22:456–464.
- Maidak, B.L., Cole, J.R., Lilburn, T.G., Parker, C.T., Saxman, P.R., Farris, R.J., Garrity, G.M., Schmidt, T.M. and Tiedje, J.M., 2001. The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Research*, 29(1), 173-174.
- Maidak, B.L., Olsen, G.J., Larsen, N., Overbeek, R., McCaughey, M.J. and Woese, C.R., 1997. The RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Research*, 25(1), 109-110.
- Mardad, I., Serrano, A. and Soukri, A., 2013. Solubilization of inorganic phosphate and production of organic acids by bacteria isolated from a Moroccan mineral phosphate deposit. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 7(8), pp. 626-635.
- Mares, J., 2015. Polyphasic approach to the taxonomy of selected cyanobacteria. Ph.D. Thesis. University of South Bohemia, Faculty of Science, School of Doctoral Studies in Biological Sciences, Ceske Budejovice, Czech Republic, 109 pp.
- Martin, A.P., 2002. Phylogenetic Approaches for Describing and Comparing the Diversity of Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3673–3682.
- McMillan, D.G.G., Velasquez, I., Nunn, B.L., Goodlett, D.R., Hunter, K.A., Lamont, I., Sander, S.G. and Cook, G.M., 2010. Acquisition of Iron by Alkaliphilic *Bacillus*

- Species. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 76, no. 20, p. 6955–6961.
- Mehnaz, S., Weselowski, B. And Lazarovits, G., 2007. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogenfixing bacterium isolated from corn rhizosphere. *International Journal Systematic Evolotion Microbiology*, 57: 620-624.
- Meier, A., Kastner, A., Harries, D., Wieczorek, M.W., Majzlan, J., Büchel, G. and Kothe, E., 2017. Calcium carbonates: induced biomineralization with controlled macromorphology. *Biogeosciences*, 14, 4867–4878.
- Mellmann, A., Andersen, P.S, Bletz, S., Friedrich,A.W., Kohl, T.A., Lilje, B., Niemann, S., Prior, K., Rossen, J.W. and Harmsenf, D., 2017. High Interlaboratory Reproducibility and Accuracy of Next Generation Sequencing Based Bacterial Genotyping in a Ring Trial. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(3), 908-913.
- Melnik, K., Sun, J., Fleischman, A., Roy, S., Zborowski, M. and Chalmers, J.J., 2007. Quantification of magnetic susceptibility in several strains of *Bacillus* spores: Implications for separation and detection. *Biotechnology and Bioengineering* 98(1): 186- 192.
- Meyer, N. R., Zerkle, A. L., andFike, D. A., 2016.Sulphurcycling in a Neoarchaeamicrobial mat. *Geobiology*, 15, 353–365
- Middelburg, J., 2000. The geochemical sulfur cycle. In: Lens P, Hulshoff Pol W (eds) *Environmental technologies to treat sulfur pollution*. IWA Publishing, London, pp 33–46.
- Mitra, A., Flynn, K.J., Burkholder, J.M., Berge, T., Calbet, A., Raven J.A., Graneli, E., Glibert, P.M., Hansen, P.J., Stoecker, D.K., Thingstad, F., Tillmann, U., Vage, S., Wilken, S. and Zubkov M.V., 2014. The role of mixotrophic protists in the biological carbon pump. *Biogeosciences*, 11, 995–1005.
- Mora, R.R. and Amann, R., 2001. The species concept for prokaryotes. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews* 25, 39-67.
- Moses, M., 2012. Biogeochemical cycles. Retrieved from <http://www.eoearth.org/view/article/150616>
- Muyzer, G. and Smalla, K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophereaia (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 127-141.
- Neilands, J.B., 1995. Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 270, No. 45, Issue of November 10, pp. 26723–26726.
- Norman, D.J., Chase, A.R., Hodge, N.C. and Stall, R.E., 1997. Differrentiation of three of *Xanthomonas* and *Stenotrophomonas maltophilia* using cellular fatty acid analyses. *European Journal of Plant Pathology*, 103, 687-693.
- Norman, L.,Worms, I.A.M., Angles, E., Bowie, A.R., Nichols, C.M., Pham, A.N., Slaveykova, V.I., Townsend, A.T., Waite, T.D., Christel, S., and Hassler C.S., 2015. The role of bacterial and alg alexo polymeric substances in iron chemistry. *Marine Chemistry*, 173 148–161
- Offre, P., Spang, A., and Schleper C., 2013. Archaea in Biogeochemical Cycles. *Annual Review of Microbiology*, 67, 437-457.
- Okon, Y., Albrecht, S. L. And Burris, R. H. (1977). Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 33, 85 – 88.

- Orhan, F., Demirci, A., ve Yanmis, D., 2017. CaCO₃ and MgCO₃ Dissolving Halophilic Bacteria. *Geomicrobiology Journal*, 34:9, 804-810.
- Özbek, H., Kaya, Z., Gök, M., ve Kaptan, H., 1993, *Toprak Bilimi. Ç. Ü. Ziraat Fak. Yayınları*, 73, 816 s
- Pagano, T., and Sorooshian, S., 2002. Hydrologic Cycle. *Encyclopedia of Global Environmental Change*, Michael C. MacCracken and John S. Perry, Editor-in-Chief Ted Munn. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, USA, 450-464.
- Pahari, A. and Mishra, B.B., 2017. Characterization of Siderophore Producing Rhizobacteria and Its Effect on Growth Performance of Different Vegetables. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, Volume 6, Number 5, pp. 1398-1405.
- Park, H.G., Lee, Y.S., Kim, K.Y., Park, Y.S., Park, K.H., Han, T.H., Park, C.M. and Ahn, Y.S., 2017. Inoculation with *Bacillus licheniformis* MH48 Promotes Nutrient Uptake in Seedlings of the Ornamental Plant *Camellia japonica* grown in Korean Reclaimed Coastal Lands. *Horticultural Science and Technology*, 35(1):11-20.
- Pasek, M.A., Sampson, J.M., and Atlas, Z., 2014. Redox Chemistry In The Phosphorus Biogeochemical Cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111 (43) 15468-15473
- Peela, S., Kadiri, D.D., Gorle, N. AND Peetala, K.V.R., 2015. Isolation and Identification of Promising Ammonifying and Nitrifying Bacteria Agricultural Fields of Visakhapatnam. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 6(2): (B) 1309 – 1317.
- Priyanka, S., Sivaji, M. and Sridar, R., 2014. Isolation and Characterization of a Novel Multifunctional Sulphur Oxidizing Bacterium (SOB) and its use a Biofertilizer. *International Science*, Vol. 1, Issue 1, pp. 28-34.
- Qiu, G-z., Wan, M-x., Qian, L., Huang, Z-y., Liu, K., Liu, X-d., Shi, W-y. and Yang, Y., 2008. Archaeal diversity in acid mine drainage from Dabaoshan Mine, China. *Journal of Basic Microbiology*, 48, 401–409.
- Rademaker, J.L.W. and de Bruijn, F.J., 1997. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. DNA markers: protocols, applications and overviews. *In* G. Caetano-Anolle's and P. M. Gresshoff (ed.), John Wiley and Sons, Inc., New York, N.Y., p. 151–171.
- Rafique, A., Amin, A. and Latif, Z., 2015. Screening and Characterization of Mercury-Resistant Nitrogen Fixing Bacteria and Their Use as Biofertilizers and for Mercury Bioremediation. *Pakistan Journal of Zoology*, vol. 47(5), pp. 1271-1277.
- Rawlings, D.E., 2005. Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microbial Cell Factories*, 4: (13), 1-15.
- Reid, W.V., Laird, S.A., Meyer, C.A., Gomez, R., Sittenfeld, A., Janzen, D.H., Gollin, M.A. and Juma, C. (Eds.), 1993. *Biodiversity Prospecting: Using Genetic Resources for Sustainable Development*. World Resources Institute, Washington, DC, pp 1-52.

- Reinert, K. and Huson, D.H., 2007. Bioinformatics Support for Genome-Sequencing Projects In: Bioinformatics- From Genomes to Therapies., ed. by T. Lengauer, vol. 1, chap. 2, pp. 25–56, Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Rey, M.W., Ramaiya, P., Nelson, B.A., Brody-Karpin, S.D., Zaretsky, E.J., Tang, M., de Leon, A.L., Xiang, H., Gusti, V., Clausen, I.G., Olsen, P.B., Rasmussen, M.D., Andersen, J.T., Jorgensen, P.L., Larsen, T.S., Sorokin, A., Bolotin, A., Lapidus, A., Galleron, N., Ehrlich, S.D. and Berka, R.M., 2004. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biology*, Volume 5, Issue 10, Article 5:R77.
- Rheims, H., Fruhling, A., Schumann, P., Rohde, M. and Stackebrandt, E., 1999. *Bacillus silvestris* sp. nov., a new member of the genus *Bacillus* that contains lysine in its cell wall. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 795-802.
- Rojas, A., Holguin, G., Glick, B.R. and Bashan, Y., 2001. Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N2- ϵ xer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 35, 181-187.
- Rosenberg, G., Steinberg, N., Shaanan, Y.O., Olender, T., Doron, S., Ben-Ari, J., Madi, A.S., Ackermann, Z.B. and Gal, I.K., 2016. Not so simple, not so subtle: the interspecies competition between *Bacillus simplex* and *Bacillus subtilis* and its impact on the evolution of biofilms. *npj Biofilms and Microbiomes* 2, 15027.
- Rusznay, A., Vladar, P., Szabo, G., Marialigeti, K. and Borsodi, A.K., 2008. Phylogenetic and metabolic bacterial diversity of *Phragmites australis* periphyton communities in two Hungarian soda ponds. *Extremophiles*, 12, 763-773.
- Şahin, F., Pirim, İ. and Çiftçi, M., 2000 .Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) .II. Uygulamalı Moleküler Biyoloji Teknikleri Kursu , 15-20 Mayıs 2000, Erzurum, p18-27.
- Satyanarayana, T., Raghukumar, C. and Shivaji, S., 2005. Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current Science*, 89(1), 78-90.
- Schlegel, H.G., 1985. *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany. Sixth Edition pp. 587.
- Schlesinger, W.H. and Bernhardt, E.S., 2013. *Biogeochemistry An Analysis Of Global Change*. Elsevier, 673, Waltham, USA.
- Schlöter, M., Leubhn, M., Heulin, T. and Hartmann, A., 2000. Ecology and evolution of bacterial microdiversity. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 647-660.
- Schwartz, A.R., Ortiz, I., Maymon, M., Herbold, C.W., Fujishige, N.A., Vijenderan, J.A., Vilella, W., Hanamoto, K., Diener, A., Sanders, E.R., De Mason, D.A. and Hirsch, A.M., 2013. *Bacillus simplex*—A Little Known PGPB with Anti-Fungal Activity—Alters Pea Legume Root Architecture and Nodule Morphology When Coinoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*. *Agronomy*, 3(4), 595-620.
- Schwyn, B. and Neilands, J.B. 1987. NEILANDS Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores. *Analytical Biochemistry* 160, 47-56.

- Sella, S.R.B.R., Guizelini, B.P., Vandenberghe, L.P.S., Medeiros, A.B.P. and Soccol, C.R., 2009. Lab-Scale Production of *Bacillus atrophaeus* Spores by Solid State Fermentation in Different Types of Bioreactors. Brazilian Archives of Biology and Technology an International Journal, Vol. 52, Special Number: pp. 159-170.
- Selvi, K.B., John Paul, J.A., Ravindran, A.D. and Vijaya, V., 2011. Quantitative Estimation of Insoluble Inorganic Phosphate Solubilization. International Journal of Science and Nature, VOL. 2(2): 292 -295.
- Sharma, R., Chandel, S., Chauhan, A. and Shirkot, C.K., 2015. Enhanced Phosphorus Solubilization by *Bacillus licheniformis* CKA1 Using Central Composite Design and Response Surface Methodology. Journal of Pure and Applied Microbiology, Vol. 9(4), p. 3131-3141.
- Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H. and Gobi, T.A., 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. Springer Plus, 2:587.
- Sielaff, A.C., Kumar, R.M., Pal, D., Mayilraj, S. and Venkateswaran, K., 2017. *Solibacillus kalamii* sp. nov., isolated from a high-efficiency particulate arrestance filter system used in the International Space Station. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 67:896–901.
- Sievert, S.M., Kiene, R.P., and Schulz-Vogt H.N., 2007. Microbes and Major Elemental Cycles-The Sulfur Cycle. Oceanography. Oceanography Society, Washington D.C., 20 (2)117-123.
- Singh, B.K., Munro, S., Reid, E., Ord, B., Potts, J.M., Paterson, E. and Millard, P., 2006. Investigating microbial community structure in soils by physiological, biochemical and molecular fingerprinting methods. European Journal of Soil Science, 57, 72-82.
- Skirnisdottir, S., 2000. Phylogenetic characterization of microbial mats and isolation of *Thermus* spp. and sulfur-oxidizing bacteria from Icelandic hot springs. Fjölrítunarstofa Daniels Halldorssonar, Department of Biotechnology Lund University, Sweden, pp. 3-6.
- Son, H.J., Park, G.T., Cha, M.S. and Heo, M.S., 2006. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. Bioresource Technology, 97 : 204–210.
- Spellman, F.R., 1996. Stream Ecology and Self-Purification: An Introduction for Wastewater, CRC Press, 133, Lancaster.
- Stremke, S. and Koh, J., 2010. Ecological concepts and strategies with relevance to energy-conscious spatial planning and design. Environment and Planning B: Planning and Design 37(3) 518-532
- Subba Rao, N.S., 1977. Soil Microorganisms and Plant Growth, Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi.
- Suganthi, C., Mageswari, A., Karthikeyan, S., Anbalagan, M., Sivakumar, A. and Gothandam, K.M., 2013. Screening and optimization of protease production from a halotolerant *Bacillus licheniformis* isolated from saltern sediments. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 11, 47–52.
- Tanpinar, I.O., Sabanci, A. and Tarhan, A., 2015. Production of biosurfactants by microorganisms isolated from a mine tailing zone in Southern Mexico and their resistance to heavy metals. International Journal of Bacteriology Research ISSN 2932-7521 Vol. 3 (4) pp. 140-147.

- Temirov, Y.V., Esikova, T.Z., Kashparov, I.A., Balashova, T.A., Vinokurov, L.M. and Alakhov, Y.B., 2003. A Catecholic Siderophore Produced by the Thermoresistant *Bacillus licheniformis* VK21 Strain. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, Vol. 29, No. 6, pp. 542–549.
- Temiz, A., 2000. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatipoğlu Yayınevi, Ankara.
- Tortora, G.J., Funke, B.R. and Case, C.L. 2004. Microbiology An Introduction Media update. 7th Edn., Benjamin Cummings, Boston, pp: 406-434.
- Uilenberg, G. and Goff, W.L. 2006. Polyphasic Taxonomy. Annals of the New York Academy of Sciences. 1081:492-497.
- Vahabi, A., Ramezani-pour, A.R., Sharafi, H., Zahiri, H.S., Vali, H. and Noghabi, K.A., 2013. Calcium carbonate precipitation by strain *Bacillus licheniformis* AK01, newly isolated from loamy soil: a promising alternative for sealing cement-based materials. Journal of Basic Microbiology, 53, 1 – 7.
- Vala, A.K., Dave, B.P., and Dube, H.C., 2006. Chemical characterization and quantification of siderophores produced by marine and terrestrial Aspergilli. Canadian Journal of Microbiology. 52; 603-607.
- Valdes, J., Pedroso, I., Quatrini, R., Dodson, R.J., Tettelin, H., Blake, R., Eisen, J.A. and Holmes, D.S., 2008. *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. BioMed Central (BMC) Genomics, 9:597.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P. and Swings, J., 1996. Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics, Microbiol. Rev., 60, 407-438.
- Vaneeschoutte, M., Dijkshoorn, L., Tjernberg, I., Elaichouni, A., De Vos, P., Claeys, G. and Verschraegen, G., 1995. Identification of Acinetobacter Genomic Species by Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis. Journal of Clinical Microbiology, 33(1), 11-15.
- Varotsos A.C., Krapivin V.F., and Soldatov V.Y., 2014. Modeling the carbon and nitrogen cycles. Frontiers in Environmental Science, 2 (8), 1-6.
- Vary, P.S., 1994. Prime time for *Bacillus megaterium*. Microbiology, 140, 1001 -1013.
- Vary, P.S., Biedendieck, R., Fuerch, T., Meinhardt, F., Rohde, M., Deckwer, W.D., Jahn, D., 2007. *Bacillus megaterium*-from simple soil bacterium to industrial protein production host. Applied Microbiology and Biotechnology, 76 (5), pp. 957-967.
- Vazquez, P., Holguin, G., Puente, M.E., Cortes, A.L. and Bashan, Y. 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. Biol Fertil Soils, 30:460–468.
- Velasquez, I.B., Ibisami, E., Maas, E.W., Boyd, P.W., Nodder, S. and Sander, S.G., 2016. Ferrioxamine Siderophores Detected amongst Iron Binding Ligands Produced during the Remineralization of Marine Particles. Frontiers in Marine Science, 3:172.
- Villegas, L.C., Llamado, A.L., Catsao, K.V. and Raymundo, A.K., 2018. Removal of heavy metals from aqueous solution by biofilm-forming bacteria isolated from mined-out soil in Mogpog, Marinduque, Philippines. Philippine Science Letters, vol: 11, pp.18 – 27.

- Ward, L.M., Idei, A., Terajima, S., Kakegawa, T., Fischer, W.W. and McGlynn, S.E., 2017. Microbial diversity and iron oxidation at Okuoku-hachikurou Onsen, a Japanese hot spring analog of Precambrian iron formations. *Geobiology*, 15:817–835.
- Weber, K.A., Achenbach, L.A. and Coates, J.D., 2006. Microorganisms pumping iron: Anaerobic microbial iron oxidation and reduction. Published in *Nature Reviews Microbiology*, 4, pp. 752-764.
- Westhoff, P., 2009. The economics of biological nitrogen fixation in the global economy. In: Emerich DW, Krishnan HB. eds. *Nitrogen fixation in crop* 766 Santi *et al.* — Biological nitrogen fixation in non-legume plants production. Agronomy Monograph No. 52. Madison, WI: American Society of Agronomy, 309–328.
- Wetzel, R.G., 2001. *The Nitrogen Cycle. Limnology; Lake and River Ecosystem* 3rd Edition. Academic Press, New York, 205-237.
- Wilson, K., 1997. Preparation of Genomic DNA from Bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2.4.1-2.4.5.
- Woese, C.R., Kandler, O. and Whellis, M.L., 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 87, pp. 4576-4579.
- Woese, C.R., 2000. Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (15) 8392-8396.
- Woese, C.R., 2004. A New Biology for a New Century. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 173-186.
- Wolf, M. and Bachofen, R., 1991. Microbial Degradation of Bitumen Matrix Used in Nuclear Waste Repositories. *Naturwissenschaften*, 78, 414 - 417.
- Wood, J.L., Liu, W., Tang, C. and Franks A.E., 2016. Microorganisms in heavy metal bioremediation: strategies for applying microbial-community engineering to remediate soils. *AIMS Bioengineering*, 3(2): 211-229.
- Wurzbacher, C., Fuchs, A., Attermeyer, K., Frindte, K., Grossart, H.P., Hupfer, M., Casper, P., and Monaghan, M.T., 2017. Shifts among Eukaryota, Bacteria, and Archaea define the vertical organization of a lake sediment. *Microbiome* 5:41.
- Xia, Y., De Bolt, S., Dreyer, J., Scott, D. and Williams, M.A., 2015. Characterization of culturable bacterial endophytes and their capacity to promote plant growth from plants grown using organic or conventional practices. *Frontiers in Plant Science*, 6:490.
- Xiong, Y., Wang, Y., Yu, Y., Li, Q., Wang, H., Chen, R. and He, N., 2010. Production and Characterization of a Novel Biofloculant from *Bacillus licheniformis*. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 2778–2782.
- Xu, H.B., Tsukuda, M., Takahara, Y., Sato, T., Gu, J.D. and Katayama, Y., 2018. Lithoautotrophic oxidation of elemental sulfur by fungi including *Fusarium solani* isolated from sandstone Angkor temples. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 126 (2018) 95–102.
- Yılmaz, A., 1985. Yukarı Kelkit Çayı ve Munzur Dağları arasının temel Jeoloji özellikleri ve yapısal evrimi. *Türkiye Jeoloji Kurumu Bülteni*. C: 28, Sayı: 2

ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Erzincan'ın Tercan ilçesinde doğdu. İlkokulu Tercan'ın Hacıbayram köyünde Ortaokul ve Liseyi Tercan da tamamladı. 2010 yılında girdiği Atatürk Üniversitesinde önce Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Tıbbi Laboratuvar Tekniklerini bitirdi. Buradan dikey geçişle geçtiği Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2015 yılında biyolog olarak mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji Bilim Dalında Tezli Yüksek Lisans Programına başladı. Yine aynı yıl Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Bölümüne tanınan hakla Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji bölümüne başladı ve burada lisans tamamlama yaparak 2018 yılında bu bölümden mezun oldu. Bir sivil toplum örgütünde bu zaman zarfında yönetim kurulu üyeliği de yapan Ahmet Atıcı evli ve dört çocuk babasıdır. Halen Sağlık Bakanlığı Sağlık Bilimleri Üniversitesi Erzurum Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi idari bölümde Süpervisor olarak çalışmaktadır.

