

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DEMİR, BAKIR VE KROM DİRENCİ GÖSTEREN BAKTERİLERİN
MOLEKÜLER YÖNTEMLER KULLANILARAK TANIMLANMASI VE
BİYOSORPSİYON KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ

İREM AKIN

MAYIS 2014

Biyoloji Anabilim Dalında İrem AKIN tarafından hazırlanan DEMİR, BAKIR VE KROM DİRENCİ GÖSTEREN BAKTERİLERİN MOLEKÜLER YÖNTEMLER KULLANILARAK TANIMLANMASI VE BİYOSORPSİYON KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İlhami TÜZÜN

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Doç. Dr. Bülent İÇGEN

Prof. Dr. Aysun ERGENE

Ortak Danışman

Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Yrd. Doç. Dr. Tarık DANIŞMAN _____

Üye (Danışman) : Prof. Dr. Aysun ERGENE _____

Üye (Eş danışman) : Doç. Dr. Bülent İÇGEN _____

Üye : Doç. Dr. Muhammet IŞIKLAN _____

Üye : Doç. Dr. Sema ÇETİN _____

...../...../.....

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

(Doç. Dr. Erdem Kamil YILDIRIM)

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

DEMİR, BAKIR VE KROM DİRENCİ GÖSTEREN BAKTERİLERİN MOLEKÜLER YÖNTEMLER KULLANILARAK TANIMLANMASI VE BİYOSORPSİYON KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Akın, İrem

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Aysun ERGENE

Ortak Danışman: Doç. Dr. Bülent İÇGEN

Mayıs 2014, 108 sayfa

Sucul ekosistemlerde ağır metal kirliliği nüfus artışı, kentleşme ve sanayileşmenin gelişmesi gibi nedenlerden ötürü evrensel bir sorun haline almaktadır. Atık suların ağır metalin giderimi ile ilgili etkili biyolojik adsorbant ya da sorbant kullanılması hem verimli hem de ekonomik bir çözüm oluşturmaktadır. Bu çalışmanın amacı daha önce laboratuvarımızda yapılan çalışmalar sonucu atık sularda bulunan demir, bakır ve krom gibi metallerin uzaklaştırılmasında potansiyel oluşturabilecek suşların moleküler metodlar kullanılarak tanımlanması ve biyosorpsiyon yeteneklerinin belirlenmesidir. Demir, bakır ve krom direnci gösteren suşlar yağ asidi (FAME) analizi ve 16S rRNA sekans analizi kullanılarak tanımlanmıştır. Tanımlanan bakteriler daha sonraki aşamada ise biyosorpsiyon kapasiteleri bakımından değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Demir, bakır, krom, 16S rRNA, FAME, biyosorpsiyon, FTIR, zeta potansiyel.

ABSTRACT

DETERMINATION OF BIOSORPTION ABILITIES OF IRON, COPPER AND CHROMIUM RESISTANT ISOLATES IDENTIFIED BY MOLECULAR METHODS

AKIN, İrem

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, MSc. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Aysun ERGENE

Co-supervisor: Assoc. Prof. Bülent İÇGEN

May 2014, 108 Pages

Heavy metal polluted aquatic systems, have become universal problem because of urbanization, high population rate and industrialization. The use of efficient biological adsorbants or biosorbants to remove heavy metals from wastewater is not only efficient but also economical. The aim of this study was to identify the isolates which were efficient in the biosorption of iron, copper and chromium metals. For this reason river isolates of iron, copper and chromium resistant strains were first identified through fatty acid methyl ester (FAME) and 16S rRNA sequence analyses. After identification, the isolates were further investigated for their biosorption abilities.

Keywords: Iron, copper, chromium, 16S rRNA, FAME, biosorption, FTIR, zeta potential.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tezimi hazırlamamda bana yol gösteren, tecrübe ve bilgileri ile her aşamada destekçim olan tez yöneticisi Sayın Prof. Dr. Aysun ERGENE ve eş danışmanım olan Sayın Doç. Dr. Bülent İÇGEN hocalarıma en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında bilimsel konularda bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Sema ÇETİN hocama teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında tecrübelerini esirgemeyerek bana yol gösteren çalışmalarım boyunca her an beraber olduğumuz, tüm maneviyatı ile yanımda olan Dr. Fadime YILMAZ, Murat ARTUÇ, Uzman Hilal TOPBAŞ, Uzman Ogün BOZKAYA, Uzman İlhan COŞAR, Mehmet GÜVEN, Barış KAHYAOĞLU, Sıla CANPOLAT, Selçuk TOKLUCU, Ramazan KOÇAK, Burak BEYGU, Semih CERİT, Özgün ŞAHİN, Yağmur AKDEMİR, Güven Emre SARIKAYA, Pınar ERDEM, Çınar ERDEM, Deniz BOZKURT, Gamze TURALI, Salih Batuhan SALIK, Lale GÖKSU, Hüseyin ULUSOY ve diğer tüm çalışma arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım ve hayatım boyunca her an yanımda olan ve beni sonsuz sevgileriyle kucaklayan bütün aile fertlerime başta anneannem, dedem Nurten-Hasan ORUÇ'a, annem Fisun AKIN, babam Tuncer AKIN, kardeşim Ilgın AKIN ve Dilek-Mehmet ORUÇ ve Batuhan ORUÇ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak tez çalışmalarım ve hayatım boyunca benden desteğini, sevgisini esirgemeyen Eren YİĞİT'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Literatür Özetleri	2
1.1.1. Çevre Kirliliği	2
1.1.2. Su Kirliliği	3
1.1.3. Ağır Metallerin Fonksiyonları ve Toksik Etkileri	3
1.1.3.1. Demir	6
1.1.3.1.1. Demirin Özellikleri ve Kullanım Alanları.....	6
1.1.3.1.2. Demirin Fizyolojik ve Toksik Etkileri	6
1.1.3.2. Bakır	7
1.1.3.2.1. Bakırın Özellikleri ve Kullanım Alanları	7
1.1.3.2.1. Bakırın Fizyolojik ve Toksik Etkileri.....	8
1.1.3.2. Krom.....	9
1.1.3.2.1. Kromun Özellikleri ve Kullanım Alanları.....	9
1.1.3.2.1. Kromun Fizyolojik ve Toksik Etkileri	10
1.1.4. Bakterilerde Metal Dirençlilik Mekanizmaları.....	11
1.1.4.1. Geçirgenlik Bariyeri İle Metallerin Hücre Dışında Tutulması	11
1.1.4.2. Metallerin Hücre Dışına Doğru Aktif Transportu.....	13
1.1.4.3. Metallerin Hücre İçine Alınması.....	14
1.1.4.4. Ekstraselüler Alıkonma	16
1.1.4.5. Enzimatik Detoksifikasyonla Metallerin Daha Az Zararlı Fonksiyonlara Dönüştürülmesi.....	16

1.1.4.6. Hücresel Komponentlerin Metale Olan Hassasiyetlerinin Azaltılması.....	18
1.1.5. Biyosorpsiyon	19
1.1.5.1. Biyosorpsiyon Mekanizmaları	20
1.1.6. Adsorbsiyon	23
1.1.6.1. Adsorbsiyon İzotermi	23
1.1.6.1.1. Langmuir İzotermi.....	24
1.1.6.1.2. Freundlich İzotermi	25
1.1.6.2. Adsorbsiyon Kinetiği.....	26
1.1.7. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)	28
1.1.8. Zeta Potansiyeli	29
1.1.9. Mikrobiyal İdentifikasyon	30
1.1.9.1. Geleneksel Yöntemler	31
1.1.9.2. Yağ Asidi Metil Ester (FAME) Analizi	32
1.1.9.2.1. FAME'in Avantaj ve Dezavantajları.....	33
1.1.9.3. 16S rRNA Dizi Analizi.....	34
1.1.9.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	35
1.1.9.3.2. 16S rRNA Analizinin Avantajları ve Dezavantajları.....	37
1.2. Çalışmanın Amacı	38
2. MATERYAL VE YÖNTEM	39
2.1. Materyal	39
2.1.1. Kullanılan Besiyerleri.....	39
2.1.1.1. Nutrient Agar (NA) Besiyerinin Hazırlanışı.....	39
2.1.1.2. Nutrient Broth (NB) Besiyerinin Hazırlanışı.....	39
2.1.1.3. Plate Count Agar Besiyerinin Hazırlanışı.....	39
2.1.1.4. Trypticase Soy Broth Agar Besiyerinin Hazırlanışı.....	40
2.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar	40
2.1.2.1. Ağır Metal Stok Çözeltilerinin Hazırlanması	40
2.1.2.1.1. 0.5 M Demir Klorit Çözeltisi ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).....	40
2.1.2.1.2. 0.5 M Bakır Sülfat Çözeltisi ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	40
2.1.2.1.3. 0.5 M Krom Nitrat Çözeltisi ($\text{CrN}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$).....	41
2.1.2.2. Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	41

2.1.2.2.1. Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon	
Çözeltiler	41
2.1.2.2.1.1. Tris/EDTA Tamponu	41
2.1.2.2.1.2. % 10'luk SDS Tamponu	41
2.1.2.2.1.3. Proteinaz-K'nın Hazırlanması	41
2.1.2.2.1.4. NaCl Tamponu	41
2.1.2.2.2.5. CTAB/NaCl Tamponu	42
2.1.2.2.2.6. Kloroform/ İzamil Alkol Tamponu	42
2.1.2.2.2.7. Kloroform/ İzamil Fenol Tamponu	42
2.1.2.2.2.8. İzopropanol Alkol	42
2.1.2.2.2.9. % 70'lik Etil Alkol	42
2.1.2.2.2.10. Tris-HCl Tamponu (50 mM)	42
2.1.2.2.2.11. Tris-HCl Tamponu (1 M)	43
2.1.2.2.2.12. Elektroforez Tamponu (50x TAE) Hazırlama	43
2.1.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Primerler ve	
Özellikleri.....	43
2.1.2.4. Yağ Asidi Çalışma Solüsyonları ve Hazırlanışı	43
2.1.2.4.1. Solüsyon I	43
2.1.2.4.2. Solüsyon II	44
2.1.2.4.3. Solüsyon III.....	44
2.1.2.4.4. Solüsyon IV	44
2.2. Yöntem.....	44
2.2.1. Çalışma Alanı ve Örneklerin Toplanması	44
2.2.2. Demir Bakır ve Krom Dirençli Bakterilerin İzolasyonu	46
2.2.3. Bakterilerin Maksimum Tolere Ettikleri Metal Konsantrasyonu	
Değerlerinin Belirlenmesi	47
2.2.4. FAME Analizi.....	47
2.2.5. Kromozomal DNA İzolasyonu ve DNA Miktar Tayini	48
2.2.6. Kromozomal DNA Amplifikasyonu	49
2.2.7. PZR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi	49
2.2.8. DNA Sekans Analizi	50
2.2.9. Filogenetik Soyağaçlarının Oluşturulması	50

2.2.10. Bakteri Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi.....	51
2.2.11. Koloni Oluşturan Birim Sayımı	51
2.2.12. Biyosorpsiyon Kapasitelerinin Belirlenmesi	51
2.2.13. İzolatların SEM Analizleri.....	52
2.2.14. İzoterm Çalışmaları.....	52
2.2.15. Kinetik Çalışmaları	52
2.2.16. FTIR Analizi ile Bakterilerin Yüzey Özelliklerinin Belirlenmesi	53
2.2.17. Zeta Potansiyeli Ölçümü	53
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	54
3.1. Bakterilerin İzolasyonu.....	54
3.2. Bakterilerin Tanımlanması.....	54
3.2.1. FAME ile Tanımlama.....	54
3.2.1.1. Fe10 Kodlu Suşun FAME Analizi	54
3.2.1.2. Cu12 Kodlu Suşun FAME Analizi	56
3.2.1.3. Cr07 Kodlu Suşun FAME Analizi	58
3.2.2. 16S rRNA Sekans Analizi ile Tanımlama	60
3.2.2.1. Kromozomal DNA İzolasyonu	60
3.2.2.2. Fe10 Kodlu Suşun PZR Optimizasyonu.....	61
3.2.2.3. Fe10 Kodlu Suşun 16S rRNA Sekans Analizi İle Tanımlanması...62	
3.2.2.4. Cu12 Kodlu Suşun PZR Optimizasyonu	65
3.2.2.5. Cu12 Kodlu Suşun 16S rRNA Sekans Analizi İle Tanımlanması. 66	
3.2.2.6. Cr07 Kodlu Suşun PZR Optimizasyonu.....	69
3.2.2.7. Cr07 Kodlu Suşun 16S rRNA Sekans Analizi İle Tanımlanması...70	
3.3. Bakterinin Optimum Üreme Koşulları.....	73
3.3.1. <i>A. calcoaceticus</i> 'un Değişik pH'lardaki Üreme Eğrileri	73
3.3.2. <i>P. koreensis</i> 'in Değişik pH'lardaki Üreme Eğrileri.....	74
3.3.3. <i>E. faecalis</i> 'in Değişik pH'lardaki Üreme Eğrileri	75
3.4. Bakterilerin Biyosorpsiyon Kapasitelerinin Belirlenmesi	77
3.5. SEM Görüntüleri	78
3.6. <i>E. faecalis</i> 'e ait İzoterm Eğrilerinin Değerlendirilmesi	79
3.7. <i>E. faecalis</i> 'e ait Kinetik Eğrilerinin Değerlendirilmesi.....	80
3.8. FITR Analizi	82

3.9. Zeta Potansiyelinin Değerlendirmesi.....	83
4. TARTIŞMA SONUÇ	85
KAYNAKLAR	94

ŞEKİLLER DİZİNİ

SEKİL

Sayfa

1.1. E.coli'de arsenik'in hücre dışına aktif taşınımı	13
1.2. Bakterilerde çinko dirençliliğinin mekanizması	14
1.3. Synechococcus'da <i>smtA</i> ve <i>smtB</i> genleri ve Zn'yi bağlaması	15
1.4. Gram negatif bakterilerde Hg ⁺² 'ye enzimatik detoksifikasyon ile metal dirençliliği	18
1.5. Bakteriyal biyokütlelerde biyosorpsiyon mekanizmaları	20
1.6. Gram pozitif ve gram negatif bakteri yüzeyi	22
1.7. Langmuir İzotermi	25
1.8. Freundlich İzotermi	26
1.9. FTIR çalışma prensibi	29
1.10. Zeta potansiyeli	30
1.11. FAME analizi	33
1.12. 16 S rRNA sekans analizi	35
1.13. PZR aşamaları	36
2.1. Örnekleme bölgesi	45
3.1. Fe10 kodlu suşa ait GC kromotogramı	56
3.2. Cu12 kodlu suşa ait GC kromotogramı	58
3.3. Cr07 kodlu suşa ait GC kromotogramı	60
3.4. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında Fe10 kodlu suşa ait PZR ürünleri	61
3.5. Farklı MgCl ₂ konsantrasyonlarında Fe10 kodlu suşa ait PZR ürünleri	62
3.6. Fe10 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram	63
3.7. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında Cu12 kodlu suşa ait PZR ürünleri	65
3.8. Farklı MgCl ₂ konsantrasyonlarında Cu12 kodlu suşa ait PZR ürünleri	66
3.9. Cu12 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram	67
3.10. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında Cr07 kodlu suşa ait PZR ürünleri	69
3.11. Farklı MgCl ₂ konsantrasyonlarında Cr07 kodlu suşa ait PZR ürünleri	70
3.12. Cr07 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram	71
3.13. <i>A. calcoaceticus</i> 'un pH 6, pH 7, pH 9'daki üreme eğrisi	73

3.14. <i>A. calcoaceticus</i> 'un pH 7'deki demir içeren ve içermeyen ortamlardaki hücre sayısına bağlı standart eğrileri	74
3.15. <i>P. koreensis</i> 'in pH 7, pH 9'daki üreme eğrisi.....	75
3.16. <i>P. koreensis</i> 'in pH 7'deki bakır içeren ve içermeyen ortamlardaki hücre sayısına bağlı standart eğrileri	75
3.17. <i>E. faecalis</i> 'in pH 7 ve pH 9'daki üreme eğrisi	76
3.18. <i>E. faecalis</i> 'in pH 7'deki krom içeren ve içermeyen ortamlardaki hücre sayısına bağlı standart eğrileri.....	76
3.19. <i>A. calcoaceticus</i> 'un 28 mg/L (a) ve 10 mg/L (b) demir varlığındaki biyosorpsiyon grafikleri	77
3.20. <i>P. koreensis</i> 'in 50 mg/L (a) ve 20 mg/L (b) bakır varlığındaki biyosorpsiyon grafikleri	78
3.21. <i>E. faecalis</i> 'in 72.8 mg/L (a) ve 20 mg/L (b) krom varlığındaki biyosorpsiyon grafikleri	78
3.22. Krom içermeyen (a) ve krom içeren (b) ortamdaki <i>E. faecalis</i> 'e ait SEM görüntüleri.....	79
3.23. <i>E. faecalis</i> 'in Langmuri ve Freundlich izotermi	80
3.24. <i>E. faecalis</i> 'in krom biyosorpsiyonu için kesikli kinetik çalışmasında biyosorpsiyon kapasitesinin zamana bağlı değişimi	81
3.25. <i>E. faecalis</i> için yalancı birinci ve yalancı ikinci derece kinetik sabitleri.....	81
3.26. <i>E. faecalis</i> suşunun krom metali içeren ve içermeyen ortamda FTIR analizi sonuçları	82
3.27. <i>E. faecalis</i> 'in krom konsantrasyonuna bağlı zeta potansiyeli.....	84

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerler ve özellikleri.....	43
2.2. Örneklerin alındığı bölgeler ve koordinatları.....	46
3.1. Fe10 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri.....	55
3.2. Cu12 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri	57
3.3. Cr07 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri.....	59
3.4. Fe10 kodlu suş için 16S rRNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri.....	64
3.5. Cu12 kodlu suş için 16S rRNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri	68
3.6. Cr07 kodlu suş için 16S rRNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri	72
3.7. İzoterm sabitleri.....	80
3.8. <i>E. faecalis</i> için yalancı birinci ve yalancı ikinci derece kinetik sabitleri.....	81
3.9. <i>E. faecalis</i> 'e ait FTIR sonuçları	83

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER DİZİNİ

Fe	Demir
Ag	Gümüş
Al	Alüminyum
Cd	Kadmiyum
Cu	Bakır
Co	Kobalt
Cr	Krom
Pb	Kurşun
Hg	Civa
Li	Lityum
Mn	Mangan
Ni	Nikel
Sb	Antimon
Sn	Kalay
Sr	Stronsiyum
Zn	Çinko
FeCl ₃ 6H ₂ O	Demir (III) Klorür Hekza Hidrat
CuSO ₄ 5H ₂ O	Bakır (II) Sülfat Penta Hidrat
CrN ₃ 9H ₂ O	Krom (III) Nitrat Nano Hidrat

KISALTMALAR DİZİNİ

PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
MTK	Maksimum Tolere Edilebilen Konsantrasyon
SI	Similarity İndex
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
FAME	Yağ Asidi Metil Ester Analizi

1. GİRİŞ

İnsan var oluşundan itibaren çevreyi kendi istekleri doğrultusunda kullanmakta ve değiştirmektedir. Nüfusun hızla artışı ve sanayinin hızlı gelişimi çevre sorunlarını gündeme getirmiş; nehirlere, göllere, denizlere arıtılmadan akıtılan bol miktardaki evsel ve sanayi atıkları çevrenin aşırı kirlenmesine neden olmuştur [1]. Çevre sorunları geniş alan ve toplulukları etkilemesi nedeniyle oldukça önemlidir. Çevre kirliliğini arttıran ve ekolojik dengenin bozulmasında önemli rol oynayan endüstri kuruluşlarının başında, atık sularında ağır metal içeren kuruluşlar gelmektedir. Canlıların yaşamını zorlaştıracak, ekosistemin dengesini bozacak ve kullanım amacına uygun olmayan sulara kirlenmiş veya kirletilmiş su denilir. Etkili bir arıtım yapılması durumunda bu tür atıkların göl, nehir, deniz ve okyanus gibi alıcı ortamlara deşarj edilmesi, suda yaşayan ve bu suyu kullanan canlı sistemler ve çevresi için oldukça toksik olmaktadır. Bu atık suların içinde bazen eser miktarda bazen de yüksek derişimlerde ağır metaller bulunmaktadır. Ağır metaller, besin zinciriyle girdikleri organizmadan atılamadıkları için birikime neden olurlar ve bünyede belirli sınır derişimlerinin aşılması halinde toksik etki yaparlar [2].

Kirlilik; besin zincirine katılan ve çevresel değişikliklere duyarlı birçok organizmayı olumsuz yönde etkilemektedir [3]. Su kirliliğini tetikleyici birçok unsur vardır. Bunlar çeşitlerine ve bu çeşitliliğe sebep olan kaynaklarına göre birçok gruba ayrılmakla beraber en önemli grubu kimyasal kaynaklı kirlenme oluşturmaktadır. İz metalle eş anlamlı olarak kullanılan ağır metal terimi esansiyel olan ve olmayan iz metalleri kapsar. Yani, kimyasal olarak; elektron verip (+) değerlikli iyon olabilen, asitlerde bulunan H iyonlarıyla yer değiştirebilen, ametallerle bileşik oluşturabilen fakat kendi aralarında oluşturamayan, oksitleri bazik olan, fiziksel olarak ise; civa hariç normal şartlarda katı olan, ısı ve elektriği iyi ileten, levha ve tel haline gelebilen ve metalik bir renk ve parlaklığa sahip olan bütün maddeler ağır metal olarak tanımlanmaktadır. Bunların tamamı, yüksek konsantrasyonda canlı organizmalar için potansiyel birer tehlikedir [4].

Başlıca kaynağını fosil yakıtların kullanımı, madencilik, ağır sanayi kuruluşları ve tarımda kullanılan fertilizerler ve kimyasal ilaçların oluşturduğu toksik metaller, biyolojik olarak ortadan kaldırılamaması ve canlı organizmalarda birikebilmelerinden dolayı insanların da dahil olduğu birçok canlı için önemli bir risk oluşturmaktadır [5]. Ağır metallerin birçoğu insan ve çevre sağlığı açısından tehlikelidir ve biyolojik açıdan parçalanamayıp birikme eğiliminde olduğundan birçok hastalığın da nedenidir. Ağır metal kirliliği içeren suları uzaklaştırmak için yaygın kullanılan metodlar; kimyasal çöktürme, solvent ekstrasyonu, vakum buharlaştırma, membran teknolojileri, adsorpsiyon, iyon değişimi vb. gibi sıralanabilir. Adsorpsiyon teknikleri, biyolojik olarak parçalanamayan kirleticilerin (boyalar, ağır metaller, pestisitler, vb.) uzaklaştırılması için etkili ve cazip bir yöntem olmakla beraber, doğal adsorbentlerin kullanımıyla da oldukça popülerdir [6].

Yüksek konsantrasyonda ağır metal içeren endüstriyel atık suların arıtımında nötralizasyon ve kimyasal çökeltim, adsorpsiyon, sorpsiyon, iyon değiştirme, ters osmoz, buharlaştırma ve membran yöntemleri uygulanabilmektedir. Mikroorganizmaların biosorban olarak ağır metal gideriminde kullanımı yüksek performans ve düşük sorban maliyetleri nedeniyle cazip alternatif olarak görülmektedir [7].

1.1. Literatür Özetleri

1.1.1. Çevre Kirliliği

Çevre, en genel anlamıyla, bir canlının yaşam ortamı olarak tanımlanmaktadır. Ekolojik anlamda, bireyle ilişkili canlı-cansız her şeyi kapsayan bir terimdir [8]. Bu tanım doğal ve yapay çevreyi içermektedir. Çevre sorunları, yaşamla ilgili gereksinimlerin karşılanmasını güçleştiren veya olanaksızlaştıran engellere ilişkin sorunlardır. Bu engellere çevre kirliliği denilmektedir [9].

Çevre kirliliği; su, hava, toprak ve ses kirliliği olmak üzere dört başlık altında ele alınabilir. Bu dört temel unsurdan sadece su kirliliğine sebebiyet veren ağır metallerin mikroorganizmalar üzerine etkisi üzerinde araştırma yapılmıştır [10].

1.1.2. Su Kirliliği

Su kirliliği; kullanılacak bir su kaynağının, doğal yapısının herhangi bir olumsuz fiziksel veya kimyasal etmene bağlı olarak bozulmasıdır. Kirlilik; besin zincirine katılan ve çevresel değişikliklere duyarlı birçok organizmayı olumsuz yönde etkilemektedir. Su kirliliğinin boyutları sadece fizikokimyasal özelliklere bakılarak değil aynı zamanda su içinde yaşayan organizmaların incelenmesi ile belirlenebilir. Bu organizmaların en önemlileri olan alglerden; su kirliliğinin belirlenmesinde, tıpta, biyoteknolojide, kozmetik, besin ve gübre sanayilerinde ve tek hücre proteininin elde edilmesinde yararlanılmaktadır [3].

1.1.3. Ağır Metallerin Fonksiyonları ve Toksik Etkileri

Ağır metaller atomik yoğunluğu 5 gr/cm^3 'ten fazla olan metaller olarak tanımlanırlar. Metaller, canlıların metabolik süreçlerinde önemli rol oynarlar [11]. Metaller bilinen elementlerin % 75'ini oluştururlar ve biyosferde her yerde bulunabilirler. Sanayi, altyapı ve günlük yaşam içinde oldukça önemli bir yer teşkil ederler. Sanayi Devrimi'nden bu yana metallerin karasal ve sucul ortamda birikimi ile çevrede yeniden dağılımı, biyota ve insan sağlığına karşı olumsuz etkileri ile ilişkilendirilmiştir [12].

Metaller boşaltım ortamlarındaki canlı yaşamı üzerinde konsantrasyonları ile orantılı olarak toksik etki yaparlar. Eser miktarlarda bile sakıncalı olabilen bu maddeler arasında en önemli grubu ağır metalleri diye adlandırılan Sb, Ag, As, Be, Cd, Cr, Cu, Pb, Mn, Hg, Ni, S, T, U, V, Zn gibi elementler oluşturur [13,14]. Spesifik iz metaller (Fe, Mn, Cu, Co, Zn, Mo, Se gibi) metalloenzimlerde tek bir katalitik fonksiyonu

yürüten spesifik bir protein ile birleşirler ve birçok enzim sisteminde kofaktör olarak görev yaparlar [15,16]. Bu ifade edilen metallerin bazıları eser miktarlarda canlıların normal fizyolojik fonksiyonları için gereklidir [17].

Ağır metaller kayaçların ve dolayısıyla toprakların doğal bileşenleridir ve topraklar bileşimlerine bağlı olarak farklı oranlarda ve formlarda ağır metal içerirler. Çizelge 1.1'de yer kabuğunda en bol bulunan 12 element ile daha az bulunan bazı elementler gösterilmiştir. En bol bulunan bu 12 elementin toplam kütlesi, yer kabuğu kütlelerinin % 99.4'ü kadardır [18]. Ağır metallerin bolluğunun temeli, fizyolojik durumlarına bağlı olarak çözünürlük ve toksisitedir. Metallerin indirgenmesini 3 grupta inceleriz. Ağır metaller; önemli düşük toksisiteli iz elementler, orta önemlilikteki toksik iz elementler ve sınırlı faydası olan toksik elementler olarak üç gruba ayrılması mümkündür. Ağır metaller biyolojik proseslere katılma derecelerine göre yaşamsal ve yaşamsal olmayan olarak sınıflandırılırlar. Yaşamsal olarak tanımlananların organizma yapısında belirli bir konsantrasyonda bulunmaları gereklidir ve bu metaller biyolojik reaksiyonlara katıldıklarından dolayı düzenli olarak besinler yoluyla alınmaları zorunludur. Örneğin bakır hayvanlarda ve insanlarda kırmızı kan hücrelerinin ve birçok oksidasyon ve redüksiyon prosesinin vazgeçilmez parçasıdır [14]. Buna karşın yaşamsal olmayan ağır metaller çok düşük konsantrasyonda dahi biyolojik yapıyı etkileyerek sağlık problemlerine yol açabilmektedirler. Bu gruba en iyi örnek kükürtlü enzimlere bağlanan civadır [15].

Bir metalin toksisitesi, makromolekül, metabolit ve hücre organelleriyle birlikte biyolojik sistemlerdeki dinamik yaşam proseslerine zarar verme kapasitesine dayanır. Örneğin; heksavalent krom (Cr^{+6}) trivalent kroma (Cr^{+3}) göre daha toksiktir [16,17]. Krom üç bileşiklerini kullandığı işletmelerde çalışan insanlarda kanser vakalarına rastlanmamıştır, ayrıca Cr^{+3} ile yapılan testlerde deney hayvanları üzerinde herhangi bir negatif etki gözlenmemiştir. Kimyasal ve biyolojik olarak kararlı özellik gösteren Cr^{+3} (oksidant değildir, tahrip edici değildir, hücre zarına geçmez.) kanserojen bir madde olarak düşünülmemektedir. Ancak Cr^{+6} hücre zarından kolaylıkla geçerek Cr^{+3} 'a indirgenir. Heksavalent kromun biyolojik etkisi bu indirgenme reaksiyonundan kaynaklanır. Cr^{+6} hücre içindeki öğelere Cr^{+3} gibi bağlanarak bu

öğelerin fonksiyonlarına zarar verdiği ve bu redüksiyonun toksik özellik taşıdığı varsayılmaktadır [18].

Bir ağır metalin yaşamsal olup olmadığı dikkate alınan organizmaya da bağlıdır. Örneğin, nikel bitkiler açısından toksik etki gösterirken, hayvanlarda iz elementi olarak bulunması gerekir. Bazı sistemlerde ağır metallerin etki mekanizması derişime bağlı olarak değişir. Örneğin, krom başta insan bünyesinde olmak üzere, canlı organizmalardaki davranışı oksidasyon kademesine, oksidasyon kademesindeki kimyasal özelliklerine ve bulunduğu ortamdaki fiziksel yapısına bağlıdır. Bu tür organizmalarda metallerin derişimi dikkate alınmalıdır. Örneğin, metaller mikroorganizmaların yaşamlarında önemli roller alırlar. Kalsiyum, kobalt, krom, bakır, demir, potasyum, magnezyum, sodyum, nikel ve çinko gibi bazı metaller ihtiyaç duyulan besinler olduğundan gereklidirler. Bunların dışında kalanların (gümüş, alüminyum, kadmiyum, kurşun ve civa) herhangi bir biyolojik fonksiyonları yoktur. Hücre için en önemli olan metaller, enzimlerin yapısına katılarak önemli biyokimyasal reaksiyonların katalizlenmesinde rol alırlar. Bazıları proteinlerin yapısına katılır, bazıları da bakteri duvarında yer alarak ozmotik balansın korunmasında görev yapar [19,20].

Demir, bakır ve nikel gibi metaller redoks prosesinde görev yaparlar. Bunun dışında magnezyum ve çinko gibi çeşitli enzimleri ve DNA'yı stabilize eder. Demir, magnezyum, nikel ve kobalt çok çeşitli fonksiyonları olan kompleks moleküllere katılırlar. Sodyum ve potasyum, intraselüler ozmotik basıncın düzenlenmesi için gereklidir. Metaller yüksek derişimlerde olduklarında mikroorganizmalar ve diğer organizmalar için toksiktir. Toksikite gerekli metallerin kendi doğal bağlanma yerlerinin değiştirilmesi sonucu gerçekleşmektedir [19].

1.1.3.1. Demir

1.1.3.1.1. Demirin Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları

Demir, modern endüstrinin temel hammaddesi olup, yerkabuğunun % 5.1'ini teşkil ederek, oksijen, silisyum ve alüminyumdan sonra en çok bulunan dördüncü element durumundadır. Ancak, çok değişik bileşikler halinde mevcut olan demirin ekonomik olarak başlıca manyetit ve hematit, daha az oranda da limonit ve siderit cevherlerinden üretimi mümkün olabilmektedir [21]. Metaller arasında en çok kullanılan demir ve çelik günlük yaşantımızın her alanında karşımıza çıkmaktadır. Günümüzde sanayinin temel hammaddesini oluşturmakta ve ülkelerin ekonomilerinde önemli roller oynamaktadır. Dünyada demir cevheri rezervlerinin 167 milyar ton olarak bilinmektedir. Demir cevherleri doğada Manyetit (Fe_3O_4), Hematit (Fe_2O_3), Limonit ($2Fe_2O_3 \cdot 2H_2O$), Götit ($Fe_2O_3 \cdot H_2O$), Siderit ($FeCO_3$) ve Pirit (FeS_2) mineralleri şeklinde bulunmaktadır [22].

1.1.3.1.2. Demirin Fizyolojik ve Toksik Etkileri

Demir eser elementi, canlı fonksiyonları için gerekli bir eser element olup insan vücudunda toplam 4 g kadar bulunmakta ve eksikliğinde ciddi sorunlarla karşılaşabilmektedir [23]. Bu sebeplerden dolayı toprak, bitki ve gıda örneklerinde ağır metallerin tayini ve konsantrasyonlarının izlenmesi büyük önem taşımaktadır. Canlı organizmaların birçok biyokimyasal olayında demir oldukça önemlidir. Solunum ve hücre bölünmesi gibi çok önemli hücresel olaylarda proteinlerin bir bileşeni olarak, terleme ve fotosentez gibi önemli biyolojik olayların indirgeme aşamalarında ve klorofil biyosentezinde görev alır [24].

İnsanın beslenmesi için gerekli olan demir, vücutta; hemoglobinin ve çeşitli enzimlerin yapısında yer almaktadır. Hemoglobinin yapısında yer alan demir atomları, oksijenin vücut dokularına ve kaslara taşınmasında rol oynamaktadır. Fe^{+2} iyonları hücre içinde proteinlere bağlı bulunmakta ve böylece birçok bileşenin

parçalanma reaksiyonlarında ve çeşitli oksidasyonlarda görev almaktadır. Aşırı demir alımı vücut dokularının zarar görmesine özellikle karaciğerde yapısal bozukluklara sebep olmaktadır. Diğer yandan vücutta aşırı demir birikmesi hemochromatosis ve hemosiderosise yol açarak siroz hastalığına ve pankreatik diyabete neden olmakta; kanser ve kalp hastalığı riskini arttırmaktadır [25].

1.1.3.2. Bakır

1.1.3.2.1. Bakırın Özellikleri ve Kullanım Alanları

Atmosfer koşullarında metalik gri tonunda bulunmayan 2 metalden biri olan bakır, M.Ö. 5000 yılından beri tanınmaktadır ve adını ilk bulunduğu yer olan Kıbrıs'ın Latincesinden (aes cyprium, Kıbrıs cevheri, Cyprium ve daha sonra Cuprum) almıştır [26,27]. Endüstride bakırın önemli rol oynamasının ve çeşitli alanlarda kullanılmasının nedeni çok farklı özelliklere sahip olmasıdır. Bakırın en önemli özelliklerinin arasında yüksek elektrik ve ısı iletkenliği, aşınmaya ve korozyon direnci, çekilebilme ve dövülebilme özellikleri sayılabilir. Ayrıca alaşımları çok çeşitli olup endüstride (otomotiv, basınçlı sistemler, borular, vanalar, elektrik santralleri ve elektrik, elektronik vb.) değişik amaçlı kullanılmaktadır [27,28].

Bakır genel kimyasal özelliklerinden dolayı doğaya yayılımı açısından "Atmofil" (hava sever) grupta yer almasına rağmen, havada bulunan bakır konsantrasyonu üretim yapan sanayi birimine uzaklığına bağlıdır. Bakır "Lithofil" (kaya sever) elementler gibi suda çözünerek geniş bir alana dağılılabılır. Bu nedenle de çevresel açıdan iki grubun arasında değerlendirilir. Atmosfere yayılan bakırın ancak % 1'i biyolojik kullanılabilir iyon halinde kalırken diğer kısım sedimente olarak çökelir [29]. Tarımsal kesimlerde havadaki ortalama bakır konsantrasyonu 5 to 50 ng/m³ iken endüstriyel kirlenmemiş bölgelerdeki deniz suyundaki bakır konsantrasyonu 0.15 µg/L ve tatlı suda ise 1-20 µg/L'dir. Doğal suların pH değerine bağlı olarak çözünürlük sınırındaki azalma sonucu suların dibinde çökelir ve doğal yeraltı tatlı suların çökeleklerinde yaklaşık 16-5000 mg/kg (kuru ağırlık) arasında ve deniz

dibinde ortalama 2-740 mg/kg (kuru ağırlık) bakır bulunur. Kirletilmemiş toprakta bakır konsantrasyonu ortalama 30 mg/kg (sınır değeri 2-250 mg/kg) seviyelerindedir [27].

1.1.3.2.2. Bakırın Fizyolojik ve Toksik Etkileri

Bakırın bitkiler ve canlılar üzerindeki etkisi, kimyasal formuna ve canlının büyüklüğüne göre değişir. Küçük ve basit yapılı canlılar için zehir özelliği gösterirken büyük canlılar için temel yapı bileşenidir. Bu nedenle bakır ve bileşikleri fungusit, biyosit, antibakteriyel madde ve böcek zehri olarak tarım zararlılarına ve yumuşakçalara karşı yaygın olarak kullanılır [30]. Örneğin % 1-20 CuSO₄ içeren kireç sütü karışımı “Bordo-Karışımı” olarak bilinir ve üzüm tarımında fungusit olarak kullanılır. Hastanelerde kapı kolları ve elle sıkça temas edilen bölgeler bakır alaşımlarından imal edilen malzemelerden yapılır ve malzemenin antiseptik özelliğinden yararlanılarak mikropların yayılması engellenir. Bakır doğada pek çok sebze ve meyvede bulunur. Örneğin elmada ortalama 0.1-2.3 mg/kg bakır mevcutken, kuru erikte bu değer 3.7-5.0 mg/kg’ a çıkar, ay çekirdeğinde ise 14.3-19 mg/kg bakır bulunur. Anne sütü ortalama 200-400 µg/L bakır içerir ve bebek ağırlığı başına 50 µg bakır alır. Bakır eksikliğine bağlı olarak hayvanlarda ve insanlarda büyümede gecikme, solunum sisteminde enfeksiyonlar, kemik erimesi, anemi, saç ve deride renk kaybı gibi rahatsızlıklar kendini gösterirken, bakır bilezikler eklemlerin kireçlenmesine ve romatizmaya karşı kullanılır [27-31].

Bakır vücut fonksiyonları açısından önemli olmakla beraber özellikle saç, deri esnek kısımları, kemik ve bazı iç organların temel bileşenidir. Erişkin insanlarda ortama 50-120 mg bulunan bakır, amino asitler, yağ asitleri ve vitaminlerin normal koşullarda metabolizmadaki reaksiyonlarının vazgeçilmez ögesidir. Birçok enzim ve proteinin yapısında bulunan bakır, demirin fonksiyonlarını yerine getirmesinde aktivatör görevi üstlenir. Bakır eksikliğinde hayvanlarda anormallikler, kansızlık, kemik hataları ve sinir sisteminde bozukluklar tespit edilmiştir [30].

Bakır elementi kollojen sentezini içeren insan vücudunda 30 enzimden daha fazla bileşenin aktivasyonunda gerekli elementlerdendir. Diğer yandan yüksek konsantrasyonda insan sağlığına kansızlık ve karaciğer tahribiyeti, sindirim rahatsızlığı ve bağırsak tahrişine sebep olacak şekilde yan etkiye sebep olur. Bakır, demir elementine benzer şekilde yağların peroksida olması ve ileri derecede oksidasyonuna sebep olduğu rapor edilmiştir [25].

1.1.3.3. Krom

1.1.3.3.1. Kromun Özellikleri ve Kullanım Alanları

İlk kez 1789'da Fransız L. N. Vauquelin'in tarafından üretilmiş ve çok renkliliğinden dolayı Yunanca renkler anlamına gelen krom olarak adlandırılmıştır. Günümüzde özellikle alaşım elementi olarak kullanılmaktadır [32]. Krom paslanmaz çeliğin ana hammaddesidir. Paslanmaz çelik ve özel alaşım çelikleri özellikle havacılık endüstrisi, otomotiv, petrokimya, inşaat sektörü, mutfak eşyaları vb. çevremizde gördüğümüz hemen hemen her alanda kullanılmaktadır [33].

Krom içeren minerallerin endüstriyel oksidasyonu ve fosil yakıtların, ağaç ve kağıt ürünlerin yanması neticesinde doğada altı değerlikli (hekzavalent) krom oluşmaktadır. Okside krom havada ve saf suda nispeten kararlı iken ekosistemdeki organik yapılarda, toprakta ve suda üç değerliğe geri redüklenir. Kromun kayalardan ve topraktan suya, ekosisteme, havaya ve tekrar toprağa olmak üzere doğal bir dönüşümü vardır. Ancak yılda yaklaşık olarak 6700 ton krom bu çevrimden ayrılarak denize akar ve okyanus tabanında çöker. Krom, metal alaşımlandırmada ve boyalar, çimento, kağıt, kauçuk ve diğer malzemeler için pigment olarak kullanılmaktadır [32].

1.1.3.3.2. Kromun Fizyolojik ve Toksik Etkileri

Kromun başta insan bünyesinde olmak üzere canlı organizmalardaki davranışı oksidasyon kademesine, oksidasyon kademesindeki kimyasal özelliklerine ve bulunduğu ortamdaki fiziksel yapısına bağlıdır. Günde ortalama krom alımı ortalama 30-200 µg'dır. Bu oranda alınan kromun toksikolojik bir etkisi yoktur ve yetişkin bir insanda günlük krom ihtiyacını karşılar. Günde 250 µg' a kadar alınan kromun vücut sağlığına zararı yoktur. Yaklaşık olarak alınan Cr⁺³'ün % 0.5-3'ü vücut tarafından adsorbe edilirken Cr⁺⁶'nın sindirim sistemindeki adsorbsiyonu Cr⁺³'ün 3-5 kat (yaklaşık % 3-6 Cr⁺⁶) daha fazladır. Adsorbe olan krom genelde üre bileşiği olarak atılır ve günlük atılan krom 0.5-1.5 µg olup bu da günlük alınan kroma yaklaşık olarak eşittir. Çözeltideki krom deri tarafından hemen adsorbe edilir ve kırmızı kan hücreleri vasıtasıyla böbreklere gider ve dışarı atılır [26,34]. Günlük alınan krom miktarı tüketilen besin maddeleri ile ilintilidir. Et, hububat, bakliyat ve baharatlar en iyi krom kaynağıdır. Süt ürünleri, pek çok sebze ve meyve ise az miktarda krom ihtiva eder. İnsan vücudundaki krom eksikliği, şeker hastalığı olarak kendini gösterir [31]. Krom eksikliği, kurşunun toksikliğini arttırırken, biyolojik sistemlerdeki aşırı Cr⁺⁶ farklı tipte kanser oluşumuna sebep olmaktadır. Kromat bileşen en genel alerjen maddedir. Ancak krom kaynaklı cilt kanserine rastlanmamıştır. Pek çok araştırma sonucunda, solunum ve deri teması sonucunda kroma maruz kalan kişilerin sağlık sorunu ile karşılaştıkları tespit edilmesine rağmen kesin sınır değerleri belirlenmemiştir. Cr⁺⁶'nın hava yoluyla vücuda alınması ile burun akmaları, burun kanamaları, kaşınma ve üst solunum yollarında delinmelerin yanı sıra kroma karşı alerji gösteren insanlarda da astım krizleri görülmektedir. Cr⁺³'ün hava ile alınması solunum yollarına Cr⁺⁶ kadar negatif etki yapmamaktadır. Yetişkin bir insan için ağızdan alınan öldürücü doz 50-70 mg Crⁿ⁺/kg'dır [26].

Hekzavalent krom (Cr⁺⁶) trivalent kroma (Cr⁺³) göre daha toksiktir [32,31]. Krom üç bileşikleri kullanılan işletmelerde çalışan insanlarda kanser vakalarına rastlanmamıştır, ayrıca Cr⁺³ ile yapılan testlerde deney hayvanları üzerinde herhangi bir negatif etki gözlenmemiştir. Ancak Cr⁺⁶ hücre zarından kolaylıkla geçerek Cr⁺³'a indirgenir. Hekzavalent kromun biyolojik etkisi bu indirgenme reaksiyonundan

kaynaklanır. Cr^{+6} hücre içindeki ögelere Cr^{+3} gibi bağlanarak bu ögelerin fonksiyonlarına zarar verdiği ve bu redüksiyonun toksik özellik taşıdığı varsayılmaktadır [26]. Yüksek dozda Cr^{+6} bileşiklerinin alımına bağlı olarak şiddetli ve sıklıkla ölümlerle sonuçlanan patolojik değişimler ortaya çıkar. Günlük doz sınırları içinde alınan Cr^{+3} bileşiklerinin insanlara veya hayvanlara zararları görülmemiştir. Altı değerlikli krom bileşikleri deri, sindirim sistemi ve akciğerler için temas ettikleri durumlarda tahriş edici ve korozyif özellik gösterirler. Hekzavalent krom bileşiklerinden en yaygın olanı kromik asittir (CrO_3). Kromik asit banyolarının, laboratuvar cam malzemelerinin ıslatılmasında ve temizlenmesinde kullanılmaktadır ve ortak laboratuvar koşullarında bu uygulama hayati risk oluşturmaktadır. Laboratuvar denemelerinde Cr^{+4} 'ün kanserojen özelliği tespit edilmiştir ve kanserojen etki özellikle bronş sisteminde etkindir. Kromatlaşma yapan ve krom üretiminde çalışan işçiler üzerinde yapılan araştırmalarda, cevherden dikromatların ($Cr_2O_7^{-2}$) üretilmesinde ve izolasyonunda çalışan işçilerde bronşit kanserinin arttığı tespit edilmiştir. Kanser oluşum mekanizması kesin olarak bilinmemekle beraber Cr^{+6} 'nın çift-iplikli deoksiribonükleik asit (DNA) ile bağlandığı kabul edilmektedir. Dolayısıyla, Cr^{+6} gen kopyalanmasını, onarımını ve duplikasyonunu değiştirmektedir. Düşük seviyelerde kroma maruz kalındığında, deride iritasyon ve ülser meydana gelir. Uzun süreli maruz kalındığında böbreklerde ve karaciğerde hasara yol açabildiği gibi kan dolaşım sistemini ve sinir dokularını tahrip edebilir. Krom daha çok sulu ortamlarda birikerek çoğalır. Dolayısıyla yüksek seviyelerde kroma maruz kalmış balık yemek oldukça tehlikelidir [26].

1.1.4. Bakterilerde Metal Dirençlilik Mekanizmaları

1.1.4.1. Geçirgenlik Bariyeri ile Metallerin Hücre Dışında Tutulması

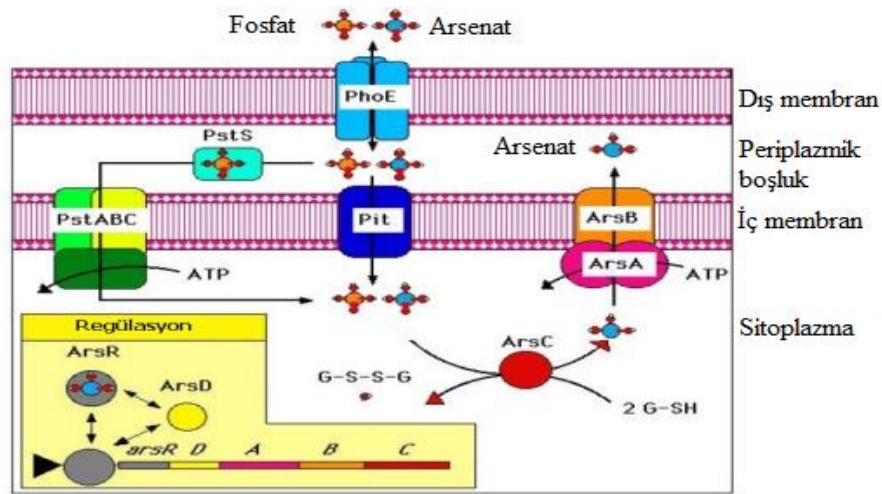
Hücre duvarında ya da hücre zarında metale karşı bir geçirgenlik bariyeri oluşturularak metaller hücre dışında tutulur. Böylece metale hassas hücresel komponentler korunmuş olur. Buna en güzel örnek *Escherichia coli*'deki Cu^{+2} dirençliliğidir. *E. coli*'de bir membran kanal proteini olan porin proteinlerinin üretimi

değiştirilerek Cu^{+2} 'nin hücreye girişi engellenir [35]. Bu tek bir gen mutasyonu sonucu membranın metal iyonlarına karşı permeabilitesinin azaltılması ile gerçekleşmektedir [36]. Diğer bir örnek, dış membran veya zarf tarafından spesifik olmayan metallerin bağlanmasıdır. Bu örnekler bağlayıcı yerlerin doygunluğu nedeniyle kısıtlı metal koruma sağlamaktadır. Tamamen ispatlanmasa da bakır dirençliliğinin bazı biçimlerinin periplazmik bağlayıcılık özelliği üzerine kurulu olduğuna inanılmaktadır [37]. Diğer taraftan mikroorganizmaların dış yüzeyini kuşatan ekstraselüler polisakkarit tabakası da metal iyonlarını absorblayarak hücre içine girişini engellemektedir [38]. Bu ekzopolisakkarit tabakasının metal iyonlarını bağlayıcı grupları vardır. Bu özellik *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas putida*, *Arthrobacter viscosus* gibi bakterilerde gösterilmiştir. Diğer bazı bakterilerdeki Cd^{+2} dirençliliği de böyledir. Ekzopolisakkaritten oluşan bir koruyucu tabaka Cd^{+2} çözeltilerinde *K. aerogenes* türlerinin hassasiyetini düzenlemektedir. Ekstraselüler koruyucu tabakası olmayan türlerde de Cd^{+2} birikimi ispatlanmıştır [39]. *K. aerogenes*'in ekstraselüler kapsülü kapsülsüz formlara benzediği zaman kadmiyumun 1 nM'nın girişini engelleyebilmektedir. *P. putida* et suyuna eklenen 2.5 mg/L derişimindeki Cd^{+2} 'nin tamamını bağlayabilmekte olduğu [38], *A. viscosus*'un türleri et suyuna 100 mg/L katıldığı zaman Cd^{+2} 'un 30 mg/g'ını biriktirebildiği rapor edilmiştir. Her iki durumda bağlayıcı özellik pH'ya bağımlıdır ve optimum pH 4-9 arasındadır. Ekzopolisakkarit tabaka tek başına Cd^{+2} bağlayıcılığında, ekstraselüler tabakası sağlam bir mikroorganizma gibi verimli değildir. Bu koruyucu tabaka, duyarlı hücrel bileşenler için metal iyonlarını tutarak alımı önlediği görülmektedir. *Pseudomonas sp.*'de bulunan bir operonda kodlanmış olan dört genin Cu^{+2} 'nin periplazmik bağlayıcı özelliğinin kodları olduğu bulunmuştur. Bunlar; *copA*, *copB*, *copC*, *copD*'dir. Cu^{+2} dirençliliği; *copA*, *copB* ile *copC*, *copD*'nin özelliklerinin toplamının eklenmesi şartıyla sağlanmaktadır. *copA* ve *copC* proteinleri iç ve dış membranlar arasında ve *copB* ise dış membranda bulunmaktadır. Bu proteinlerin lokalizasyonu, periplazmik bağlayıcı veya ekstraselüler alıkoyma her ikisinden dolayı direnç hipotezini destekler görünmektedir. *Staphylococcus aureus*'un bazı türlerinde, peniklinazın kodlarını bulunduran plazmidler, hücre membranı değişimi aracılığı ile Cd^{+2} geçirgenliğini engellemede diğer metaller kadar iyi direnç oluşturmada araç olabilmektedir. Bu durum metal iyonlarının girişini engellemek

için zardaki uyumsal değişimler olarak görülmektedir. Bu Cd^{+2} 'nin 0.01-0.1 nM seviyelerinde genelde düşük düzeyde direnç olarak görülür [40].

1.1.4.2. Metallerin Hücre Dışına Doğru Aktif Transporu

Aktif transport ya da akış sistemleri metal dirençlilik sistemleri arasında en yaygın olan mekanizmalardır. Mikroorganizmalar toksik metalleri sitoplazmalarından uzaklaştırmak için aktif transport mekanizmasını kullanırlar. Bu mekanizma, kromozomal ya da plazmid kodlu olabilir. Hücre için gerekli olmayan metaller hücreye normal besin transport sistemleri ile alınır, ancak hemen dışarıya atılır. Bu pompalama sistemleri ATPaz'a bağımlı yada ATPaz'dan bağımsız sistemler olabilir [41]. Bakterilerdeki arsenat, kadmiyum, bakır dirençlilikleri çoğunlukla bu tip dirençlilik mekanizmaları ile gerçekleşir. Örneğin arsenat dirençliliği için *ars* operonu aracılığı ile *E. coli* (Şekil 1.1) ve *S. aerous*'ta; Cd^{+3} direnç kodu *cad* operonu aracılığı ile *S. aureus*, *Bacillus* sp., ve *Listeria* sp'de, veya *Alcaligenes eutrophas*'ta *eze* operonu bulunmuştur. Pb^{+2} direnci *zntA* aracılığı ile *E. coli*'de ve *cadA* ise *S.aureus*'ta bulunmuştur. Bu tip dirençlilikte kromozomal plazmid ya da transpozon kodlu bazı genler rol oynamaktadır [36].



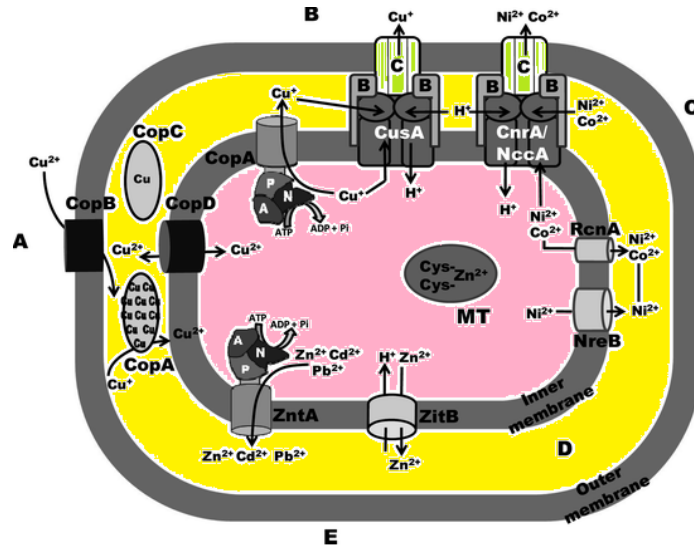
Şekil 1.1. *E. coli*'de arsenik'in hücre dışına aktif taşınımı [42]

Bakır mikroorganizmaların çoğu için gerekli bir besindir, bununla birlikte, (Cu^{+2}) serbest iyonik formu yüksek konsantrasyonlarda toksiktir. Bu çift etkinin ışığında, bakteriler orta seviyelerdeki hücre içi konsantrasyonlarda yaşayabilme yeteneğindedirler. *Pseudomonas syringae'* de bakırın tutulması da dahil diğer mekanizmalar tanımlanmasına rağmen bakır dirençlilik mekanizmalarının en iyi çalışılanı hücreden bakırın pompalanması sistemine dayanmaktadır. (Örneğin; *E. coli* ve *Enterococcus hirca*) [42]. Bakır dirençliliğinin başka bir potansiyel mekanizması, kapsülasyon aracılığı ile hücreden çıkarma yoluyla olmaktadır [43].

1.1.4.3. Metallerin Hücre İçine Alınması

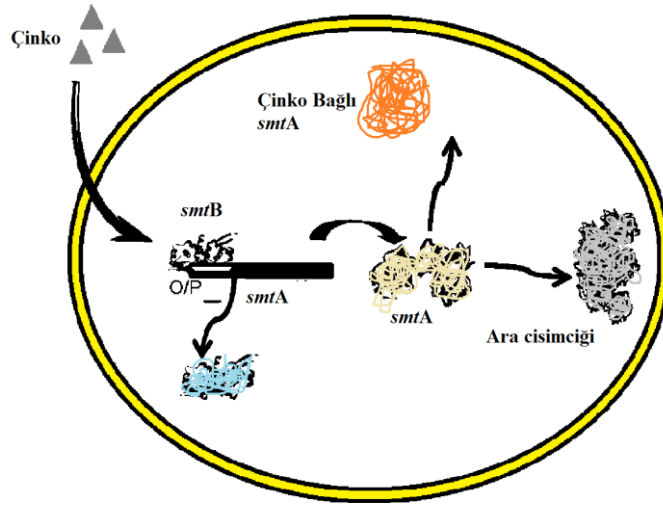
Hücre içi alıkonma, metallerin birikiminde sitoplazma içindeki gerekli olan hücresel bileşimlerin etkilenmesini engellemektedir. Bu mekanizma ile genellikle Cd^{+2} , Cu^{+2} ve Zn^{+2} metalleri alıkonmaktadır (Şekil 1.2). Bu tip metal dirençliliğine 2 örnek bulunmaktadır.

- Synechococcus* cinsinde metallothionein üretimi,
- Pseudomonas* cinsinde sistein bakımından zengin proteinlerin üretimi [44].



Şekil:1.2. Bakterilerde çinko dirençliliğinin mekanizması [45]

Synechococcus denizlerde yaşayan bir *Cyanobacteria*'dır. Bu mikroorganizmada *smtA* ve *smtB* olmak üzere iki gen bulunmaktadır (Şekil 1.3). Bunlardan *SmtA*, Cd^{+2} ve Zn^{+2} 'ye bağlanan bir metallothioneini kodlamaktadır. Bu gen yüksek düzeydeki Cd^{+2} , Zn^{+2} ve Cu^{+2} konsantrasyonlarında indüklenmektedir. *smtB* geni de *smtA* geninin repressörü olan *smtB* proteininin üretilmesinden sorumludur. Bu repressör protein metallothionein üretimini transkripsiyon aşamasında durdurmaktadır [46].



Şekil 1.3. *Synechococcus*'ta *smtA* ve *smtB* genleri ve Zn'yi bağlaması [46]

Prokaryotlarda metallothionein üretimi sadece *Synechococcus* türlerinde görülmektedir. Bu tip metallothionein ökaryotlardaki metallothioneinlerde bulunanlardan daha az sistein kalıntıları içermektedir. *SmtA*'daki metalothioneindeki sistein kalıntıları, çok zehirli katyonlar için bir azaltıcı olarak davranabilmektedir. Son zamanlarda *SmtB*'nin yapısı belirlenmiştir. *SmtB* proteini DNA'nın diğer bağlayıcı proteinlerine benzer motifli döner sarmal yapılı bir dimerdir. Yapı analizi proteinde dört Zn^{+2} bağlayıcı yer göstermektedir [47]. Metallerin hücre içinde alıkonmasına ilişkin diğer bir örnek de *P. putida*'da görülmektedir. Bu bakteri metallothioneinlere benzeyen 3 farklı sistein bakımından zengin protein

üretmektedir. *Mycobacterium scrofulaceum*'da siyah bakır sülfat formunun çökmesinde alıkoyma aracılığı ile hücre içi birikimi de ispatlanmıştır [37].

1.1.4.4. Ekstraselüler Alıkonma

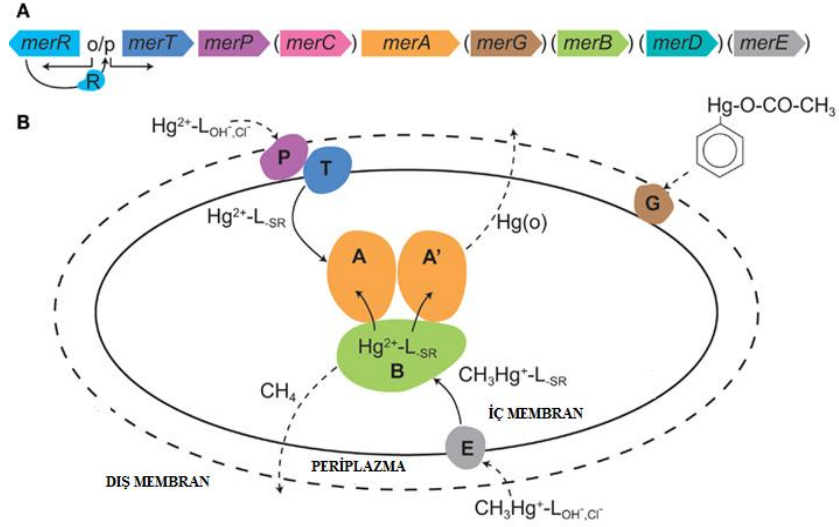
Bu tip metal dirençliliğinin önceleri sadece bakterilerde olduğu düşünölmüşse de, daha sonraları, maya ve funguslarda da bulunmuştur [48]. *Saccharomyces cerevisiae*'deki Ni^{+2} dirençliliğinin bu şekilde olduğu düşünölmektedir. *S. cerevisiae* fazla miktarda glutatyon üreterek Ni^{+2} absorpsiyonunu azaltabilmektedir. Glutatyon ağır metallere çok yüksek bir affinite ile bağlanmaktadır. Yapılan araştırmalar mayaların metalce zengin besi ortamlarına ekstraselüler glutatyon salgıladıklarını göstermektedir. Toksik metaller glutatyon ile birleşerek hücre membranından geçememektedir. Benzer bir mekanizmada Cu^{+2} dirençli mantarlarda görölmektedir [49]. Bu funguslar metal-okzalat formunda okzalat bileşikleri salgılamaktadırlar. Mayalar gibi diğer organizmalar ve *Citrobacter* sp. türleri kalsiyum fosfatın çözümez bileşik formlarına direnç göstermektedirler [56]. Maya formları hidrojen sülfid üretimi boyunca çeşitli kompleksler kullanırken *Citrobacter* sp. fosfat kullanmaktadır. *K. aerogenes*'in bir türü sülfür çıkararak sınırlı miktardaki metali içeri alırken, yakınında dış çöktürme aracılığı ile Cd^{+2} iyonlarını etrafını çevreleyen ortamdaki kaldırma yeteneğini göstermektedir [38,50].

1.1.4.5. Enzimatik Detoksifikasyonla Metallerin Daha Az Zararlı Fonksiyonlara Dönüştürölmesi

Tanımlanmış olan birçok bakteriyel ağır metal dirençliliği içinde, civa dirençliliği en iyi incelenmiş olanıdır. Civa geniş bir yayılma alanına sahiptir ve diğer ağır metal dirençliliklerinden farklıdır, civa dirençli mikroorganizmaların izole edildikleri yerler ile memelilerin florası hemen hemen aynıdır [51]. Civa dirençlilik mekanizması için yapılan çalışmaların çoğu reaktif iyonik Hg^{+2} formundan elementel ve daha az reaktif Hg^0 formuna detoksifikasyonuna bağlıdır. Bazı civaya dirençli bakteriler civaya

geniş spektrumlu dirençli esas bileşiklere sahiplerdir [51]. Detoksifikasyona ilave olarak, civa bileşiklerinin tutulması ve dimetillenmesi ile hücrel geçirgenliğin azalmasından dolayı civa iyonlarının alınımının azaldığı rapor edilmiştir [52]. Mikroorganizmalarda enzimatik detoksifikasyonun en iyi örneği civa dirençliliğidir. Bu dirençlilik tipi hakkında diğerlerine nazaran çok daha fazla bilgi mevcuttur. Gerek gram pozitif gerekse de gram negatif bakterilerde Hg^{+2} 'ye karşı dirençlilik gösterilmiştir [53]. Civa hücrede enzimlerin ve proteinlerin yapılarında bulunan tiyollere bağlanarak inaktive olmaları nedeni ile toksik etkiye sahiptir. Bazı bakterilerde Hg^{+2} dirençliliği ile ilgili genlerin yer aldığı *mer* operonu bulunmaktadır. Bu operon sadece Hg^{+2} 'nin detoksifikasyonundan değil aynı zamanda transferinden ve direncin ayarlanmasından da sorumludur [53,54]. Civanın bulunmadığı zamanlarda düzenleyici proteinler için operon kodları transkripsiyon düzenlenmesini azaltmaktadırlar. Bu genler bir periplazmik bağlayıcı proteinin üretimini ve membran bağlantılı taşıma proteinlerini de şifrelemektedirler. Detoksifikasyon için etrafını çevreleyen ortamdan periplazmik bağlayıcı proteinler ve taşıma proteinleri aracılığı ile Hg^{+2} 'yi sitoplazmaya taşımaktadırlar. Hg^{+2} dirençliliğinden sorumlu olan *mer* operonu aynı zamanda detoksifikasyonda kullanılan 2 enzimi de kodlamaktadır. Bu enzimler; organomerküriyal liyaz, merkürük redüktaz'dır [53,55].

Organomerküriyal liyaz, stabil durumdaki civa-karbon bağı üzerine etki etmektedir. Enzim kofaktöre gerek olmaksızın sistein sülfhidril kalıntılarının bulunduğu aktif bölgesi ile Hg^{+2} 'ye bağlanmaktadır. Enzimin ürünü civa tiyolattır. Merkürük redüktaz elektron taşıyan NADPH'tan flavine hidrid taşımayı gerektiren bir yöntem ile Hg^{+2} 'yi Hg^0 'a indirgemektedir [53]. Metalik civa hücre zarı ve etrafını çevreleyen ortam arasında difüze olarak dışarı verilir (Şekil 1.4). Mikroorganizmalarda civa direnci dar spektrum ve geniş spektrum olmak üzere iki kategoride olabilir. Dar spektrumlu organizmalar organomerküriyal enzim kodlu genden yoksundurlar ve bu nedenle, bu organizmaların çoğu organomerküriyal enzim kodlu dirence sahip değildirler. Geniş spektrumlu organizmalar hem enzimleri hem de yüksek oranlarda civa içereFn bileşiklere dirençliliğin her ikisini de içermektedirler. *Mer* operonu kapsamlı olarak birkaç mikroorganizmanın plazmidlerinde çalışılmıştır ve beş-altı genden oluştuğu saptanmıştır [56].



Şekil 1.4. Gram negatif bakterilerde Hg⁺² 'ye enzimatik detoksifikasyon ile metal dirençliliği [57]

1.1.4.6. Hüresel Komponentlerin Metale Olan Hassasiyetlerinin Azaltılması

Bazı mikroorganizmalar toksik metallerin varlığında, hüresel komponentlerin metale olan hassasiyetlerini değiştirerek adaptasyon sağlamaktadır [36]. Hücre bunu ya mutasyonlar yolu ile belli bazı proteinlerin hassasiyetlerini azaltmak sureti ile ya da metal inaktivasyonunda kullanılan belli bazı hüresel komponentlerin üretimini arttırmak sureti ile gerçekleştirmektedir. DNA tamir mekanizmaları plazmid ve genomik DNA ile sınırlı koruma sağlamaktadır. Bir de mikroorganizmanın ürettiği metal dirençliliği olan komponentler veya alternatif yollar, duyarlı komponentlerden geçen bir özellik ile kendi kendini koruyabilmektedir. Adaptasyon *E. coli*'de de bulunmuştur. Adapte olmamış *E.coli* Cd⁺²,a maruz kaldığında önemli DNA hasarları olduğu bildirilmiştir, ayrıca aynı organizmaların alt kültürlerinde direnç görülmüştür [40]. Cd⁺²,ye maruz bırakılan organizmaların büyüme fazının kısaldığı rapor edilmiştir. Uygun bir başlatıcı olarak DNA tamir mekanizmasının, görevinin bir parçası olarak lag fazın uzatılmasında görev aldığı varsayılmaktadır. Doğal direnç, toleransın temel bir seviyede olmasına izin veren normal hüresel işlevlerden

meydana gelebilmektedir [36]. Glutasyon Ag^+ , Cu^+ , Cu^{+2} , Cd^{+2} ve Hg^{+2} gibi metallere koruması için bir örnek teşkil etmektedir [55]. Glutasyon serbest radikalleri bağlayarak Cu^{+2} ve Fe^{+2} 'den korumayı sağlayabilmektedir [36]. Gram negatif ve gram pozitif bakterilerde bulunan dirençlilik yetenekleri arasında farklılıklar bulunmaktadır [35]. Cd^{+2} 'nin varlığında protein sentezi gram negatif bakterilerde, gram pozitiflerden çok daha iyidir. *Pseudomonas*'ın bir türü gram pozitif bakterilerin (*S. aureus*, *S. faecium*, ve *B. subtilis*) protein sentezinin % 50 azaldığı Cd^{+2} 'nin konsantrasyonlarının 5-30 katına kadar dirençlilik göstermektedir. Gram pozitif organizmalar *E. coli* ile karşılaştırıldıklarında 28-30 kez daha fazla Cu^{+2} bağlayabilmektedir [58].

1.1.5. Biyosorpsiyon

Endüstriyel atıklardaki boya ve metal iyileştirilmesi için geliştirilen teknikleri abiyotik ve biyotik metotlar olmak üzere iki ana sınıfta incelemek mümkündür. Abiyotik metotlar; presipitasyon, adsorpsiyon, iyon değişim, membran ve elektrokimyasal teknolojilerdir. Bu metotların bir çoğu pahalı, çevre dostu olmayan ve genellikle atığın konsantrasyonuna bağlı teknolojiler olduğundan uygulamada fazla rağbet görmemektedir. Günümüzde daha etkili, ekolojik anlamda dost ve ucuz yöntemler araştırılmaktadır [59].

Abiyotik sistemler yüksek enerji gereksinimi, yüksek maliyet nedeni ile özellikle sucul ekosistemlerdeki metallerin uzaklaştırılması için uygun görülmemektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar atıkların iyileştirilmesi için ticari ölçekte biyolojik metotlar üzerine yoğunlaşmıştır. Biyosorpsiyon bu dezavantajları taşımadığından daha çok tercih edilmektedir. Biyolojik materyaller kullanılarak atık suların ya da topraktan ağır metallerin metabolizma aracılığı ile biriktirilmesi için fizikokimyasal yollarla alınması olarak tanımlanan biyosorpsiyon için, yaygın olarak kullanılan biyosorbentler ise algler, bakteriler ve mayalardır [60,61].

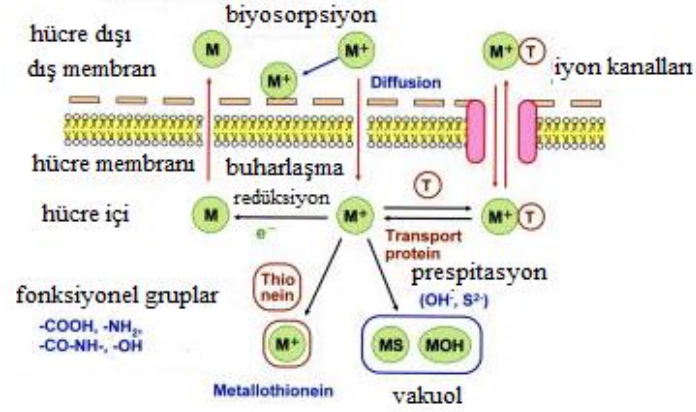
Biyolojik yöntemlerin avantajlarından biri de kirlenmiş bölgelerde *in situ* uygulamaya izin vermesi, diğeri ise biyoproses teknolojilerinin çevresel olması yani

ikinci bir kirliliğe neden olmamaları ve etkili yöntemler arasında yer almasıdır [59]. Bunların dışında düşük maliyet, yüksek verim, ek besinlere gereksinim olmaması, biyosorbentın rejenerasyonu, metalin geri kazanılma ihtimali de avantajları olarak görülmektedir [28].

Metal giderimi için kullanılan biyosorbentler arasında bakteriler, mayalar, siyanobakteriler, funguslar, algler, endüstriyel ve tarımsal atıklar ile polisakkarit yapısındaki diğer maddeler bulunmaktadır. Belirli mikroorganizmaların metal iyonlarına karşı güçlü biyosorbent olması mikrobiyal hücrelerin kimyasal yapısından kaynaklanmaktadır. Bu tür biyosorbentler ölü ve metabolik olarak inaktif hücrelerdir. Bazı biyosorbentlerin biyosorpsiyon aralığı geniştir, bu tür biyosorbentler çoğunlukla ağır metalleri spesifik etkinlik olmadan bağlar ve biriktirirler. Bazıları ise belirli metallere karşı spesifiktirler [61].

1.1.5.1. Bakterilerde Biyosorpsiyon Mekanizmaları

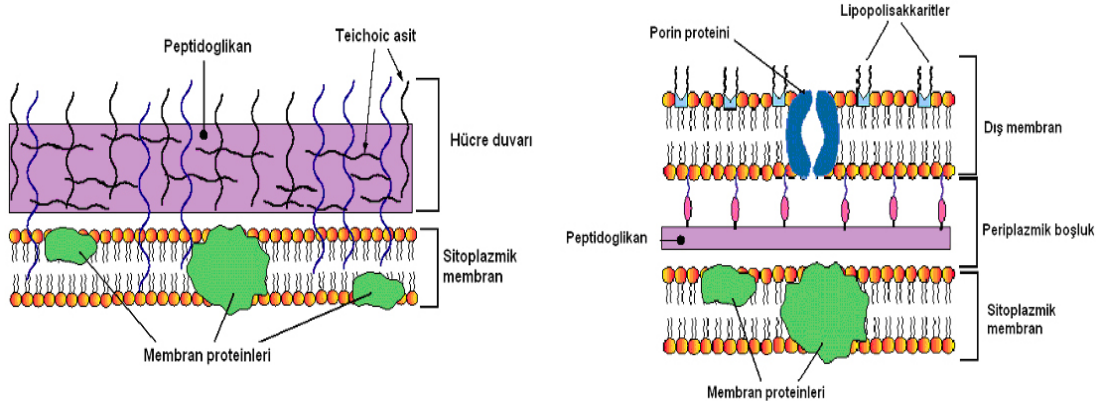
Biyosorpsiyon mekanizmaları mikroorganizma yapılarının kompleks olması nedeni ile çeşitlilik göstermektedir. Bu mekanizmalar 2 ana başlık altında toplamak mümkündür [51]. Şekil 1.5 'de bakteriyal biyokütlelerde biyosorpsiyon mekanizmaları özetlenmektedir



Şekil 1.5. Bakterilerde biyosorpsiyon mekanizmaları [51]

Metal ve hücre yüzeyindeki fonksiyonel gruplar arasındaki fizikokimyasal etkileşim sırasında fiziksel adsorpsiyon, iyon değişimi ve kompleks oluşumu gerçekleşir. Buna hücre yüzeyinde sorpsiyon denir ve metabolizmadan bağımsızdır. Mikrobiyal biyokütlenin hücre duvarı büyük oranda polisakkarit, protein ve yağlar içerir, çok sayıda metal bağlama fonksiyonel grubuna sahiptir. Bu gruplar; karboksilik, hidroksil, sülfat, fosfat ve amino gruplarıdır. Bu fizikokimyasal metal biyosorpsiyonu, metabolizmadan bağımsızdır ve nispeten hızlıdır; alglerde 5-10 dakika içerisinde gerçekleşir [62-64] ve metaller geri kazanılabilir [65,66]. Metal bağlama süreci iki basamakta gerçekleşmektedir. Birinci basamak, hücre duvarında metal ve reaktif kimyasal gruplar arasında sitokiyometrik etkileşimdir. İkincisi ise artan metal miktarlarının inorganik birikimidir. Bakteri hücre duvarı, metal iyonları ile temasta bulunan ilk bileşendir. Ölü veya inaktif hücre ile metal sorpsiyonunun tipi ekstrasellüler olduğu için hücre duvarının kimyasal fonksiyonel grupları biyosorpsiyonda önemli rol oynamaktadır. Bakteri hücre duvarında bulunan fonksiyonel gruplar karboksil, fosfonat, amin ve hidroksil gruplarıdır [59]. Bakteri ve siyanobakterilerin hücre duvarları temelde peptid zincirleri ile birlikte N-asetilglukozamin (NAG) ve N-asetilmuramik asit (NAM) disakkaritlerini içeren peptidoglikan tabakadan meydana gelmiştir. Gram negatif bakterilerin hücre duvarı, gram pozitiflere nazaran daha ince olup, kuvvetli çapraz bağlara sahip değildir dış

zar lipopolisakkarit (LPS), fosfolipid ve protein tabakalarından oluşmaktadır [66]. Şekil 1.6 'da gram pozitif ve gram negatif hücre yüzeyi şematize edilmektedir



Şekil 1.6. Gram pozitif ve gram negatif bakteri hücre membranları [67]

Cd^{+2} biyosorpsiyonu açısından gram pozitif, gram negatif bakterileri karşılaştırmışlar ve gram pozitif bakteri hücre duvarlarında bulunan glikoproteinlerin, LPS ve fosfolipidlerden daha fazla Cd^{+2} 'yi bağlama bölgesine sahip olduğunu ayrıca her iki grubun da metal bağlama açısından farklı kapasitelere sahip olduklarını rapor etmişlerdir. Bakteri hücre duvarlarının yapısında sadece bu yapılar metal bağlama görevi yapmazlar; bundan başka gram pozitiflerde teikoik asit ve teikronik asitte metal bağlamada önemli rol oynamaktadır. *E. coli* dış zarında bulunan fosfolipid ve LPS'nin sahip olduğu fosforil grupları da metal katyonlarının bağlanabileceği muhtemel bölgeler arasında yer almaktadırlar [69]. *Streptomyces pilosus*'un karboksil gruplarının bakır bağlamadan sorumlu olduğu, bundan başka amin gruplarının da metal uzaklaştırmada etkili olduğu, katyonik metal iyonlarını şelatlamakla kalmayıp aynı zamanda hidrojen bağladığı ya da elektrostatik etkileşim sonucu anyonik metal türlerini ve boyaları adsorblayabildikleri rapor edilmiştir [69].

Günümüzde biyosorpsiyon mekanizmalarının anlaşılabilmesi için farklı yöntemler geliştirilmiştir. Mikrobiyal biyokütle üzerinde veya içerisinde metallerin yerleşimi elektron mikroskobu ve X-ışını enerji dağıtıcı (EDAX) analiz çalışmaları

kullanılarak anlaşılmaya çalışılmaktadır. Kimyasal analizi için X-ışını fotoelektron spektroskopisi kullanmaya başlanmış olup, atom ya da moleküllerde elektronların bağlanma enerjisini tayin eden yeni bir teknik atom/iyonun oksidasyon derecesi hakkında bilgi vermektedir. Bundan başka FTIR(Fourier Transform Infrared Spectroscopy) analizi de biyosorpsiyon mekanizması hakkında bilgi vermektedir [70].

1.1.6. Adsorbsiyon

Adsorpsiyon, birden fazla bulunan iyon ya da moleküllerin, bir diğer fazın yüzeyinde yoğunlaşması ve konsantre olması işlemi olarak tanımlanmaktadır. Çevre mühendisliği açısından en genel olarak bir kirleticinin bir fazdan başka bir faza taşınması olarak tanımlanabilir. Adsorpsiyon prosesi bir yüzey olayı olmasından dolayı adsorplama işlemi yapan katının yüzey özellikleri son derece önemlidir. Yüzey alanı ne kadar genişse o kadar iyi bir adsorban özelliği taşır. Diğer bir deyişle, bu fazdaki iyonlar ya da moleküller, çekim kuvvetlerince dengelenmiştir. Ancak adsorban yüzeyindeki atomların dengelenmemiş kuvvetleri, çözültideki maddeleri adsorban yüzeyine çekerler ve yüzey kuvvetleri dengelenmiş olur. Bu şekilde çözültideki maddelerin adsorban yüzeyine adsorpsiyonu gerçekleşir. Adsorpsiyon işleminde adsorplanan türlere adsorbant denir. Adsorbantlar bir ya da birden fazla sayıda olabilir. Yüzeyinde adsorpsiyon gerçekleşen madde ise (adsorbent) adsorbandır. Günümüzde adsorpsiyon birçok doğal fiziksel, kimyasal ve biyolojik işlemde önem taşımaktadır. Ayrıca adsorpsiyon prosesi, atık sulardaki organik ve kimyasal kirleticilerin uygun bir katı yüzey üzerine tutularak giderilmesi işleminde de sıklıkla kullanılmaktadır [71].

1.1.6.1. Adsorbsiyon İzotermi

Adsorpsiyon izotermi bir yüzeye adsorbe olan madde için denge şartlarını gösterir. Genel olarak, adsorbe olan madde miktarı, adsorplayan maddenin

konsantrasyonunun kompleks bir fonksiyonudur. Adsorpsiyon izotermi, adsorban yüzeyinde biriken madde konsantrasyonu ve çözültide kalan madde konsantrasyonu arasında bir denge oluşuncaya kadar devam eder [72]. Sabit sıcaklıkta adsorban tarafından adsorplanan madde miktarı ile denge basıncı veya konsantrasyonu arasındaki bağıntıya adsorpsiyon izotermi denir [73]. Adsorpsiyon izotermi, adsorbent üzerinde biriken adsorbantın miktarı ile sabit sıcaklıkta sıvı fazda kalan adsorbant konsantrasyonu arasındaki denge ilişkilerini açıklar. Adsorpsiyon izotermi, adsorpsiyonun arıtma prosesi olarak kullanılabilirliği hakkında bilgi verir [74]. Ağır metal iyonlarının biyosorbent yüzeyine bağlanması, adsorpsiyon izotermine uygunluk gösterir. Bunlardan en sık kullanılanları; Freundlich ve Langmuir izotermidir [72].

1.1.6.1.1. Langmuir İzotermi

Langmuir izotermi, katı yüzeyler üzerinde aktif adsorpsiyon alanlarında meydana gelen tutulmanın fiziksel ya da kimyasal adsorpsiyon olup olmadığını diğer izotermelere göre daha iyi açıklamaktadır. Langmuir izotermi, adsorpsiyon, adsorplanan maddenin başlangıç konsantrasyonu ile birlikte doğrusal olarak artar. Maksimum doyma noktasında, yüzey tek tabaka ile kaplanmakta ve yüzeyde tutulmuş madde miktarı sabit kalmaktadır. Adsorpsiyon hızı, adsorplanacak madde konsantrasyonu ve yüzey üzerinde bulunan boş adsorpsiyon alanları ile doğru orantılıdır. Desorpsiyon hızı ise yüzeydeki adsorplanmış molekül sayısı ile doğru orantılıdır [74]. Bu kabullerden yola çıkarak Langmuir aşağıdaki eşitliği ortaya koymuştur.

$$q_e = X/M = a \cdot b \cdot C / (1 + bC) \quad (1.1)$$

$$x = C_o - C_e \quad (1.2)$$

Burada;

$q_e = X/M =$ Birim adsorplayıcı ağırlığı başına adsorplanan madde miktarı, (g/g)

a = Birim adsorplayıcı ağırlığı başına tek sıralı filmde tutulan mol sayısı ile ilgili sabit

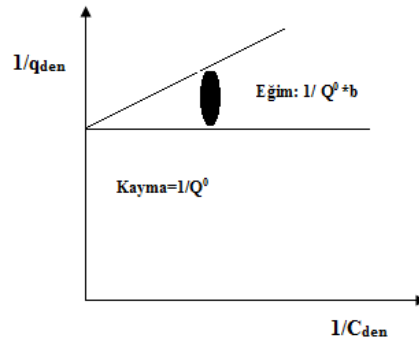
b= Enerji ile ilgili sabit

C = Adsorpsiyondan sonra çözültide kalan madde derişimi (mg/L)

Langmuir adsorpsiyon izotermi linerize edilmiş şekli ile;

$$C/q_e = C/(X/M) = 1/a.b + C/a \text{ veya } 1/q_e = 1/(X/M) = 1/a + (1/a.b) (1/C) \quad (1.3)$$

denklemini elde edilir. C ye karşı C/(X/M) değerleri veya 1/C ye karşı 1/(X/M) değerleri kullanılarak elde edilen bu grafikler yardımı ile a ve b değerleri hesaplanabilir [74].



Şekil 1.7. Langmuir İzotermi [74]

Langmuir modelinden elde edilen a ve b değerlerinin büyüklüğü iyi bir biyosorpsiyona işaret etmektedir [74].

1.1.6.1.2. Freundlich İzotermi

Freundlich (1926), adsorpsiyon prosesini ifade eden bir ampirik eşitlik geliştirmiştir. Freundlich'e göre bir adsorplayıcı maddenin yüzeyi üzerinde bulunan adsorpsiyon alanları heterojendir. Diğer bir ifade ile farklı türdeki adsorpsiyon alanlarından oluşur. Freundlich izotermi aşağıdaki şekilde ifade edilir [71].

$$q_e = K_f \cdot C_e^{1/n} \quad (1.4)$$

q_e : Birim adsorban üzerine adsorblanan madde miktarı (mg/g)

K_f : deneysel olarak belirlenen adsorbsiyonun kapasitesini gösteren sabit

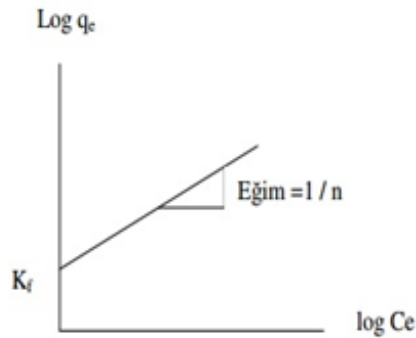
N : Adsorbsiyonun yoğunluğunu gösteren sabit (Freundlich izotermi sabiti)

C_e : denge halindeki çözültide adsorban (adsorbent) konsantrasyonu, (mg/L veya mol/L)

Freundlich denkleminin her iki tarafının logaritması alınırsa, eşitlik aşağıdaki biçimi alır:

$$\log q_e = \log K_f + 1/n \log C_e \quad (1.5)$$

Böylece, $\log q_e$ değerlerine karşı $\log C_e$ değerleri grafik üzerinde gösterildiğinde, eğer izoterm Freundlich izotermine uyuyorsa Şekil 1.7. gibi bir doğru elde edilir. Burada n ve K_f sabitleri doğrunun eğimi ve eksen kesme noktalarıdır [71].



Şekil 1.8. Freundlich İzotermi [71]

1.1.6.2. Adsorbsiyon Kinetiği

Bir olayın mekanizmasının aydınlatılması ve buna bağlı olarak dizayn edilecek süreçler için deneysel verilerin yorumlanması oldukça önemlidir. Bunun için de

olayın hız belirleme basamağının bulunması elzemdir. Adsorpsiyon kinetiğinin anlaşılması ile etkin adsorbat adsorban temas süresi yani alıkoyma süresi bulunur. Kinetik, adsorpsiyon işleminin hızına etki eden adsorpsiyon basamaklarının anlaşılması için önemli bir adımdır. Bir çözültide bulunan maddenin adsorban tarafından adsorplanması işleminde 4 ana basamak vardır:

1. Gaz ya da sıvı fazda bulunan madde, adsorbanı kaplayan bir film tabakası sınırına doğru difüze olur. Bu basamak, adsorpsiyon düzeneğinde belirli bir hareketlilik (karıştırma) olduğu için çoğunlukla ihmal edilir.
2. Film tabakasına gelen madde buradaki durgun kısımdan geçerek adsorbanın gözeneklerine doğru ilerler.
3. Sonra adsorbanın gözenek boşluklarında hareket ederek adsorpsiyonun meydana geleceği yüzeye doğru ilerler.
4. En son olarak da adsorbatın adsorbanın gözenek yüzeyine tutunması meydana gelir [37].

Eğer adsorbanın bulunduğu faz hareketsiz ise, 1. basamak en yavaş ve adsorpsiyon hızını belirleyen basamak olabilmektedir. Eğer akışkan hareket ettirilse, yüzey tabakasının kalınlığı azalacağı için adsorpsiyon hızı artar. Son basamağın ölçülemeyecek kadar hızlı olduğu ve ilk basamakta da iyi bir karıştırma olduğu düşünülerek adsorpsiyon hızına aksi bir etki yapmayacakları için 2. ve 3. basamaklar süreçte hız belirleyicidir. 2. basamak adsorpsiyon işleminin ilk dakikalarında, 3. basamak ise adsorpsiyon işleminin geri kalan daha uzun bir süresinde meydana geldiği için, adsorpsiyon hızını tam olarak etkileyen basamağın 3. basamak olduğunu söyleyebiliriz. Adsorpsiyon hızını belirlemek için kullanılan eşitlikler şunlardır:

- Yalancı 1. dereceden reaksiyon hız eşitliği, Lagergren eşitliği:

$$\log (q_e - q_t) = \log q_e - (k_1 / 2.303) t \quad (1.6)$$

Bu denklemi deneylerden elde edilen sonuçlarda kullanabilmek için, deneysel verilerin $t=f$ için ekstrapolasyonunu hesaplanarak q_e (dengedeki adsorpsiyon kapasitesi) değeri önceden bulunmalıdır.

• Yalancı 2. dereceden reaksiyon hız eşitliği, Ho eşitliği:

$$t / qt = [1 / k_2 qe^2] + (1 / qe) t \quad (1.7)$$

k_1 : Lagergren, yalancı 1. dereceden, adsorpsiyon hız sabiti (min^{-1})

k_2 : Ho yalancı 2. dereceden adsorpsiyon hız sabiti (g/mg.min)

q_e : Birim adsorban üzerine adsorplanan madde miktarı (mg/g)

qt : t zamanda adsorplanan boyar madde miktarı (mg/g)

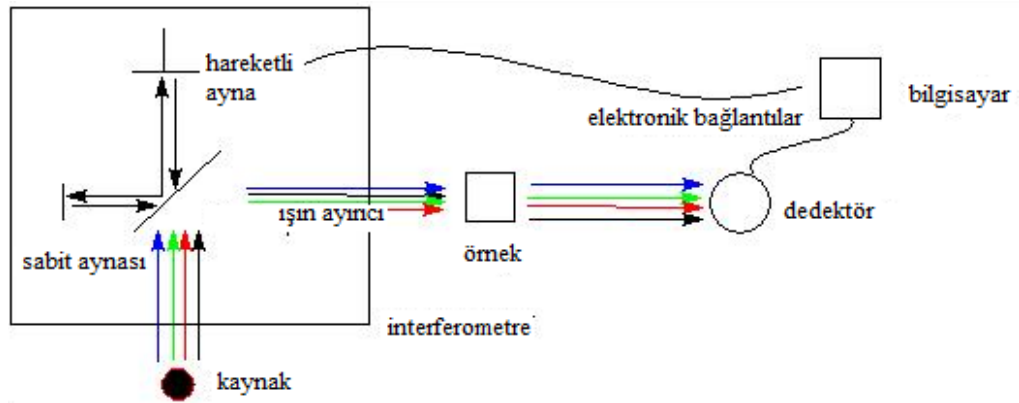
$\log (q_e - qt)$ değerlerinin t ve t / qt nin t değerine karşı ayrı ayrı grafiğe konulmalarıyla k_1 ve

k_2 değerleri hesaplanır [36].

1.1.7. Fourier Dönüştürümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

FTIR matematiksel Fourier dönüşümü yöntemi ile ışığın infrared yoğunluğuna karşı dalga sayısını ölçen bir kimyasal analitik yöntemdir. Elektromanyetik ışık dizisinin kızıl ötesi bölgesi 14000 cm^{-1} ile 10 cm^{-1} arasındadır ve yakın dalga boylu kızıl ötesi (NIR; $4000\text{-}14000 \text{ cm}^{-1}$), orta dalga boylu kızıl ötesi (MIR; $400\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$) ve uzak dalga boylu kızıl ötesi (FIR; $4\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$) olmak üzere üç ana bölgeden oluşmaktadır. MIR bölgesindeki bantlar ile hücre duvarı bileşenleri, proteinler ve nükleik asitler gibi bakteri hücrelerinin toplam bileşenleri belirlenebilir ve tekrarlanabilir biyokimyasal parmak izlerini oluşturan organik bileşenlerin tanımlanmasını sağlar. Bir organik maddenin ışık dizisinde $3600\text{-}1200 \text{ cm}^{-1}$ aralığına, fonksiyonel gruplar bölgesi denir. İkinci bölge parmak izi bölgesi olarak tanımlanan $1200\text{-}700 \text{ cm}^{-1}$ bölgesidir. Bu bölge, özellikle moleküldeki küçük yapısal ve bileşim değişikliklerini incelemekte kullanılır. Molekülün yapısında ve bileşiminde meydana gelen küçük değişiklikler, bu bölgedeki absorpsiyon piklerinin büyük ölçüde yer değiştirmesine

neden olur. Bundan dolayı, bu bölgede iki ışık dizisinin çakışması, bu iki ışık dizisinin aynı maddeye ait olduğuna bir işarettir. Tek bağların çok büyük bir kısmı bu bölge veya aralıkta absorpsiyon bantları verir. Bölgenin oldukça dar olması nedeniyle, bu bölgedeki titreşim frekansları, enerjilerinin birbirine çok yakın olması sebebiyle birbirlerini çok etkiler. Bu nedenle, maddelerin ışık dizilerinde görülen absorpsiyon bantları kompozit bantlardır, yani sadece bir bağ frekansından ileri gelen saf bir absorpsiyon bandı değildir. Bu bölge ışık dizisinin en karmaşık kısmıdır ve ancak diğer bölgelerden elde edilen bilgiler de dikkate alınarak bir sonuca varılabilir. Ayrıca madde miktarlarıyla orantılı olarak kızıl ötesi ışık dizisindeki bantların yoğunluğu değişmekte ve bu özellikten kantitatif analizde yararlanılmaktadır. FTIR cihazının çalışma prensibi Şekil 1.9.'da verilmiştir [76].

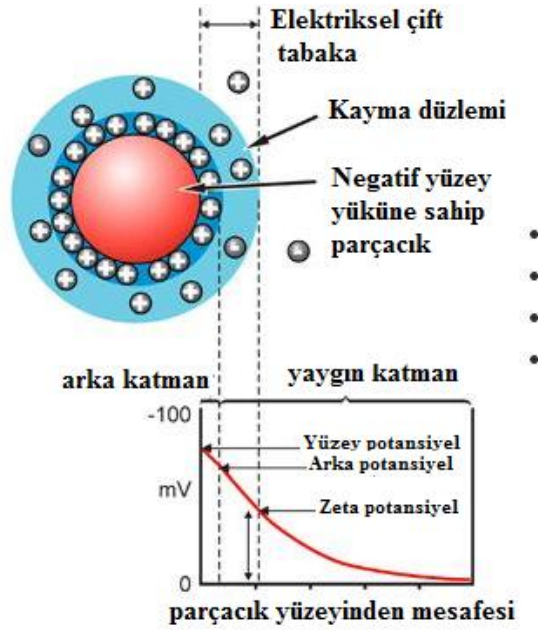


Şekil 1.9. FTIR çalışma prensibi [76]

1.1.8. Zeta Potansiyeli

Zeta potansiyel partiküllerin yüzey yüklerinin oluşturduğu potansiyelin dolaylı olarak ölçümüdür. Başka bir ifade ile partiküller arasındaki itme veya çekme değeri ölçümüdür. Ölçümü ve tanımı çift iyon tabakası teorisine göre yapılır. Bu teoriye göre, negatif yüklü partiküllerin etrafında iki ayrı bölge bulunur, bunlardan birincisi Stern Tabakası olarak bilinir ve partikül yüzeyine çok yakın bir şekilde sınırlanmış yüksek derişimde zıt (pozitif) iyonlardan oluşur. Stern tabakası ve dağılımlı tabaka

arasındaki iyon dağılımı ortamda potansiyel yükler önem kazanmaktadır (Şekil 1.10.). Sıvı çözelti içerisinde bulunan katı parçacıkların veya mineralin ölçülebilen yüzey potansiyeli olan zeta potansiyelinin birimi milivolt (mV) veya voltur. Zeta potansiyel değeri pozitif ve negatif değerli (bu yüzeyin elektriksel yükünü gösterir) veya sıfır olabilir. Zeta potansiyel değeri çözeltinin pH'sına, ortamdaki iyonlara (elektrolitlere) ve çözeltinin cinsine, iyon konsantrasyonuna bağlıdır [77]



Şekil 1.10. Zeta potansiyeli [78]

1.1.9. Mikrobiyal İdentifikasyon

İdentifikasyon, tanıma anlamına gelir. Bir mikroorganizmanın kimliklendirilmesi de identifikasyon adımı alır. İdentifikasyon işlemleri, o bakterinin ait olduğu genusun ve spesifik epitetinin belirlenmesine kadar devam ettirilir. Gerektiğinde tiplerine ve varyetelerine kadar ilerletilir [79]. İdentifikasyon amacı ile de kullanılan basit biyokimyasal testler ile immünolojik, genetik, immünoenzimatik vb. pek çok gelişmiş yöntem bulunmaktadır. İdentifikasyon zor, deneyim isteyen, uzun süre alan

ve pahalı bir uygulamadır. Yüzlerce identifikasyon testi arasından belirli bir sistematik yaklaşım ile en basit ve en çabuk sonuç verecek olanlar seçilmelidir [80]. Mikroorganizmaların sınıflandırılmasında ve tanımlanmasında kullanılan klasik tekniklerin sınırlı olmasından dolayı, mikrobiyal çeşitlilik ve mikroorganizmaların ekosistemdeki rolü ile ilgili bilgilerimiz oldukça azdır. Mikroorganizmalar birbirine benzerliklerinden dolayı, morfolojik yapılarına göre sınıflandırma yapmak zordur. Metabolik ve biyokimyasal özelliklere dayanan sınıflandırmada karşılaşılan en büyük problem ise; mikroorganizmaların birebir kendi doğal ortamlarını yansıtan kültür ortamlarında yetiştirilememesidir. Bu nedenle mikrobiyal çeşitliliği ve mikroorganizmaların ekosistemdeki rolünü daha iyi anlayabilmek için, tamamlayıcı mikrobiyolojik yaklaşımlara ihtiyaç vardır [82].

Mikrobiyal çeşitliliği ve dağılımı belirleme çalışmalarında, 16S rRNA gibi moleküler işaretlerin kullanılması ile “moleküler mikrobiyal ekoloji” olarak tanımlanan yeni bir disiplin ortaya çıkmıştır. Termal su kaynakları, sediment yapılar ve deniz suyu gibi farklı habitatlardan alınan numunelerde, moleküler tekniklerin temelini oluşturan yöntemlerle yapılan çalışmalar sonucunda, mikrobiyal çeşitliliğin bildiğimizden çok fazla olduğu ve klasik tanımlama tekniklerinin ne kadar yetersiz kaldığı anlaşılmıştır [83].

1.1.9.1. Geleneksel Yöntemler

Suşlar arasındaki ayrımı sağlayabilmek için gen ekspresyonunun ürünü karakterize eden (gözlemlenebilir karakterleri) ve genelde cins-tür düzeyinde identifikasyona olanak sağlayan geleneksel fenotipik yöntemler arasında morfolojik, fizyolojik, metabolik, biyokimyasal özellikler ve kemotaksonomik markörler (hücre yağ asitleri, mikolik asit, polar lipitler, quininerler, poliaminler, hücre duvarı bileşikleri, ekzopolisakkaritler) ile beraber faj tiplendirmeleri, hücre yüzeyindeki antijenler, antimikrobiyal duyarlılık profilleri ve toplam hücre ya da hücre duvarı proteinlerinin elektroforetik patternleri yer almaktadır. Farklı pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonunda gelişme, gaz üretimi gibi bazı basit fizyolojik testler cins identifikasyonunda kullanılmaktadır. Karbonhidrat fermantasyonu gibi biyokimyasal

testler fenotipik yöntemler olarak kullanılmakta ve tür bazında ayırım sağlayabilmektedir [80,81].

1.1.9.2. Yağ Asidi Metil Ester (FAME) Analizi

Hücrel yağ asitlerinin belirlendiği gaz-sıvı kromatografisi metodu çevre ve klinik kökenli bakterilerin, mikobakterilerin ve mayaların tür düzeyinde tanımlanmasında kullanılmaktadır. Mikrobiyal identifikasyon Sistemi (MIS=Microbial Identification System, MIDI, INC, Newark, DE, USA) türlere özgü olan tüm yağ asidi metil esterleri, dimetil asetil, aldehit gibi bileşikleri yüksek ayırıştırma özelliğindeki gaz-sıvı kromatografisi vasıtasıyla tanımlar. MIS tam otomatik bilgisayar destekli, hızlı sonuç veren, düşük maliyetli olup laboratuvarında izole edilen birçok mikroorganizmanın identifikasyonunda kullanılmaktadır [84]. Mikrobiyal hücrelerde yağ asitlerinin kaynağı hücre membranlarının başlıca bileşiği olan lipitlerdir veya gram negatiflerde lipopolisakkaritlerin lipitid A bileşiği ve gram pozitiflerde lipoteikoik asittir. Tüm lipidlerin yağ asidi içeriği türe özgü biyosentez basamaklarıyla belirlenir. Küçük genoma sahip organizmalar genellikle az sayıda yağ asitleri bulundururken büyük genomlu öbakterler 20'den fazla yağ asidine sahiptirler [85]. Bakteriler ökaryotlarda bulunmayan özgün bazı yağ asitlerini içerirler. Genellikle dallı zincirli yağ asitleri gram pozitifleri, siklopropan yapıda olan yağ asitleri gram negatif bakterileri karakterize eder. Gram negatif bakteriler, gram pozitif bakterilere oranla daha çok sayıda karbon içeren doymuş ve tekli doymamış yağ asidi içerirler. Analiz için örneklerin hazırlanması, saponifikasyon, metilasyon, ekstraksiyon ve yıkama olmak üzere 4 basamaktan oluşur [85]. Şekil 1.11'de görüldüğü gibi öncelikle, 24-48 saat inkübe edilmiş hücreler kültürden alınır, saponifikasyon için sodyumhidroksit-metanol karışımı ile muamele edilir. Bu basamakta yağ asitleri hücrel lipitlerden ayrılır. İkinci adımda HCl-metanol karışımı ile metilasyon basamağı gerçekleştirilir. Üçüncü basamakta, meydana gelen yağ asidi metil esterleri hekzan ve metil terbütül eterden oluşan solüsyonla ekstrakt edilir. Son olarak ekstrakt sodyum hidroksit çözeltisi ile yıkanıp gaz kromatografisi için GLC tüplerine aktarılır. Örneklerin değerlendirilmesi Microbial Identification

System (MIS) ile yapılır. Sistem, alev iyonizasyon dedektörü, kapiler silikon kolon, otomatik örnekleyici, entegratör, bilgisayar ve yazıcıdan oluşur [85].



Şekil 1.11. FAME Analizi [86]

1.1.9.2.1. FAME'in Avantaj ve Dezavantajları

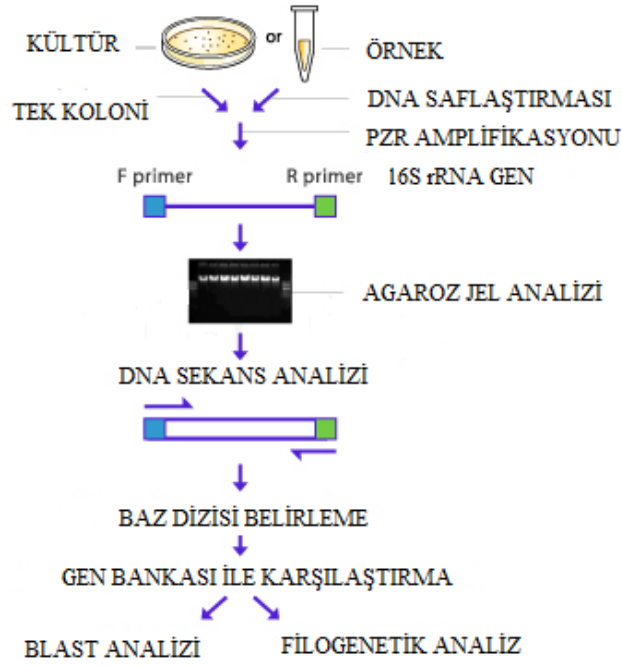
Yağ asitleri ile bakterilerin tanılanması sistemi ile bakteriyel organizmalar alttür düzeyinde bile tanımlanabilmekte ve birbirlerinden ayırt edilebilmektedir. MIS ile elde edilen sonuçların morfolojik ve biyokimyasal test sonuçlarından daha duyarlı ve çabuk, moleküler temele dayalı tanı testleriyle % 100'e yakın bir benzerlik gösterdiği ve bu sistemin bakteriyel organizmaların tanısında başarıyla kullanılabileceği gösterilmiştir. MIS sisteminin rutin çalışmalar için nispeten klasik yöntemlerden pahalı olsa da özellikle zaman açısından çok uygun bir tanı yöntemi olduğu düşünülmektedir [87]. Ayrıca örneklerin hazırlanması yaklaşık 1 saat sürmekte ve aynı gün içerisinde sonuç alınabilmektedir [85]. Ancak yağ asidi analizinin enstrümantasyonu diğer analizlere nazaran maliyetli ve komplekstir [85]; kimi zaman doğru sonuç vermeyebilir [84].

1.1.9.3. 16S rRNA Dizi Analizi

Son yıllarda mikrobiyal türlerin belirlenmesinde kültürün hangi bakterilerden oluştuğunu belirlemek amacıyla 16S rRNA genlerinin incelenmesine dayanan moleküler metotlar ve denatüre gradyan jel elektroforezi (DGGE) kullanılmaktadır. Bu metot farklı işletme koşullarında mikroorganizma popülasyonunda meydana gelen değişimleri izlemek amacıyla kullanılan bir tekniktir. Mikrobiyal tür tayininde, kültürden izole edilen 16S rRNA örneği birleştirilmiş zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile çoğaltılmakta ve RNA profili belirlenerek karışık kültürün hangi bakterilerden oluştuğu belirlenmektedir [84].

Dizi analizi öncesi tür farklılıkları, denatüre gradyan jel elektroforezi (DGGE) tekniği ile Guanin (G) ve Sitozin (C) içeriğine göre tespit edilmektedir. DGGE, PZR ile çoğaltılmış DNA örneklerindeki tek baz değişimlerinin belirlenmesinde etkili bir genetik analiz yöntemidir. DGGE analizinde denatüre madde (formamit ve üre karışımı), poliakrilamit jellerdeki yarı erimiş, çift sarmallı DNA moleküllerinin elektroforetik hareketine bağlıdır. Mevcut çalışmalarda bu deneyden faydalanılarak türlerin zamana bağlı değişimleri gözlemlenmektedir [85].

Türlerin birbirinden ayırt edilmesi için klasik PZR ile 16S rRNA genlerinin çoğaltılmasından sonra, DGGE analiziyle türler birbirinden ayırt edilmektedir. Dizi analizi için seçilecek klonların miktarı PZR ve DGGE analizleri sonunda tespit edilmektedir. PZR ya da DGGE jellerinde görüntülenen bantlar, uygun saflaştırma kitleri kullanılarak saflaştırılmakta, bu ürünler daha sonra “dye terminator cycle sequencing” reaksiyonuna sokularak floresan işaretli fragmanların amplifikasyonları gerçekleştirilmektedir. Elde edilen ürün saflaştırılmakta ve formamid çözeltisi içinde süspanse edilmektedir. Kapiler elektroforez tekniği ile çalışan cihazdan elde edilen dizi analizi verileri, A-G-C-T dizin dosyaları biçiminde kopyalanarak, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> internet sitesinde BLAST programında değerlendirmeye alınmakta ve bu veri tabanında tanımlanmış mevcut türlerle olan muhtemel farklılıklar raporlanmaktadır (Şekil 1.12.) [88].



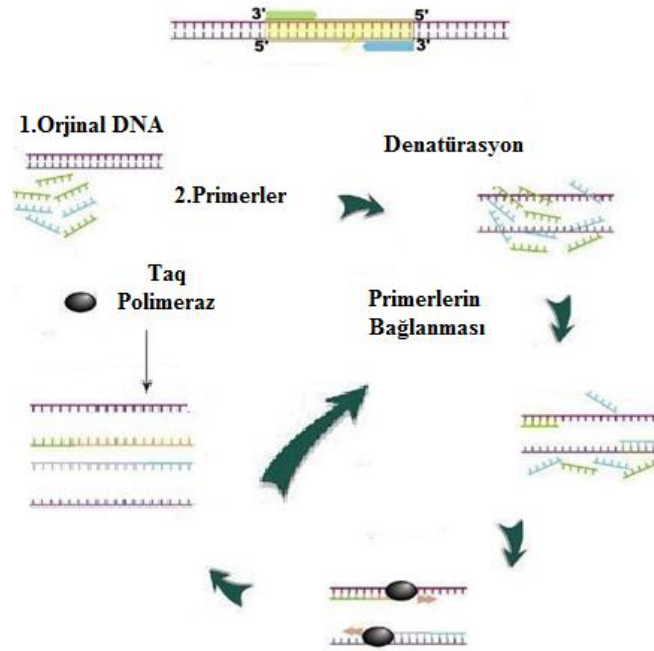
Şekil 1.12. 16S rRNA Sekans Analizi [89]

1.1.9.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR, klasik tanımlama yöntemlerin yanı sıra bakterilerin moleküler düzeyde tanımlanması amacıyla yaygın olarak başvurulan bir teknik haline gelmiştir. Yeni ve güçlü bir teknik olan PZR'nin laktik asit bakterileri için de uygulanması kolay ve çok duyarlı bir tanımlama yöntemi olduğu bildirilmektedir [90-93].

PZR tekniği bir organizmaya ait genomik DNA'daki özgül bölgelerin primerler aracılığı ile amplifikasyonunu sağlayan basit ama çok başarılı bir in vitro DNA sentezi yöntemidir. PZR ile hücre içerisinde meydana gelen doğal DNA replikasyonu bir tüp içerisinde taklit edilerek gerçekleştirilmektedir. Hücre içerisinde DNA replikasyonunun gerçekleşebilmesi için bir kısmı enzim özelliği taşıyan birçok proteinin görev yaptığı bilinmektedir. PZR tekniğinde, replikasyonun başlayabilmesi için gerekli olan iki DNA zincirinin birbirinden ayrılması, ortam sıcaklığını 94°C'ye kadar yükseltilmesi ve böylece iki zincir arasındaki hidrojen bağlarının kırılması ile

sağlanabilmektedir. Canlı bir hücrede DNA zincirlerinin ayrılma işlemi ise, bu hücrenin optimum gelişme sıcaklığında ve bu amaçla görev yapan yardımcı proteinlerin sayesinde gerçekleşmektedir. Hücre içi replikasyonun başlamasında bir başka önemli olay primaz adı verilen enzim tarafından genellikle 12 nükleotit uzunluğunda, replikasyonun başlayacağı bölgede, bir RNA primerinin yapılmasıdır. DNA polimeraz bu primere bağlanıp, 3' ucuna nükleotitleri ekleyerek DNA sentezini gerçekleştirmektedir. PZR'de ise replikasyonun başlatılacağı bölgeye özgün olarak bağlanan primerler, reaksiyon karışımının içerisine önceden eklenmekte ve DNA sentezi termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'dan elde edilen sıcaklığa dirençli Taq DNA polimeraz enzimi tarafından gerçekleştirilmektedir [94].



Şekil 1.13. PZR aşamaları [94]

PZR tekniğinde Şekil 1.13'de görülen bu temel üç basamak bir döngüyü oluşturur. Bu döngü genelde 25-35 kez tekrarlanır ve her tekrarlanışında iki primer arasında

kalan özgün DNA parçasının her iki zincirinin birer kopyası çıkarılmış olur. Başlangıçta DNA molekül sayısı, PZR işleminin kaç döngü sonunda bitirileceğini belirler. Bir PZR uygulamasında n sayıda döngü varsa, ortamda maksimum 2 sayıda çoğaltılmış DNA beklenir. Bu döngüler sonunda elde edilen PZR ürünlerinin tanımlanmasında sıklıkla kullanılan yöntem agaroz jel elektroforezidir. Elde edilen ürünler agaroz jel kullanılarak elektroforezle ayrıştırılır ve DNA zincirleri etidyum bromür ile boyanarak ultraviyole ışık kaynağında floresans vererek görünür hale getirilir. Agaroz jel elektroforezinde, jel hazırlığındaki agaroz derişimi DNA moleküllerinin yürümesini etkileyen önemli bir faktör olarak gösterilmektedir [94].

1.1.9.3.2. 16S rRNA Analizinin Avantajları ve Dezavantajları

Tüm bakterilerde ortak genler bulunması bilinen bir gerçektir ve bu genlerin baz dizilerinde türden türe değişen kısımlar bulunur. 16S rRNA molekülü yaşayan tüm canlılarda bulunmaktadır ve evrim süreci boyunca korunmuştur [95]. Bu özellik organizmaların karşılaştırılmasına, hatta aynı türdeki farklılaşmaların tespitine imkan vermektedir. Dahası gen dizilimi ile ilave istatistiki olarak ilgili verilerin elde edilmesi mümkün olabilmektedir. Tüm organizmalarda çok miktarda bulunan ribozomların üretilmesinden sorumlu 16S ve 23S rRNA genleri moleküler teknikler kullanılarak yapılan araştırmalarda en çok tercih edilen genlerdir. Bununla birlikte, pek çok mikroorganizmanın 16S rRNA geninin dizi analizi bilgilerini içeren ve günden güne genişleyen bir veri bankasının bulunması da bu geni hedef alan moleküler tekniklerin kullanım alanının artmasını sağlamıştır [96]. 16S rRNA dizini bilinmeyen bakterilerin tanımlanmasında dünyada geniş bir yelpazede uygulanan bir biyo belirleyicidir. Ayrıca farklı 16S gen dizilimi olan organizmaların istatistiki olarak karşılaştırılmasına da olanak sağlar. Buna rağmen nispeten pahalı olabilir, hassas çalışma gerekir ve sekanslamada türler arası yüksek benzerlik çıkabilir [97].

1.2. Çalışmanın Amacı

Laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalar sonucu Kırıkkale Kızılırmak'tan demir, bakır ve krom dirençli bakteriler izole edilmiş ve kültüre alınmıştır [109,110]. Bu çalışmada ise izole edilen bu bakterilerin moleküler teknikler kullanılarak tanımlanması ve biyosorpsiyon kapasitelerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Besiyerleri

2.1.1.1. Nutrient Agar (NA) Besiyerinin Hazırlanışı

İzole edilen bakterilerin stok kültür şeklinde saklanması için kullanılmıştır. Nutrient agar besiyeri; pepton (5 g), et özütü (5 g), maya özütü (1 g) ve agardan (12 g) oluşmaktadır. Gerekli miktarda hazırlanan besiyeri kullanmadan önce 121°C'de 1 atm basınçta otoklavda steril edilmiştir.

2.1.1.2. Nutrient Broth (NB) Besiyerinin Hazırlanışı

İzole edilen bakterilerin üreme eğrisi, DNA izolasyonu, biyosorpsiyon gibi deneyler için kullanılmıştır. Nutrient broth besiyeri; pepton (5 g) ve et özütünden (3 g) oluşmaktadır. Gerekli miktarda hazırlanan besiyeri kullanmadan önce 121°C'de 1 atm basınçta otoklavda steril edilmiştir.

2.1.1.3. Plate Count Agar Hazırlanışı

Bakteri sayımında kullanılan inhibitör veya indikatör içermeyen genel katı besiyeridir. Koloni oluşturan birim sayımında kullanılmıştır. Plate count agar besiyeri; tripton (5 g), maya özütü (2.5 g), glukoz (1 g) ve agardan (12 g) oluşmaktadır. Kullanılacak miktarda besiyeri, öncesinde otoklavda 121°C'de 1 atm basınçta steril edilmiştir.

2.1.1.4. Trypticase Soy Broth Agar Hazırlanışı

İndikatör veya inhibitör içermeyen, birçok mikroorganizmanın gelişebilmesi için yeterince zengin besin maddesi içeren genel kullanım amaçlı besiyeridir. Yağ asidi analizi öncesinde bakteri örneklerinin inkübasyonunda kullanılmıştır. Trypticase soy broth agar; tripticase soy broth (30 g) ve agardan (15 g) oluşmaktadır. Kullanılacak miktarda besiyeri, öncesinde otoklavda 121°C’de 1 atm basınçta steril edilmiştir.

2.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar

Çalışma süresince kullanılan kimyasallar Merck ve Sigma firmalarından temin edilmiştir.

2.1.2.1. Ağır Metal Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

2.1.2.1.1. 0.5 M Demir Klorit Çözeltisi ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

3.379 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tartılarak 20 mL distile suda çözülmüştür. Üzerine 250 μL % 37’lik HCl ilave edilerek karıştırılmıştır. Son olarak 4.75 mL distile su eklenerek çözülmüştür. Hazırlanan çözelti 0.2 μL ’luk filtre ile steril edilmiştir.

2.1.2.1.2. 0.5 M Bakır Sülfat Çözeltisi ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

3.121 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ tartılarak 25 mL distile suda çözülmüştür ve hazırlanan çözelti 0.2 μL ’luk filtre ile steril edilmiştir.

2.1.2.1.3. 0.5 M Krom Nitrat Çözeltisi (CrN₃9H₂O)

5 g CrN₃9H₂O tartılarak 25 mL distile suda çözülmüştür ve hazırlanan çözelti 0.2 µL'luk filtre ile steril edilmiştir.

2.1.2.2. Kullanılan Tampon Çözeltiler

2.1.2.2.1 Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler

2.1.2.2.1.1. Tris / EDTA Tamponu (250 mL)

0.3 g Tris ve 0.008 g EDTA tartılarak 250 mL distile suyla (pH 8.0) tamamlanmıştır.

2.1.2.2.1.2. % 10'luk SDS Tamponu (100 mL)

10 gram SDS tartılarak 100 mL distile suda çözülmüştür.

2.1.2.2.1.3 Proteinaz-K'nın Hazırlanması (10 mL)

0.0384 g CaCl₂2H₂O tartılarak 5 mL gliserol ve 100 µL 1M Tris-HCl (pH 8.0) ile çözülmüştür. Son hacim 10 mL oluncaya kadar distile su eklenmiştir. Hazırlanan bu çözeltiden 10 mL alınarak 100 mg proteinaz-K çözülmüştür.

2.1.2.2.1.4. NaCl Tamponu (5 M, 100 mL)

20 g NaCl tartılarak 100 mL distile su ile çözülmüştür.

2.1.2.2.1.5. CTAB/NaCl tamponu (100 mL)

4.1 g NaCl tartılarak 90 mL distile suda çözülmüştür ve 10 g CTAB yavaşça solüsyona eklenerek 65 °C'ye kadar ısıtılmıştır. Son hacim 100 mL oluncaya kadar distile su ile tamamlanmıştır.

2.1.2.2.1.6. Kloroform/ İzoamil Alkol Tamponu (100 mL)

96 mL kloroform 4 mL izoamil alkol ile karıştırılarak 100 mL tampon hazırlanmıştır.

2.1.2.2.1.7. Kloroform/ İzoamil Alkol/ Fenol Tamponu (100 ml)

48 mL kloroform 2 mL izoamil alkol ve 50 mL fenol ile karıştırılarak 100 mL tampon hazırlanmıştır.

2.1.2.2.1.8. İzopropanol Alkol (100 mL)

İzopropanol alkolden 100 mL alınarak kromozomal DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

2.1.2.2.1.9. % 70'lik Etil Alkol (100 mL)

70 mL % 100'lük etil alkol ile 30 mL distile su karıştırılarak hazırlanmıştır.

2.1.2.2.1.10. Tris-HCl Tamponu (50 mM, 100 mL)

70 mL % 100'lük etil alkol ile 30 mL distile su karıştırılarak hazırlanmıştır.

2.1.2.2.1.11. Tris-HCl Tamponu (1 M, 100 mL)

0.12 g Tris-HCl tartılarak 100 mL distile suda çözülmüştür.

2.1.2.2.1.12. Elektroforez Tamponu (50x TAE) Hazırlama

242 g Tris, 37.2 g Na₂EDTA.2H₂O tartılarak 57.1 mL glasiyel asetik asit ile çözülmüştür. Son hacim 1000 mL olacak şekilde saf su ile tampon tamamlanmıştır.

2.1.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Primerler ve Özellikleri

Çizelge 2.1. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerler ve özellikleri

Primer	Dizi (5'-3')	Özellik	T _m (°C)	Referans
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Öbakteriyel, düz	48	Britschgi ve Giovannoni [98]
1492R	ACCTTGTTACGACTT	Üniversal, ters	43	Edgcomb ve diğ., [99]

2.1.2.4. Yağ Asidi Analizi Çalışma Solüsyonları ve Hazırlanışı

2.1.2.4.1. Solüsyon I

45 g sodyum hidroksit 150 mL metanol ve 150 mL distile su karıştırılarak stok solüsyon hazırlanmıştır.

2.1.2.4.2. Solüsyon II

325 mL 6.0 N hidroklorik asit ve 275 mL metil alkolle karıştırılarak stok solüsyon hazırlanmıştır.

2.1.2.4.3. Solüsyon III

200 mL hekzan ve 200 mL metil tert-bütül eter karıştırılarak stok solüsyon hazırlanmıştır.

2.1.2.4.4. Solüsyon IV

20.8 g sodyum hidroksit tartılarak 900 mL distile su içinde eritilerek stok solüsyon hazırlanmıştır.

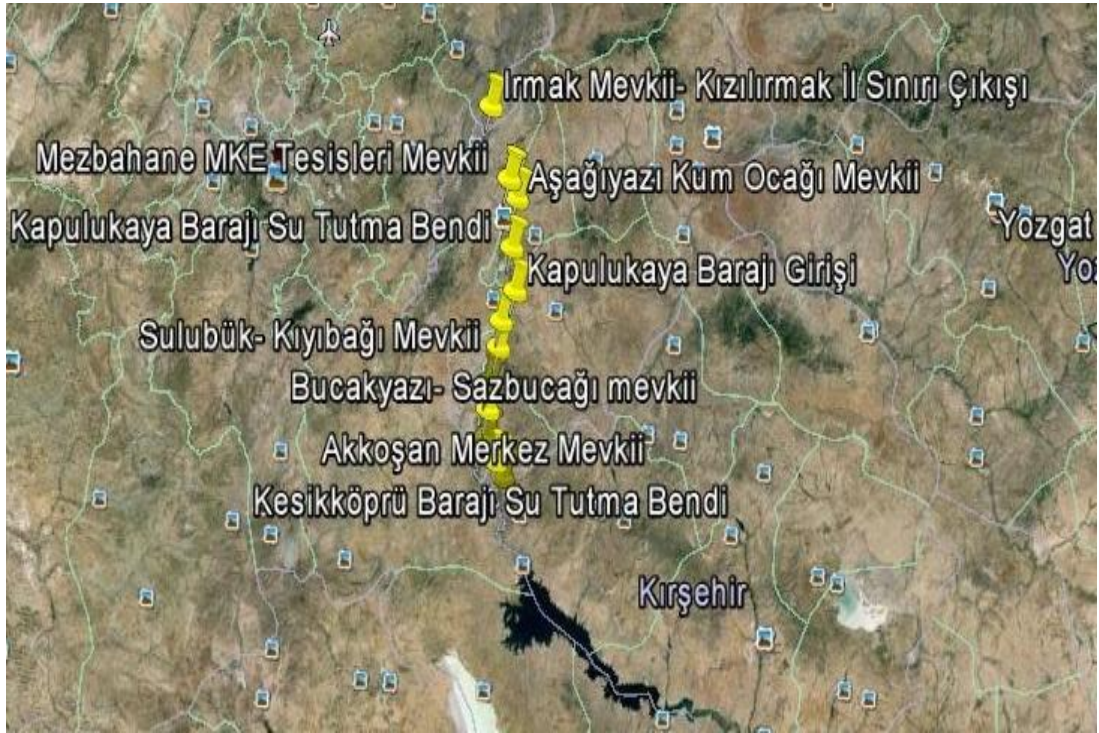
2.2. Yöntem

2.2.1. Çalışma Alanı ve Örneklerin Toplanması

Kızılırmak, Türkiye topraklarından doğup yine Türkiye topraklarından denize dökülen en uzun akarsuyumuzdur. Adını akarsu yatağında bulunan, 3. zaman ortalarında çökelmiş kırmızı renkteki kumlu-killi tortudan almaktadır [101]. Başlıca kolları Delice, Devrez ve Gökırmak'tır. Yağmur ve kar sularıyla beslenen nehrin rejimi düzensizdir. Ortalama debisi 184 m³/sn olan nehrin 35 yıllık gözlem süresince ortalama akımı en az 18.4 m³/sn ve en çok 1.673 m³/sn debiye ulaştığı tespit edilmiştir. Kızılırmak Nehri, Sivas, Kayseri, Nevşehir, Kırşehir, Kırıkkale, Ankara, Çankırı, Çorum ve Samsun illerinden geçerken çok sayıda dere ve çayın sularını toplayarak Bafra Burnu'ndan Karadeniz'e ulaşır. Nehir üzerinde 12 önemli baraj

vardır. Bunlar sırasıyla; İmranlı, Yamula, Bayramhacılı, Hirfanlı, Kesikköprü, Kapulukaya, Buğra, Obruk, Dutludere, Boyabat, Altınkaya ve Derbent'dir [100].

Kırıkkale ulaşım bakımından Türkiye'nin doğuya açılan kapısı olma, Makine Kimya Endüstrisi ile Tüpraş Rafinerisi gibi büyük sanayi kuruluşlarını bünyesinde barındırma ve Kızılırmak gibi Türkiye'nin en büyük nehirlerinden birinin güzergahında yer almasından dolayı oldukça önemli illerden biridir. Kırıkkale ilinde sanayi oldukça gelişmiş bir durumdadır. Hemen hemen bütün sanayi kuruluşları Kızılırmak Nehri'nin çevresinde bulunmaktadır [101].



Şekil 2.1. Örnekleme bölgesi (Google Earth görüntüsü)

Kırıkkale Kızılırmak üzerinde Çizelge 2.1'de görüldüğü gibi ve endüstriyel kuruluşlara yakın olarak belirlenen Eylül 2012'de su örnekleri toplanmıştır.

Çizelge 2.2. Örneklerin alındığı bölgeler ve koordinatları

Bölge No	Bölge Adı	Bölge Koordinatları
1	Kesikköprü Barajı	39°22'16.39 ' 'K, 33°26'49.26 ' 'D, 890 m
2	Kesikköprü Barajı Su Tutma Bendi	39°23'43.98 ' 'K, 33°25'38.24 ' 'D, 833 m
3	Erdemli Mah. - Sarımusalli Mevkii	39°26'03.30 ' 'K, 33°24'08.43 ' 'D, 781 m
4	Akkoşan Merkez Mevkii	39°28'39.46 ' 'K, 33°24'26.73 ' 'D, 740 m
5	Eğribük - Akkoşan Y. Mevkii	39°31'09.87 ' 'K, 33°24'39.32 ' 'D, 738 m
6	Bucakyazı - Sazbucağı Mevkii	39°34'34.39 ' 'K, 33°26'11.61 ' 'D, 763 m
7	Sulubük - Kıyıbağı Mevkii	39°37'02.34 ' 'K, 33°26'38.26 ' 'D, 773 m
8	Kapulukaya Barajı Girişi	39°39'53.04 ' 'K, 33°28'55.46 ' 'D, 852 m
9	Kapulukaya Barajı Su Tutma Bendi	39°43'59.01 ' 'K, 33°28'25.63 ' 'D, 737 m
10	Aşağıyazı Kum Ocağı Mevkii	39°48'38.97 ' 'K, 33°29'14.57 ' 'D, 684 m
11	Mezbahane - MKE Tesisleri Mevkii	39°50'28.41 ' 'K, 33°28'02.13 ' 'D, 686 m
12	Irmak Mevkii - Kızılırmak İl Sınırı Çıkışı	39°57'22.98 ' 'K, 33°25'04.35 ' 'D, 679 m

2.2.2. Demir, Bakır ve Krom Dirençli Bakterilerin İzolasyonu

Demir, bakır ve krom ağır metale dirençli bakterilerin seçimi için ağır metal içeren ortamlar kullanılmıştır. 12 bölgeden alınan su örneklerinden demir, bakır ve krom ağır metale dirençli suşları seçmek için her üç metal ve örnek için ayrı ayrı nutrient agar içeren petriyeler hazırlanmış ve petrilere literatürde belirlenen konsantrasyonlarda demir için $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, bakır için $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ve krom için $CrN_3 \cdot 9H_2O$ konulmuştur. Bu petrilere her bölgeden alınan su örnekleri seyreltilerek ekilmiştir. 30°C'de 48 saat inkübe edilen örneklerden üreme olan koloniler seçilerek saflaştırma yapılmıştır. Dirençli olan suşlar, toplandıkları bölgeleri ve dirençli oldukları metali

temsil edecek biçimde kodlanmıştır. Demir dirençli suş, Fe10, bakır dirençli suş Cu12 ve krom dirençli suş Cr07 olarak kodlanmıştır.

2.2.3. Bakterilerin Maksimum Tolere Ettikleri Metal Konsantrasyonu Değerlerinin Belirlenmesi

Maksimum tolere edilebilen konsantrasyon (MTK) değerlerinin belirlemek amacıyla suşların her biri agarlı ortamda giderek artan konsantrasyonlarda demir için $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, bakır için $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ve krom için $CrN_3 \cdot 9H_2O$ eklenerek gerekli sıcaklıklarda 48 saat inkübe edilmiştir. Üreme olan petrideki koloniler daha yüksek konsantrasyonda ağır metal içeren petrilere ekilmiştir. Bu işlem üreme gözlemlenilmeyinceye kadar tekrarlanmıştır. Üremenin görüldüğü en yüksek konsantrasyon MTK değeri olarak belirlenmiştir [109].

2.2.4. FAME Analizi

Seçilen Fe10, Cu12 ve Cr07 suşlarının tüm yağ asit analizleri için gerekli olan tüm kimyasallar ve uygulama prosedürleri Sherlock tarafından tarif edilen metoda göre gerçekleştirilmiştir [103]. Örnekler nutrient agara dört bölgeden oluşan çizgi ekim yapılmış $37^\circ C$ 'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra üçüncü bölgede gelişen hücrelerden steril cam tüplere öze ile 40 mg tartılmıştır. İlk basamakta saponifikasyonla hücresel lipitlerin parçalanıp, yağ asitlerinin serbest kalması sağlanmıştır. Bunun için 40 mg örnek bulunan tüplerin üzerine Solüsyon I'den 1 mL ilave edilmiş ve 5-10 saniye vortekslenmiştir. $100^\circ C$ 'lik su banyosunda 5 dakika tutulduktan sonra tekrar vortekslenmiş ve daha sonra tekrar $100^\circ C$ 'lik su banyosunda 25 dakika tutulmuştur. İkinci basamakta yağ asitlerin metilasyonu sağlanmış, serbest yağ asitlerine ester bağlarıyla metil eklenmiş ve yağ asit metil esterler elde edilmiştir. Bunun içinse $100^\circ C$ 'lik su banyosundan çıkarılan tüplere Solüsyon II'den 2 mL ilave edilmiş ve 5-10 saniye vortekslenmiş ve $80^\circ C$ 'lik su banyosunda 10 dakika tutulmuştur. Üçüncü basamak olan saflaştırma basamağında soğutulan tüplerin

üzerine Solüsyon III'den 1.25 mL ilave edilmiş ve 10 dakika karıştırıcıda çalkalanmıştır. Bu basamak sonunda tüplerde altta asidik, üstte organik sıvı faz olmak üzere iki faz gözlenmiştir. Tüplerdeki asidik faz pastör pipeti ile uzaklaştırılmış, yağ asit metil esterler asidik fazdan ayrışarak organik faz bölgesinde toplanmış ve organik faz muhafaza edilmiştir. Son basamakta ise tüplerin üzerine Solüsyon IV'den 3 mL ilave edilmiş ve 5 dakika karıştırıcıda çalkalanmıştır. Böylece serbest yağ asit metil esterlerinin saf olarak elde edilmesi sağlanmıştır. Tüplerde gözlenen üst faz pastör pipeti ile 2 mL viellere alınmıştır. Örneklerin yağ asidi analizi gaz kromatografisi (Agilent 6890N GC, USA) ile gerçekleştirilmiştir. Gaz kromatografisinin çalışma prensipleri verilmiştir. Yağ asitleri metil esterlerinin kromatogramları ve toplam yağ asitleri miktarları, analiz edilen örneklerin kromatogramındaki pikleri, standarttaki bütün yağ asitlerinin alıkonma zamanları teşhis edilmiştir.

2.2.5. Kromozomal DNA İzolasyonu ve DNA Miktar Tayini

İzole edilen demir, bakır, krom dirençli bakterilerin kromozomal DNA izolasyonu Cutting ve Horn tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır [104,105]. 15 mL'lık kültür 5000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant atılmıştır. Pellet üzerine 5.7 µL TE tampon eklenmiştir ve karıştırılmıştır. Daha sonra 30 µL % 10 SDS, 30 µL proteinaz-K ve 30 µL RNAaz eklenerek 1 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 100 µL 5 M NaCl eklenerek karıştırılmıştır. 800 µL CTAB/NaCl tamponu karışımın üzerine eklenmiş ve 10 dakika 65°C'de tekrar inkübe edilmiştir. Aynı hacimde kloroform/izoamil alkol solüsyonu eklenerek 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni tüplere alınarak eşit hacimde fenol/kloroform/izoamil alkol tamponu eklenerek 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Pellet üzerine 0,6 hacim izopropanol eklenmiş ve karıştırılıp 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak pellet üzerine 5 mL % 70'lik etanol eklenmiş ve 10 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Son olarak etanol uzaklaştırılmış ve pellet üzerine 200 µL TE tamponu eklenmiş ve -20°C'de saklanmıştır. İzolatlardan elde edilen genomik DNA'lar bütünlükleri bakımından

agaroz jel elektroforezinde kontrol edildikten sonra, saflık kontrolleri ve miktar tayinleri Qubit Fluorometer (Invitrogen) ile yapılmıştır.

2.2.6. Kromozomal DNA Amplifikasyonu

16S rRNA örneklerini amplifiye etmek için standart 16S rRNA gen sekansına (GenBank) göre sentezlenmiş olan iki evrensel oligonükleotid primer çifti, 27F primer: 5'- CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' [98]; ve 1492 R primer: 5'-CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' [99] kullanılacaktır. PZR amplifikasyonunda toplam hacmi 100 µL PZR karışımı için 10 µL kromozomal DNA (100 ng), 5 µL 16S Forward Primer (20 pmol), 5 µL 16S Reverse Primer (20 pmol), 4 µL 5 mM 4 dNTP karışımı, 4 µL 50 mM MgCl₂, 10 µL 10x Taq Buffer (Taq DNA polymerase içeren), 61.5 µL steril distile su, 0.5 µL (2.5U) Taq DNA polymerase karıştırılıp santrifüjlenecektir. Thermal cyclus da 30 döngü ile çoğaltılan örnekler sekans analizi yapılana kadar -20°C'de saklanacaktır [106].

PZR protokolünün optimizasyonu için çeşitli denemeler yapılmıştır. Bu denemeler sonucunda optimum protokol tespit edilmiş olup tüm örnekler spesifik primerler kullanılarak bu protokole göre PZR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Son hacim steril distile su ile 50 µL'ye tamamlanmıştır. Techne TC-Plus marka otomatik termocycler PZR amplifikasyonu amacıyla kullanılmıştır. Döngüler; 95°C'de 5 dakika denatürasyon, 30 döngü şeklinde 94°C'de 1 dakika, 59°C'de 30 saniye bağlanma basamağı, 72°C'de 2 dakika uzama ve bu döngüleri takiben 72°C'de 10 dakikalık bir inkübasyon süresinin tamamlanmasıyla gerçekleştirilmiştir [107].

2.2.7. PZR Ürünlerinin Agaroza Jelde Yürütülmesi

% 1'lik agaroz jel hazırlamak için 0.5 g agaroz tartılıp 50 mL 1x TAE tamponu ile çözüldükten sonra mikrodalga fırında ısıtılarak eritilmiştir. Jel yatağına önceden

tarak yerleştirilmiş ve yatak su terazisi ile dengeye getirilmiştir. Çözelti yaklaşık 45-50°C'ye kadar soğutulmuş, 4 µL Etidyum Bromür ilave edilmiş ve jel yatağına dökülmüştür. Jel tamamen polimerize olduktan sonra tarak dikkatlice alınmış, jel yatağı örneklerin yürüyeceği içinde tampon çözeltinin bulunduğu elektroforez tankına aparat yerleştirilmiştir. Her bir örnekten 8 µL alınarak 2 µL 6X Bromphenol Mavisi yükleme boyası ile boyanmıştır. DNA örnekleri mikropipet yardımıyla kuyucuklara yüklenmiştir. Örneklerin moleküler ağırlıklarını belirlemek amacıyla kuyucuklardan birine 3 µL marker DNA O'RangeRuler™ 100 bp DNA Ladder yüklenmiştir. Aparata jelin üzerini kaplayacak kadar yürütme tamponu eklenmiştir. 80 V/cm² voltaj ve 40 mA amper uygulanarak yaklaşık 45 dakikada yürütme işlemi tamamlanmıştır. PZR ürünlerinin elektroforez ile yürütüldüğü jel daha sonra jel görüntüleme cihazı (Gel Logic 2200 Pro Imaging System, USA) kullanılarak bantların göreceli miktarlarını belirlemek için taranmıştır [107].

2.2.8. DNA Sekans Analizi

İzole edilen Fe10, Cu12 ve Cr07 suşlarının 16S rRNA gen sekansları yapılacaktır. Saflaştırılmış PZR ürünleri, DNA sekans analizi için Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne (Ankara, Türkiye) gönderilmiştir. Gelen nükleotid dizilerinin, çift yönlü dizi analizi ile 16S rRNA sekanslarının NCBI Gen Bankası sonuçlarına göre % benzerlikleri bulunmuştur [115].

2.2.9. Filogenetik Soy Ağaçlarının Oluşturulması

İzole edilen demir, bakır ve krom dirençli bakterilerin 16S rRNA gen sekans dizileri Clustal Multiple Alignment Program (ClustalW 2.0) kullanılarak dizinler oluşturulmuştur. Filogenetik ağaçları, Mega 5.2 programında komşu bağlantı (neighbour-joining) metodu ile çizilmiştir [115].

2.2.10. Bakteri Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi

Her bir suşun metal içeren ve içermeyen bir gecelik kültürlerinden 100 µL örnek alınarak yine Her bir suş için MTK değerleri belirlenmiş metal içeren 100 mL NB ortamına ekim yapılmıştır. Kültürle 30°C ve 37°C'de çalkalamalı etüvde inkübe edilmiş ve 0. saatten itibaren optik density OD₆₀₀ nm'de, her iki saatte bir spektrofotometre ile ölçüm değerleri alınarak üreme eğrisi çıkarılmıştır [109].

2.2.11. Koloni Oluşturan Birim Sayımı

Bir gecelik kültürlerden 100 µL alınıp her bir suş için ilgili metali içeren ve içermeyen sıvı ortamlara ekim yapıp ekim yapılan ortamlardan her 2 saatte bir 1 mL örnek alınıp seyreltme yapılmış, seyreltilmiş örnekler plate count agarlara ekilip bir gün beklenerek koloni oluşumu gözlemlenip sayılmıştır. [102].

2.2.12. Biyosorpsiyon Kapasitelerinin Belirlenmesi

MTK değerleri dikkate alınarak Fe10 kodlu suş için 16, Cu12 kodlu suş için 12, Cr07 kodlu suş için 8 tane sıvı besi yeri hazırlanmıştır. Besiyerlerine bir gecelik kültürlerden 100 µL konulup; 30°C sıcaklıkta çalkalamalı etüvde üremeye bırakılmıştır. Sırasıyla her iki saatte bir besiyerlerinden birisi alınıp 20 dakika, 5000 rpm'de santrifüj edilip süpernatant ayrı bir tüpe alınarak besiyeri ortamından bakteri uzaklaştırılmıştır. Besiyeri ortamında kalan ağır metal miktarı atomik absorpsiyon spektrofotometresi (Perkin Elmer, USA) ile ölçülerek bakterinin biyosorpsiyon yeteneği değerlendirilmiştir [108].

2.2.13. İzolatların SEM Analizleri

Biyosorpsiyon kapasitesi gösteren Cr dirençli saf kültür dirençli olduğu metali içeren ve içermeyen ortamda gerekli üreme sıcaklığında 24- 48 saat inkübe edildikten paraformaldehit ile fiksasyonu yapılarak örnekten 5µ numune tutucu üzerine konularak altın kaplama yapılmıştır. Kaplama işleminden sonra elektron mikroskopunda incelenmiştir. [115].

2.2.14. İzoterm Çalışmaları

Biyosorpsiyon izotermeleri sabit sıcaklıkta ve dengede metal konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak metal biyosorpsiyonunu tanımlar. Bu çalışmada izoterm eşitlikleri metal biyosorpsiyonu için uygulanmış ve biyosorpsiyon için en iyi uyumu hangi denklemin sağladığı tespit edilmeye çalışılmıştır. İçerisinde 4, 8, 12, 16 ve 20 mg/L'lik konsantrasyonlarda krom içeren 25 mL'lik 5 adet erlene, kurutulan bakteriler, her bir erlen için 15 mg olacak şekilde eklenmiştir. 120 dakika sonra erlenlerden örnekler ependorf tüplere alınmıştır. 20 dakika, 10000 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatant ayrı bir tüpe alınarak besiyeri ortamından bakteri uzaklaştırılmıştır. Besiyeri ortamında kalan ağır metal miktarı atomik absorpsiyon spektrofotometresi (Perkin Elmer, USA) ile ölçülmüş ve izoterm eğrileri çizilmiştir [122].

2.2.15. Kinetik Çalışmaları

İçerisinde 20 mg/L krom içeren 15 mL'lik 6 adet erlene, kurutulan bakteriler, her bir erlen için 15 mg olacak şekilde eklenmiştir. 20, 40, 60, 80, 100 ve 120. dakikalarda erlenlerden örnekler ependorf tüplere alınmıştır. 20 dakika, 10000 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatant ayrı bir tüpe alınarak besiyeri ortamından bakteri uzaklaştırılmıştır. Besiyeri ortamında kalan ağır metal miktarı atomik absorpsiyon

spektrofotometresi (Perkin Elmer, USA) ile ölçülmüş ve kinetik eğrileri çizilmiştir [122].

2.2.16. FTIR Analizi ile Bakterilerin Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi

Yeterli miktarda sıvı besiyeri hazırlandıktan sonra bakteriler üremeye bırakılmıştır. Üreyen bakteriler 10000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir ve süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Bakterilerin bulunduğu pellet kısmı 2 kere distile su ile yıkayıp tekrar santrifüjlenmiştir. Pellet kısmı 55°C'de etüvde bir gece kurumaya bırakılmıştır. Sıvıdan tamamen ayrılan kuru bakterilerin analizi FTIR spektrum cihazı (Bruker, Vertex 70V, USA) ile yapılarak fonksiyonel grupların değerlendirilmesi yapılmıştır [120].

2.2.17. Zeta Potansiyeli Ölçümü

Bir gecelik kültürlerden ependorfa alınan bakteriler 14500 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Besiyeri ortamdan uzaklaştırılmış ve bakterinin üzerine 1 mL distile su konularak süspanse edilmiştir. Bu karışımdan 100 µL çekilerek hazırlanan 5 farklı metal konsantrasyonu içeren deney tüplerine eklenmiştir. Örnekler, oda sıcaklığında, 120 rpm'de çalkalamalı etüvde 2-5 saat bırakılmıştır. Süre sonunda alınan örneklerin analizi (Zeta Sizer Nano, Malvern, UK) yapıldıktan sonra değerlendirilmiştir [130].

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. Bakterilerin İzolasyonu

Laboratuvarımız tarafından daha önce yapılan çalışmalar [109,110] ile Kırıkkale-Kızılırmak'tan demir, bakır ve krom dirençli suşlar izole edilmiş ve suşlar dirençli oldukları metalleri ve izole edildikleri lokasyonu temsil edecek şekilde kodlanarak kültüre alınmıştır. Demir dirençli olan suş Fe10, bakır dirençli olan suş Cu12 ve krom dirençli olan suş ise Cr07 olarak kodlanmıştır.

3.2. Bakterilerin Tanımlanması

3.2.1. FAME ile Tanımlama

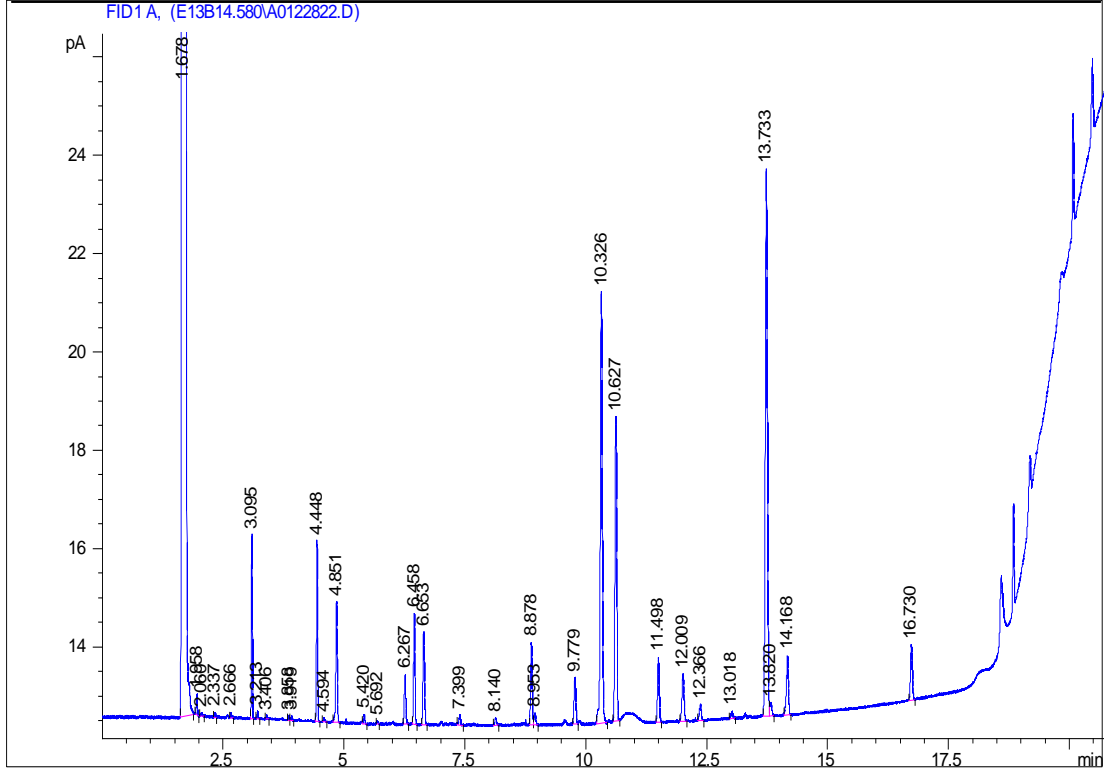
3.2.1.1. Fe10 Kodlu Suşun FAME Analizi

Fe10 kodlu suşun içerdiği yağ asitleri yüzde oranları Çizelge 3.1'de ve GC kromotogramı Şekil 3.1'de verilmiştir. Fe10 kodlu suşun yağ asidi profilinin % 32.26 oranında C_{18:1} w9c, % 15.87 oranında C_{16:0} ve % 5.52 oranında C_{12:0} içerdiği belirlenmiştir. % 24.16 oranında yağ asidi ise tanımlanamamıştır. Yağ asidi profili temel alınarak yapılan veri tabanı analizi sonucu Fe10 kodlu suş 0.334 SI ile *Acinetobacter calcoaceticus* olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 3.1. Fe10 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri (Agilent 6890N GC, USA cihazı çıktısı)

RT	Response	Ar/Ht	RFCt	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.678	3.792E+8	0.026	----	7.011	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.958	1287	0.025	----	7.557		----	< min rt	
2.060	326	0.040	----	7.754		----	< min rt	
2.337	277	0.023	----	8.294		----	< min rt	
2.666	370	0.028	----	8.933		----	< min rt	
3.095	9790	0.020	----	9.770		----		
3.213	434	0.023	1.232	10.000	10:0	0.28	ECL dev. 0.000	Reference -0.001
3.406	226	0.030	----	10.273		----		
3.858	273	0.024	1.134	10.914	Sum In F2	0.16	ECL dev. 0.000	12:0 ALDE ?
3.919	283	0.025	1.126	10.999	11:0	0.17	ECL dev.-0.001	Reference -0.002
4.448	11887	0.026	----	11.568		----		
4.594	278	0.030	----	11.725		----		
4.851	10061	0.032	1.045	12.001	12:0	5.52	ECL dev.0.001	Reference -0.002
5.420	759	0.033	1.014	12.489	unknwn12.484	0.40	ECL dev. 0.005	
5.692	221	0.027	----	12.722		----		
6.267	4577	0.035	0.978	13.182	12:0 2OH	2.35	ECL dev.0.005	
6.458	9042	0.032	----	13.320		----		
6.653	8617	0.037	0.966	13.461	12:0 3OH	4.37	ECL dev.0.007	
7.399	969	0.038	0.947	14.000	14:0	0.48	ECL dev0.000	Reference -0.003
8.140	814	0.039	0.934	14.478	Sum In Feature 1	0.40	ECL dev.0.000	15:1 ISO I/13:0 3OH
8.878	7674	0.035	0.924	14.953	unknwn 14.959	3.72	ECL dev. -0.006	
8.953	1116	0.035	0.923	15.002	15:0	----	ECL dev.0.002	
9.779	5003	0.042	0.916	15.494	Sum In F	2.40	ECL dev. 0.006	14:0 3OH/16:1 ISO I
10.326	50440	0.045	0.913	15.820	Sum In F3	24.16	ECL dev.-0.002	16:1 w7c/15 iso 2OH
10.627	33178	0.041	0.912	15.999	16:0	15.87	ECL dev.-0.001	Reference -0.004
11.498	6682	0.040	0.909	16.501	15:0 3OH	3.19	ECL dev.-0.002	
12.009	5625	0.046	0.909	16.795	17:1 w8c	2.68	ECL dev.0.003	
12.366	1896	0.042	0.909	17.000	17:0	0.90	ECL dev.0.000	Reference -0.003
13.018	823	0.043	----	17.369		----		
13.733	67520	0.048	0.911	17.773	18:1 w9c	32.26	ECL dev.0.004	
13.820	1443	0.037	0.911	17.822	18:1 w7c	0.69	ECL dev.-0.001	
14.168	6935	0.042	----	18.019		----		
16.730	6183	0.043	----	19.485		----		
----	814	---	----	----	Sum F1	0.40	15:1 ISO H/13:0 3OH	13:0 3OH/15:1 i I/H
----	-----	---	----	----		----	15:1 ISO I/13:0 3OH	
----	5276	---	----	----	Sum F2	2.57	12:0 ALDE ?	unknwn 10.928
----	-----	---	----	----		----	16:1 ISO I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 ISO I
----	50440	---	----	----	SummFee 3	24.16	16:1 w7c/15 is2OH	15:0 ISO /16:1w7c

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA50 5.00	0.334	<i>Acinetobacter-calcoaceticus</i>
	0.278	<i>Acinetobacter-haemolyticus</i>



Şekil 3.1. Fe10 kodlu suş a ait GC kromotogramı (Agilent 6890N GC, USA cihazı çıktısı)

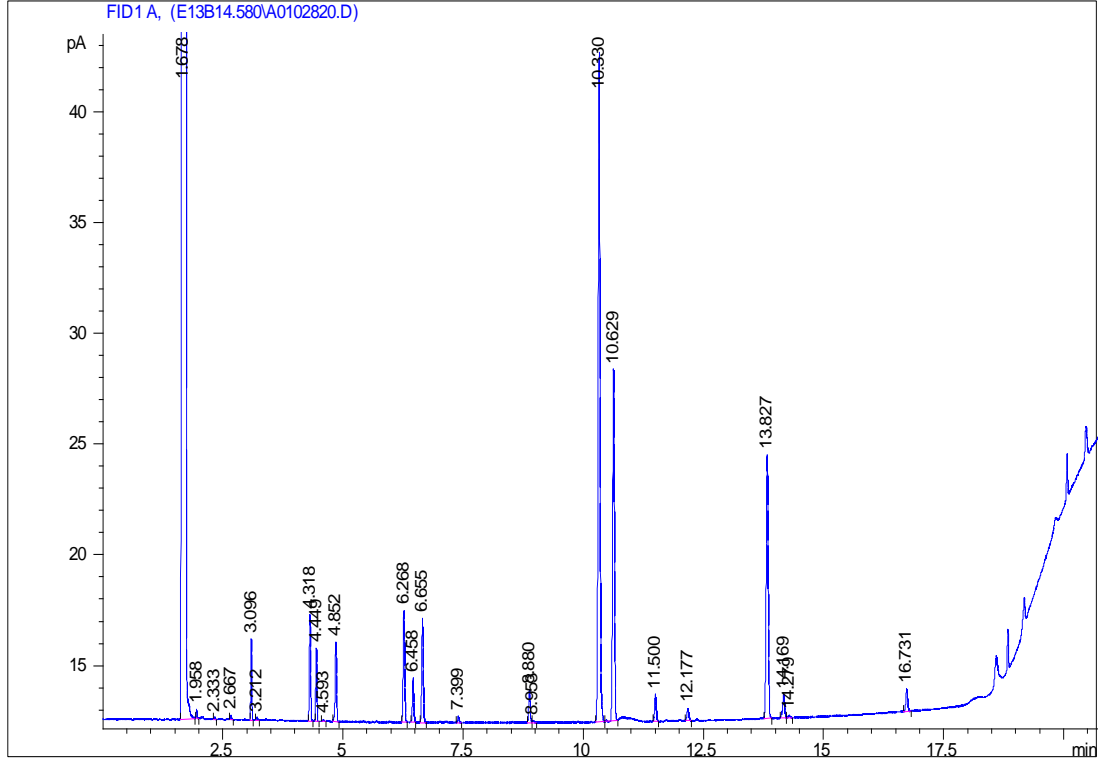
3.2.1.2. Cu12 Kodlu Suşun FAME Analizi

Cu12 kodlu suşun içerdiği yağ asitleri yüzde oranları Çizelge 3.2.'te ve GC kromotogramı Şekil 3.2'de verilmiştir. Cu12 kodlu suş % 19.85 oranında C_{16:0}, % 17.2 oranında C_{18:1} w7c ve % 5.63 oranında C_{12:0} 2OH içermektedir. % 38.80 oranında yağ asidi ise tanımlanamamıştır. Yağ asidi profili temel alınarak yapılan veri tabanı analizinde Cu12 kodlu suşun 0.331 SI ile *Pseudomonas syringae* ile eşleştiği tespit edilmiştir.

Çizelge 3.2. Cu12 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri (Agilent 6890N GC, USA cihazı çıktısı)

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.678	3.809E+8	0.026	----	7.015	SOLVENTPEAK	----	< min rt	
1.958	1157	0.024	----	7.561		----	< min rt	
2.333	260	0.023	----	8.290		----	< min rt	
2.667	580	0.027	----	8.940		----	< min rt	
3.096	9637	0.020	----	9.774		----		
3.212	386	0.027	1.232	9.999	10:0	0.12	ECL de -0.001	Ref-0.004
4.318	17748	0.030	1.089	11.429	10:0 3OH	4.98	ECL dev 0.007	
4.449	10703	0.026	----	11.570		----		
4.593	226	0.028	----	11.724		----		
4.852	14892	0.031	1.045	12.002	12:0	4.01	ECL dev 0.002	Ref-0.001
6.268	22329	0.034	0.978	13.182	12:0 2OH	5.63	ECL dev0.005	
6.458	8101	0.032	----	13.320		----		
6.655	21753	0.036	0.966	13.461	12:0 3OH	5.42	ECL dev 0.007	
7.399	1424	0.036	0.947	13.999	14:0	0.35	ECL dev-0.001	Ref -0.003
8.880	6635	0.036	0.924	14.953	unknwn 14.959	1.58	ECL dev0.006	
8.953	420	0.036	0.923	15.000	15:0	----	ECL dev0.000	
10.330	164992	0.043	0.913	15.820	Sum In F 3	38.80	ECL dev -0.002	16:1 w7c/15 iso 2OH
10.629	84533	0.042	0.912	15.999	16:0	19.85	ECL dev -0.001	Ref -0.003
11.500	5903	0.038	0.909	16.499	15:0 3OH	1.38	ECL dev -0.004	
12.177	3039	0.044	0.909	16.889	17:0 CYCLO	0.71	ECL dev0.001	Ref 0.000
13.827	72555	0.049	0.911	17.823	18:1 w7c	17.02	ECL dev 0.000	
14.169	6100	0.045	----	18.017		----		
14.279	647	0.036	0.912	18.079	11 methyl 18:1 w7c	0.15	ECL dev -0.002	
16.731	5552	0.045	----	19.481		----		
----	164992	---	----	----	Sum F3	38.80	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA50 5.00	0.331	<i>Pseudomonas-syringae-syringae</i>
	0.308	<i>Pseudomonas-fluorescens-biotype A</i>
	0.279	<i>Pseudomonas-fluorescens-biotype B</i>
	0.270	<i>Paucimonas-lemoignei</i>
	0.229	<i>Vibrio-hollisae</i>
	0.225	<i>Pseudomonas-huttiensis</i>
	0.214	<i>Pseudomonas-syringae-maculicola</i>
	0.200	<i>Neisseria-sicca</i>
	0.199	<i>Vibrio-cholerae-Ogawa</i>



Şekil 3.2. Cu12 kodlu suşun GC kromotogram (Agilent 6890N GC, USA cihazı çıktısı)

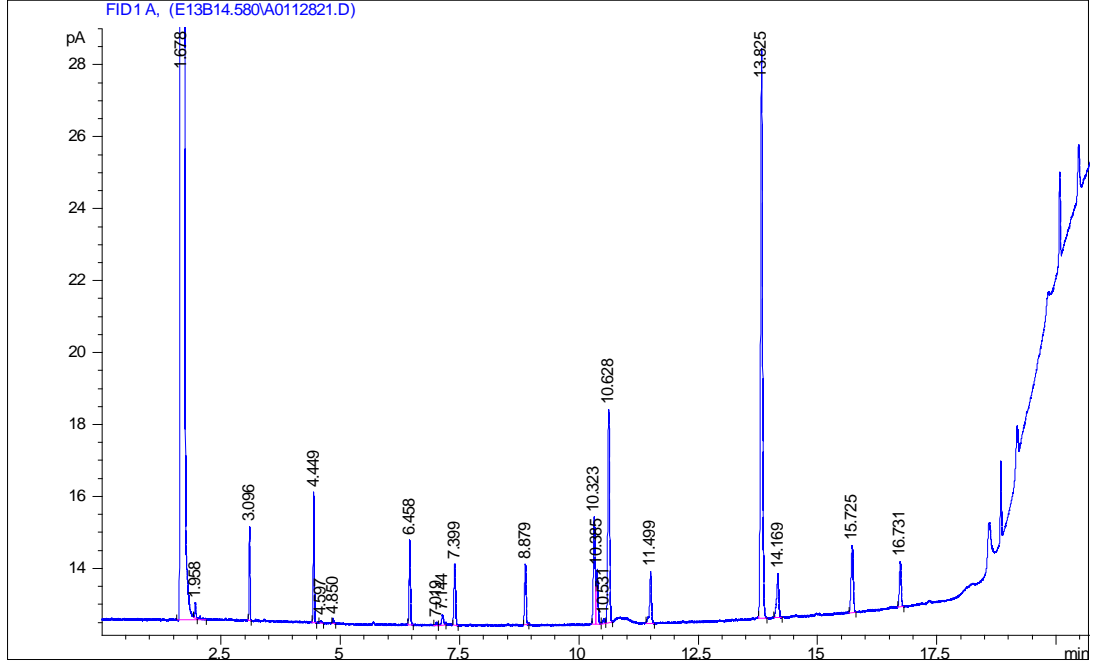
3.2.1.3. Cr07 Kodlu Suşun FAME Analizi

Cr07 kodlu suşun içerdiği yağ asitleri yüzde oranları Çizelge 3.3'de ve GC kromotogramı Şekil 3.3'da verilmiştir. Cr07 kodlu suşun yağ asidi profilinin % 49.62 oranında C_{18:1} w7c, % 17.52 oranında C_{16:0} ve % 6.19 oranında C_{19:0} cyclo w8c içerdiği belirlenmiştir. % 13.39 oranında yağ asidi ise tanımlanamamıştır. Yağ asidi profili temel alınarak yapılan veri tabanı analizi sonucu Cr07 kodlu suş 0.373 SI ile *Enterococcus faecium* olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 3.3. Cr07 suşuna ait yağ asidi profilleri (Agilent 6890N GC, USA cihazı çıktısı)

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.678	3.76E+8	0.026	----	7.014	SOLVENT P	----	< min rt	
1.958	1345	0.026	----	7.558		----	< min rt	
3.096	6895	0.020	----	9.772		----		
4.449	11908	0.026	----	11.571		----		
4.597	260	0.032	----	11.730		----		
4.850	486	0.027	1.045	12.001	12:0	0.30	ECL dev 0.001	R -0.003
6.458	9357	0.032	----	13.321		----		
7.019	294	0.035	----	13.725		----		
7.144	1615	0.044	----	13.815		----		
7.399	7869	0.036	0.947	14.000	14:0	4.45	ECL dev 0.000	R -0.003
8.879	7608	0.036	0.924	14.953	unknown 14.959	4.20	ECL dev-0.006	
10.323	16830	0.043	0.913	15.817	Sum In Feature 3	9.18	ECL dev -0.005	16:1 w7c/15 i2OH
10.385	7718	0.040	0.913	15.854	Sum In Feature 3	4.21	ECL dev 0.002	15:0 ISO 2OH/w7c
10.531	720	0.043	----	15.940		----		
10.628	32164	0.043	0.912	15.998	16:0	17.52	ECL dev-0.002	R -0.004
11.499	7957	0.043	0.909	16.500	15:0 3OH	4.32	ECL dev -0.003	
13.825	91162	0.043	0.911	17.823	18:1 w7c	49.62	ECL dev 0.000	
14.169	7840	0.050	----	18.017		----		
15.725	11306	0.048	0.916	18.903	19:0 CYCLO w8	6.19	ECL dev 0.001	R 0.001
16.731	6439	0.039	----	19.480		----		
----	24547	---	----	----	Summed Feat 3	13.39	16:1 w7c/15ISO2OH	15:0 ISO 2OH/16:1

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA50 5.00	0.373	<i>Enterococcus-faecium</i> -GC subgroup A
	0.351	<i>Enterococcus-durans</i> -GC subgroup A
	0.285	<i>Enterococcus-durans</i> -GC subgroup B



Şekil 3.3. Cr07 kodlu suşa ait GC kromotogramı (Agilent 6890N GC, USA cihazı çıktısı)

3.2.2. 16S rRNA Sekans Analizi ile Tanımlama

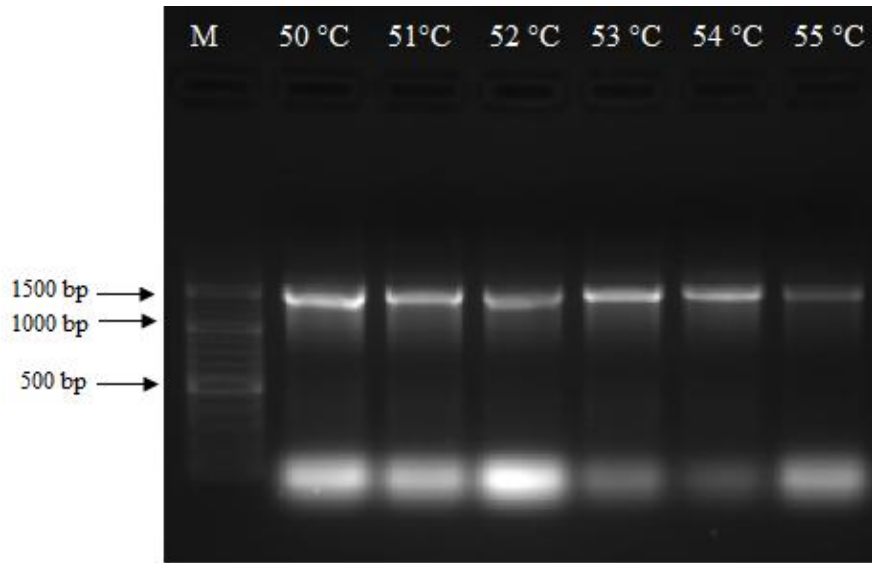
Yağ asidi analizinden elde edilen bulgular düşük SI değerlerine sahip olduğu için bakteriler ayrıca 16 S rRNA sekans analizi kullanılarak da tanımlanmıştır. Bu amaçla bakterilerden kromozomal DNA izole edilmiş, PZR optimizasyonu çalışmaları yapılmış ve saflaştırılmış PZR ürünleri DNA sekans analizi için kullanılmıştır. 16 S rRNA sekans analizi sonucunda elde edilen nükleotid dizileri, BLAST programı kullanılarak bakteriyel tanımlama yapılmıştır.

3.2.2.1. Kromozomal DNA izolasyonu

PZR amplifikasyonu öncesi izole edilmiş suşlardan kromozomal DNA izolasyonu yapılmış ve % 1'lik agaroz jelde yürütülerek belirlenmiştir.

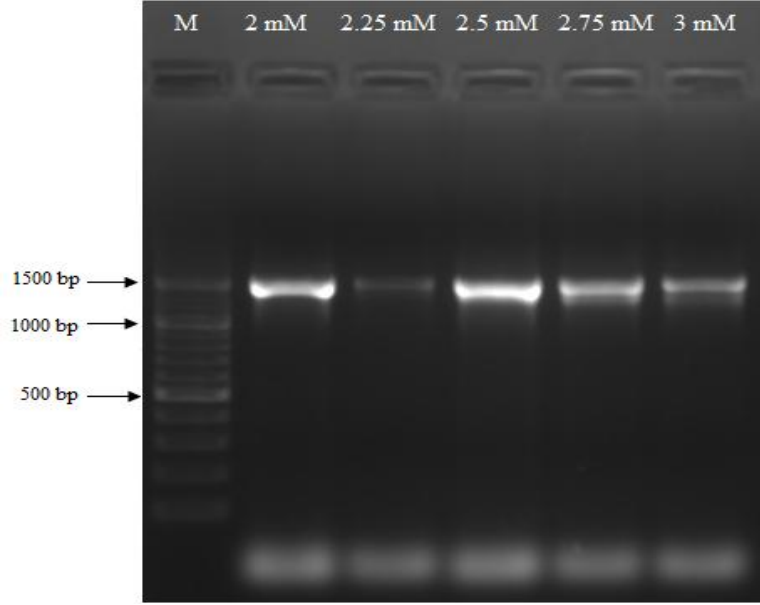
3.2.2.2. Fe10 Kodlu Suşun PZR Optimizasyonu

16S rRNA bölgeleri PZR'da çoğaltıldıktan sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerinin yaklaşık 1500 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir. Şekil 3.4'de Fe10 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 54°C olduğu görülmektedir.



Şekil 3.4. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında Fe10 kodlu suşa ait PZR ürünleri (M, marker)

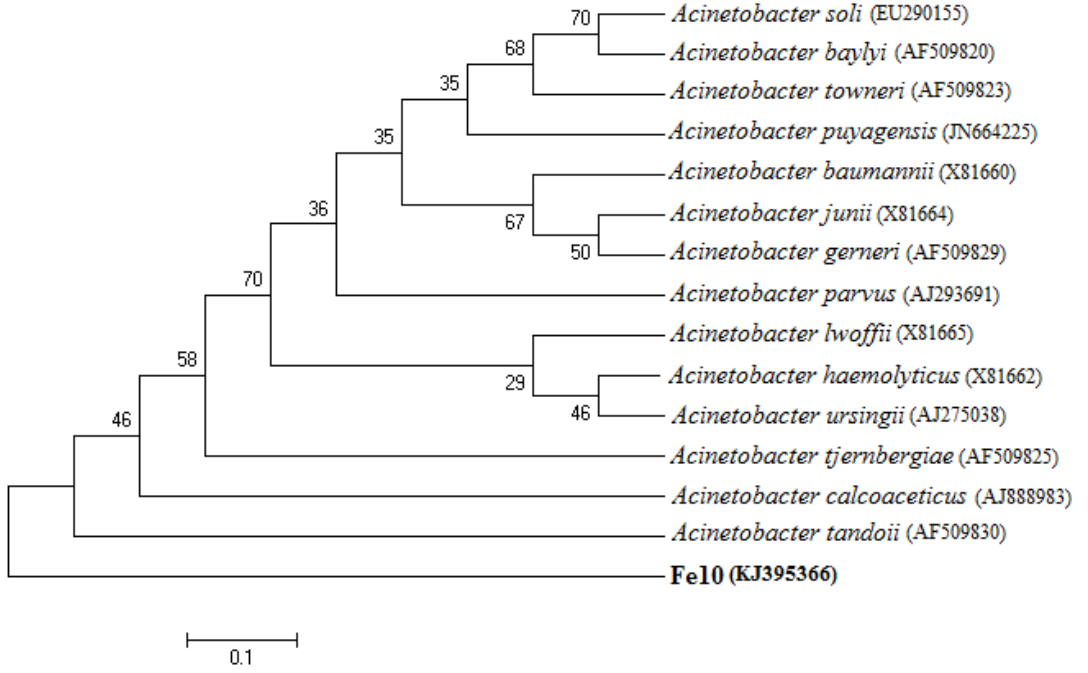
Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik bağlanmanın giderilmesi için farklı MgCl₂ konsantrasyonları denenmiştir. Bu sırada diğer PZR şartları sabit tutulmuştur. Şekil 3.5'de Fe10 suşuna ait farklı MgCl₂ konsantrasyonlarındaki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu MgCl₂ konsantrasyonu 2 mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.5. Farklı MgCl₂ konsantrasyonlarında Fe10 suşuna ait PZR ürünleri (M, marker)

3.2.2.3. Fe10 Kodlu Suşun 16 S rRNA Sekans Analizi ile Tanımlanması

16S rRNA sekans analizi sonucunda elde edilen nükleotid dizileri, National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki BLAST programı doğrultusunda yayımlanan sekanslarla kıyaslanmıştır. Gen bankasında yapılan BLAST analizlerinde Fe10 kodlu suşun % 99 oranında *Acinetobacter calcoaceticus* ile homoloji gösterdiği saptanmış ve bu tür için gen bankasından KJ395366 kodu alınmıştır. Fe10 kodlu suşun filogenetik ağacı, 16S rRNA gen sekans dizisi kullanılarak MEGA 5.2 programında neighbour-joining metodu kullanılarak çizilmiştir. Şekil 3.6'da görüldüğü gibi Fe10 kodlu suşun homoloji gösterdiği ilk 15 bakteri ile soy ağacı oluşturulmuştur



Şekil 3.6. Fe10 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.1; nükleotidler arasındaki farkı göstermektedir)

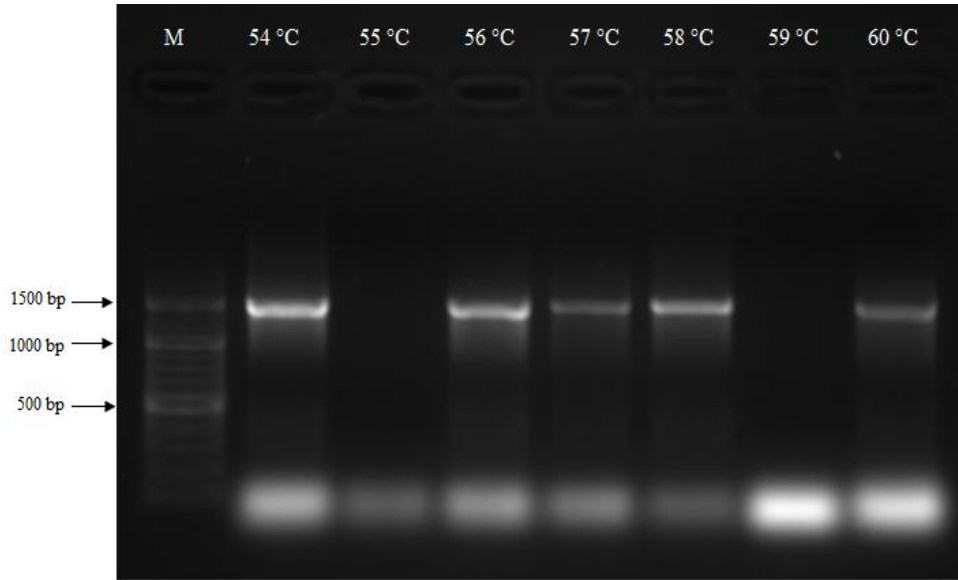
Soy ağacını desteklemek amacıyla uzaklık matrisleri (distance matrix) MEGA 5.2 programı ile hesaplanmıştır (Çizelge 3.4). Filogenetik analizler sonucunda Fe10 kodlu suşa en yakın tür *Acinetobacter calcoaceticus* en uzak tür ise *Acinetobacter baylyi* olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3.4. Fe10 kodlu suş için 16S rRNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri

Türler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. Fe10															
2. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1.124														
3. <i>Acinetobacter haemolyticus</i>	1.155	0.019													
4. <i>Acinetobacter soli</i>	1.201	0.022	0.034												
5. <i>Acinetobacter lwoffii</i>	1.180	0.027	0.024	0.026											
6. <i>Acinetobacter tandoii</i>	1.129	0.035	0.022	0.043	0.043										
7. <i>Acinetobacter tjernbergiae</i>	1.157	0.032	0.027	0.046	0.043	0.032									
8. <i>Acinetobacter baumannii</i>	1.169	0.027	0.025	0.022	0.036	0.037	0.041								
9. <i>Acinetobacter ursingii</i>	1.180	0.025	0.028	0.034	0.033	0.041	0.045	0.033							
10. <i>Acinetobacter puyagensis</i>	1.180	0.030	0.030	0.023	0.033	0.047	0.045	0.027	0.041						
11. <i>Acinetobacter junii</i>	1.169	0.032	0.031	0.027	0.036	0.038	0.045	0.015	0.033	0.031					
12. <i>Acinetobacter gerneri</i>	1.186	0.046	0.043	0.039	0.047	0.047	0.048	0.029	0.044	0.038	0.027				
13. <i>Acinetobacter parvus</i>	1.162	0.031	0.024	0.025	0.034	0.028	0.034	0.024	0.033	0.031	0.019	0.041			
14. <i>Acinetobacter baylyi</i>	1,189	0.030	0.041	0.013	0.032	0.043	0.043	0.031	0.040	0.031	0.034	0.037	0.032		
15. <i>Acinetobacter towneri</i>	1.177	0.053	0.057	0.041	0.053	0.062	0.063	0.045	0.062	0.049	0.045	0.055	0.049	0.038	

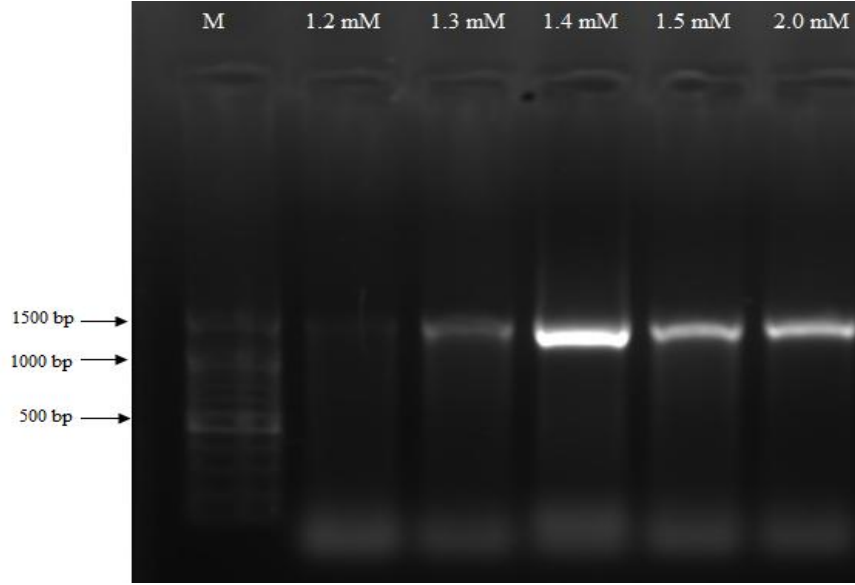
3.2.2.4. Cu12 Kodlu Suşun PZR Optimizasyonu

16S rRNA bölgeleri PZR'da çoğaltıldıktan sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerinin yaklaşık 1500 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir. Şekil 3.7'de Cu12 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 58°C olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.7. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında Cu12 kodlu suşa ait PZR ürünleri (M, marker)

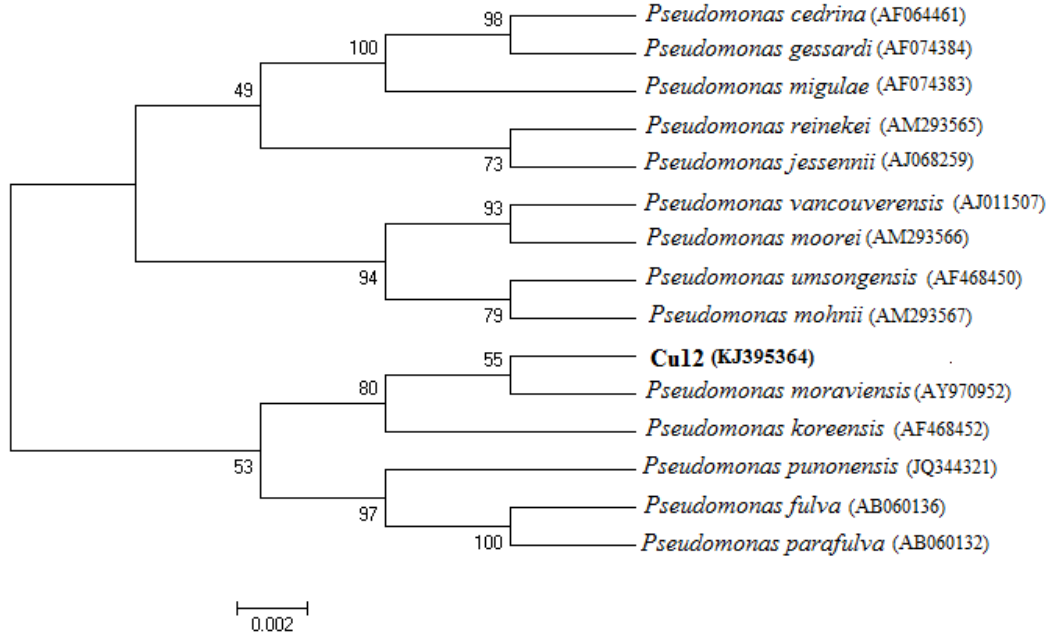
Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik bağlanmanın giderilmesi için farklı MgCl₂ konsantrasyonları denenmiştir. Bu sırada diğer PZR şartları sabit tutulmuştur. Şekil 3.8'de Cu12 suşuna ait farklı MgCl₂ konsantrasyonlarındaki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu MgCl₂ konsantrasyonu 2 mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.8. Farklı MgCl₂ konsantrasyonlarında Cu12 suşuna ait PZR ürünleri (M, marker)

3.2.2.5. Cu12 Kodlu Suşun 16S rRNA Sekans Analizi ile Tanımlanması

16S rRNA sekans analizi sonucunda elde edilen nükleotid dizileri, National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki BLAST programı doğrultusunda yayımlanan sekanslarla kıyaslanmıştır. Gen bankasında yapılan BLAST analizlerinde Cu12 kodlu suşun % 99 oranında *Pseudomonas koreensis* ile homoloji gösterdiği saptanmış ve bu tür için gen bankasından KJ395364 kodu alınmıştır. Cu12 kodlu suşun filogenetik ağacı, 16S rRNA gen sekans dizisi kullanılarak MEGA 5.2 programında neighbour-joining metodu ile çizilmiştir. Şekil 3.9'da görüldüğü gibi Cu12 kodlu suşun homoloji gösterdiği ilk 15 bakteri ile soy ağacı oluşturulmuştur.



Şekil 3.9. Cr07 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.002; nükleotidler arasındaki farkı göstermektedir)

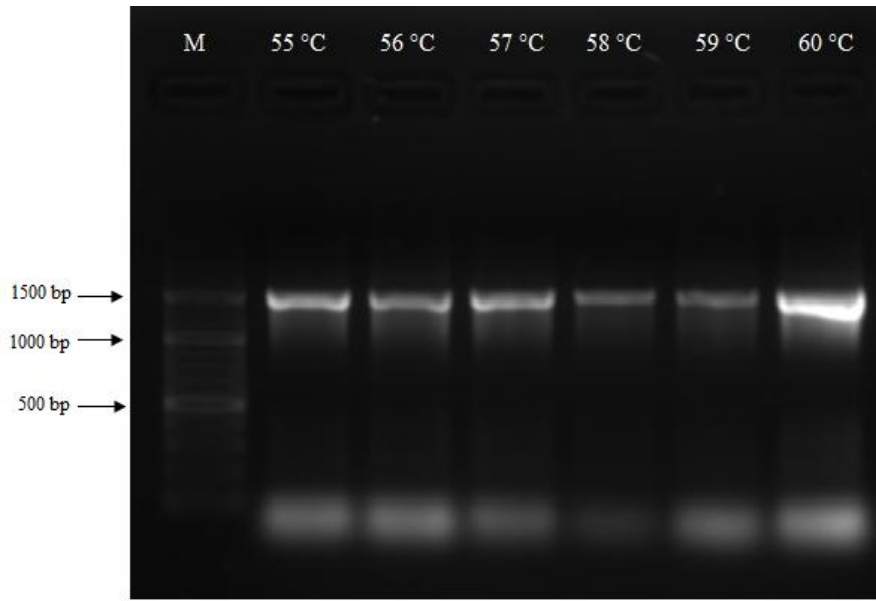
Soy ağacını desteklemek amacıyla uzaklık matrisleri (distance matrix) MEGA 5.2 programı ile hesaplanmıştır (Çizelge 3.5). Filogenetik analizler sonucunda Cu12 kodlu suşa en yakın tür *Pseudomonas koreensis* en uzak tür ise *Pseudomonas punonensis* olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3.5. Cu12 kodlu suş için 16S rRNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri

Türler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. Cu12															
2. <i>Pseudomonas koreensis</i>	0.017														
3. <i>Pseudomonas moraviensis</i>	0.018	0.003													
4. <i>Pseudomonas reinekei</i>	0.019	0.003	0.006												
5. <i>Pseudomonas vancouverensis</i>	0.024	0.007	0.009	0.007											
6. <i>Pseudomonas jessenii</i>	0.020	0.004	0.007	0.001	0.006										
7. <i>Pseudomonas umsongensis</i>	0.024	0.007	0.010	0.007	0.003	0.007									
8. <i>Pseudomonas mohnii</i>	0.024	0.007	0.010	0.007	0.002	0.007	0.001								
9. <i>Pseudomonas fulva</i>	0.027	0.010	0.013	0.012	0.015	0.011	0.017	0.016							
10. <i>Pseudomonas parafulva</i>	0.027	0.010	0.013	0.012	0.015	0.011	0.017	0.016	0.000						
11. <i>Pseudomonas moorei</i>	0.024	0.007	0.009	0.007	0.000	0.006	0.003	0.002	0.015	0.015					
12. <i>Pseudomonas cedrina</i>	0.034	0.018	0.021	0.017	0.021	0.018	0.020	0.021	0.028	0.028	0.021				
13. <i>Pseudomonas gessardii</i>	0.033	0.017	0.020	0.015	0.020	0.016	0.018	0.019	0.027	0.027	0.020	0.004			
14. <i>Pseudomonas migulae</i>	0.030	0.014	0.017	0.012	0.017	0.013	0.015	0.016	0.024	0.024	0.017	0.006	0.004		
15. <i>Pseudomonas punonensis</i>	0.035	0.020	0.021	0.021	0.019	0.021	0.022	0.021	0.015	0.015	0.019	0.037	0.036	0.033	

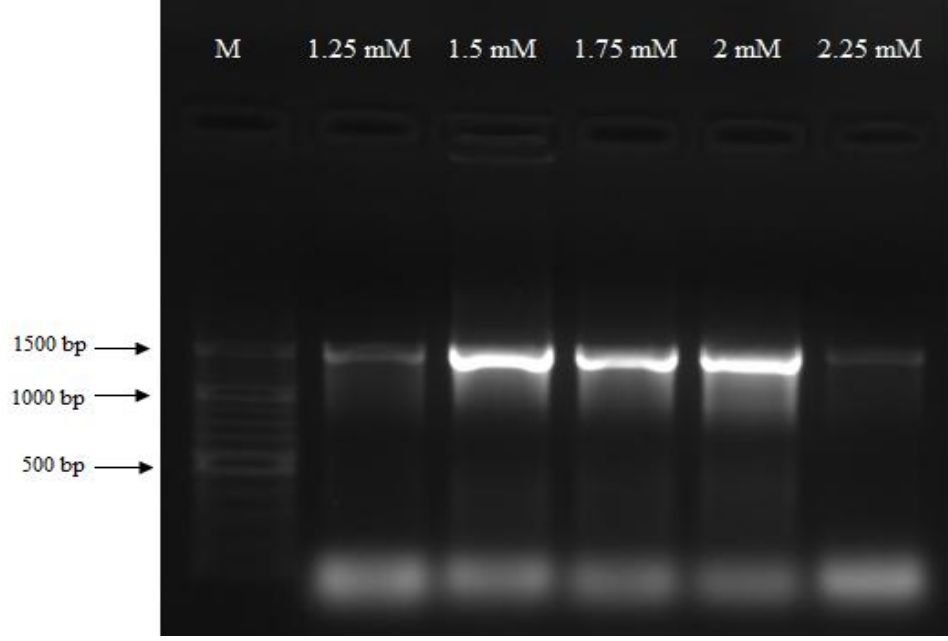
3.2.2.6. Cr07 Kodlu Suşun PZR Optimizasyonu

16S rRNA bölgeleri PZR'da çoğaltıldıktan sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerinin yaklaşık 1500 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir. Şekil 3.10'da Cr07 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 55°C olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.10. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında Cr07 kodlu suşa ait PZR ürünleri (M, marker)

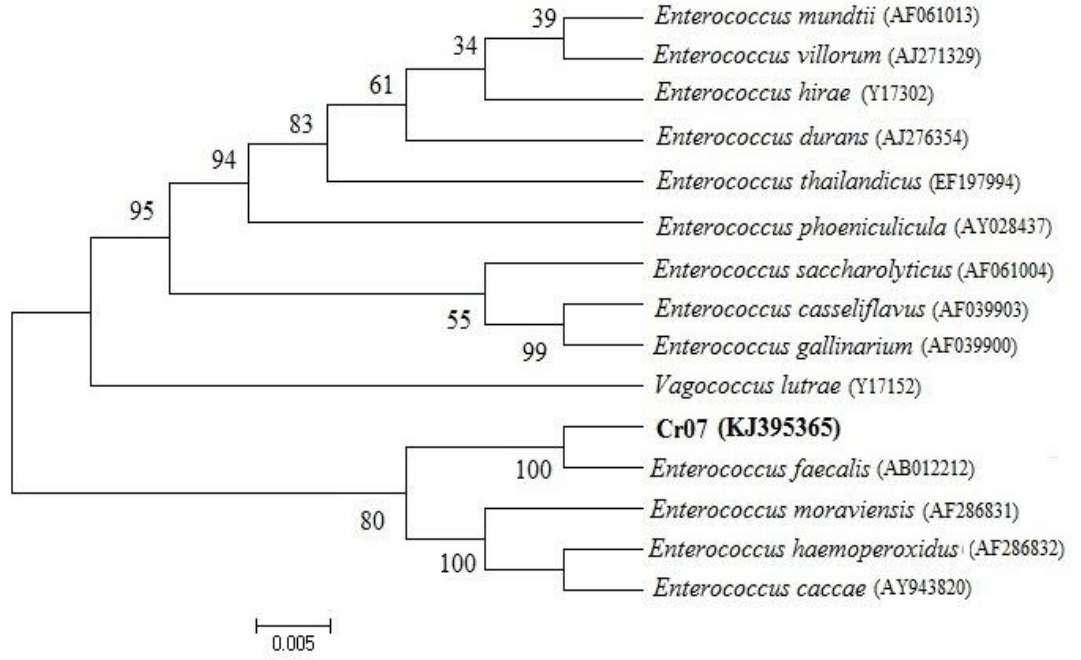
Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik bağlanmanın giderilmesi için farklı MgCl₂ konsantrasyonları denenmiştir. Bu sırada diğer PZR şartları sabit tutulmuştur. Şekil 3.11'de Cr07 suşuna ait farklı MgCl₂ konsantrasyonlarındaki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu MgCl₂ konsantrasyonu 2 mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.11. Farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında Cr07 suşuna ait PZR ürünleri (M, marker)

3.2.2.7. Cr07 Kodlu Suşun 16S rRNA Sekans Analizi İle Tanımlanması

16S rRNA sekans analizi sonucunda elde edilen nükleotid dizileri, National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki BLAST programı doğrultusunda yayımlanan sekanslarla kıyaslanmıştır. Gen bankasında yapılan BLAST analizlerinde Cr07 kodlu suşun % 99 oranında *Enterococcus faecalis* ile homoloji gösterdiği saptanmış ve bu tür için gen bankasından KJ395365 kodu alınmıştır. Cr07 kodlu suşun filogenetik ağacı, 16S rRNA gen sekans dizisi kullanılarak MEGA 5.2 programında neighbour-joining metodu ile çizilmiştir. Şekil 3.12'de görüldüğü gibi Cr07 kodlu suşun homoloji gösterdiği ilk 15 bakteri ile soy ağacı oluşturulmuştur.



Şekil 3.12. Cr07 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.005; nükleotidler arasındaki farkı göstermektedir)

Soy ağacını desteklemek amacıyla uzaklık matrisleri (distance matrix) MEGA 5.2 programı ile hesaplanmıştır (Çizelge 3.6). Filogenetik analizler sonucunda Cr07 kodlu suşa en yakın tür *Enterococcus faecalis*, en uzak tür ise *Enterococcus phoeniculicula* olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3.6. Cr07 kodlu suş için 16S rRNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri

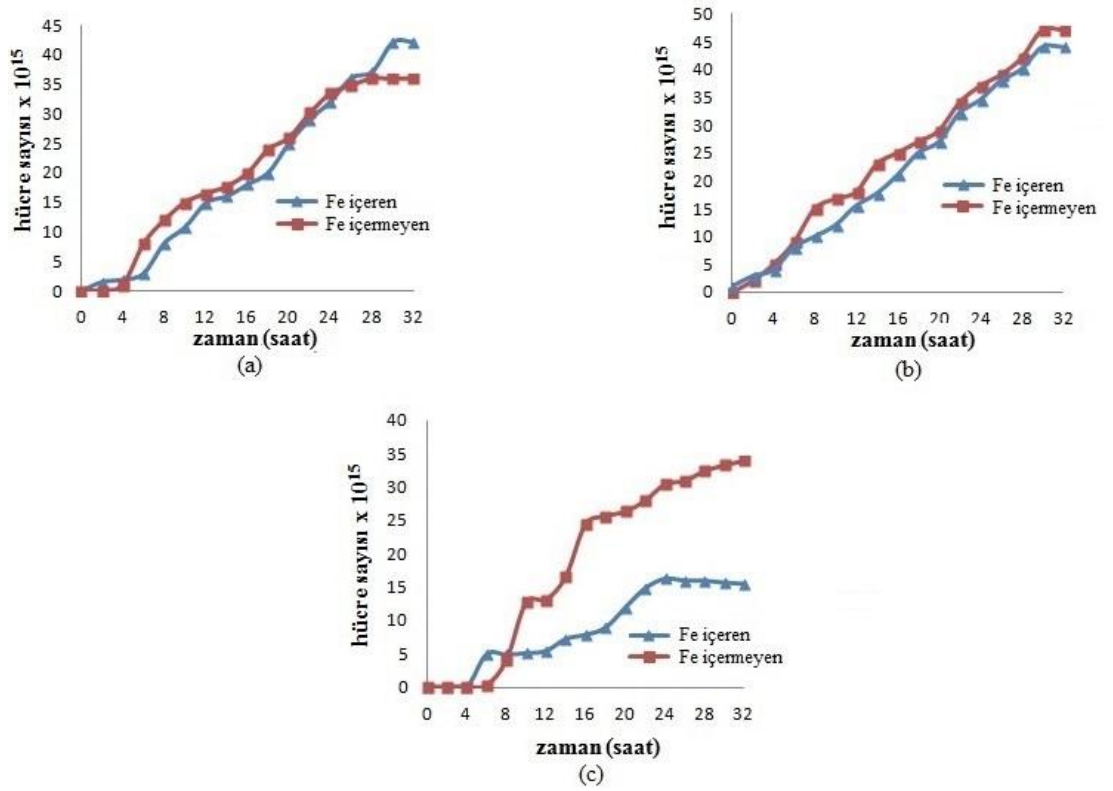
Türler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. Cr07															
2. <i>Enterococcus faecalis</i>	0.021														
3. <i>Enterococcus haemoperoxidus</i>	0.044	0.026													
4. <i>Enterococcus caccae</i>	0.047	0.027	0.003												
5. <i>Enterococcus moraviensis</i>	0.044	0.025	0.002	0.002											
6. <i>Enterococcus hirae</i>	0.062	0.040	0.036	0.036	0.034										
7. <i>Enterococcus durans</i>	0.062	0.041	0.036	0.037	0.035	0.003									
8. <i>Enterococcus thalandicus</i>	0.064	0.042	0.035	0.036	0.033	0.006	0.005								
9. <i>Enterococcus mundtii</i>	0.063	0.041	0.038	0.038	0.036	0.007	0.007	0.011							
10. <i>Enterococcus saccharolyticus</i>	0.067	0.045	0.050	0.050	0.047	0.033	0.033	0.037	0.036						
11. <i>Enterococcus casseliflavus</i>	0.063	0.041	0.045	0.046	0.044	0.021	0.020	0.019	0.024	0.021					
12. <i>Enterococcus gallinarium</i>	0.063	0.041	0.045	0.046	0.044	0.022	0.020	0.019	0.024	0.022	0.001				
13. <i>Vagococcus lutrae</i>	0.068	0.048	0.046	0.047	0.046	0.056	0.056	0.058	0.057	0.050	0.052	0.052			
14. <i>Enterococcus villorum</i>	0.066	0.044	0.040	0.041	0.039	0.008	0.009	0.013	0.011	0.030	0.021	0.022	0.056		
15. <i>Enterococcus phoeniculicula</i>	0.068	0.046	0.038	0.039	0.037	0.022	0.020	0.016	0.026	0.039	0.024	0.024	0.059	0.024	

3.3. Bakterilerin Optimum Üreme Koşulları

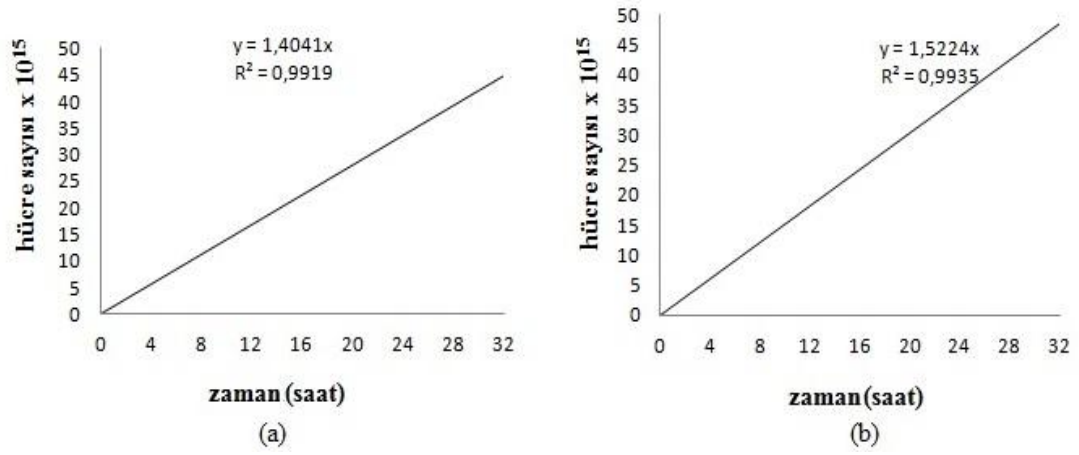
İzole edilmiş olan suşlar optimum üreme koşullarının belirlenmesi amacıyla değişik pH'larda üreme eğrileri çıkartılmıştır.

3.3.1. *A. calcoaceticus*'un Değişik pH'lardaki Üreme Eğrileri

A. calcoaceticus'un optimum üreme koşulların belirlenmesi amacıyla üreme eğrileri oluşturulmuş ve *A. calcoaceticus* için optimum pH' nın 7 olduğu belirlenmiştir. *A. calcoaceticus* pH 7'de 32 saatlik bir inkübasyon sonrasında demir içeren ortamda 44×10^{15} , demir içermeyen ortamda ise 47×10^{15} hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. pH 7'de demir varlığında hücre sayısında % 7 oranında bir düşüş tespit edilmiştir (Şekil 3.13). pH 7'de ki hücre sayısına bağlı standart eğrileri Şekil 3.14'de verilmiştir.



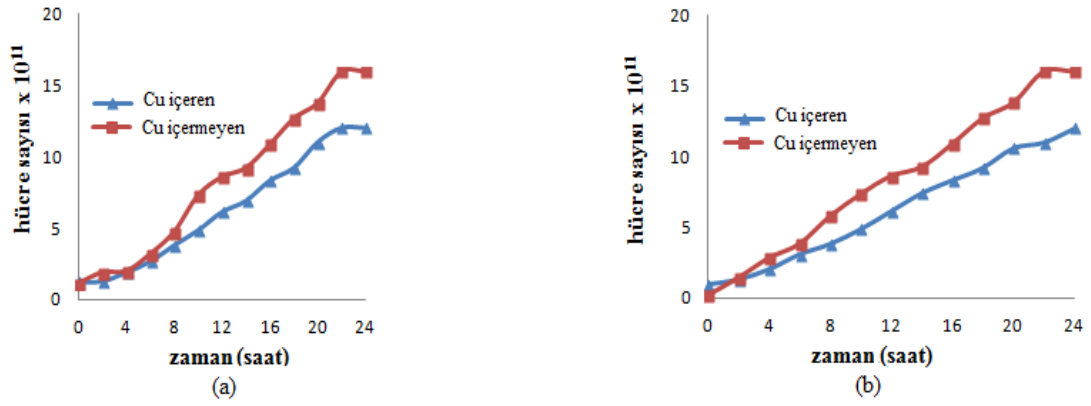
Şekil 3.13. *A. calcoaceticus*'un pH 6 (a), pH 7 (b), pH 9'daki (c) üreme eğrileri



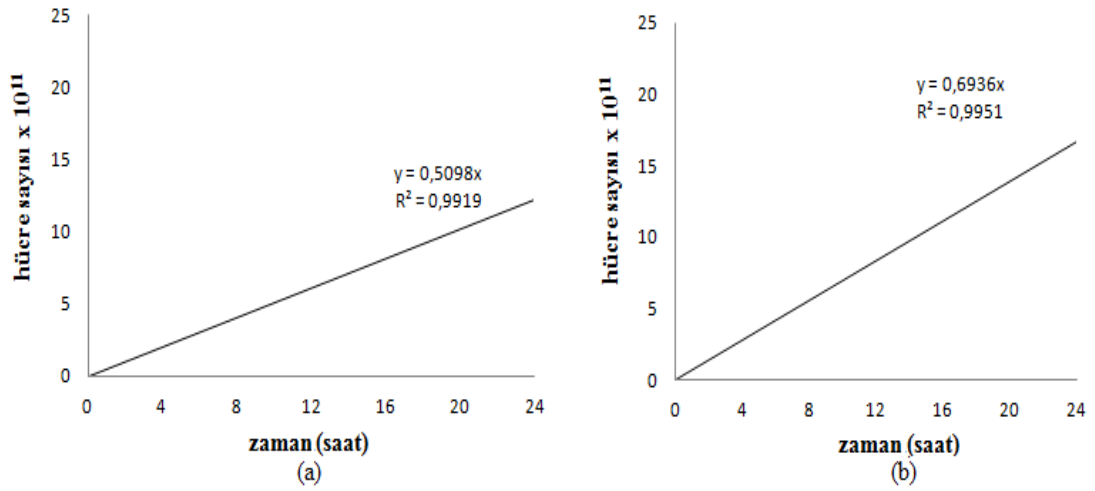
Şekil 3.14. *A. calcoaceticus*'un pH 7'deki demir içeren (a) ve içermeyen (b) ortamlardaki standart eğrileri

3.3.2. *P. koreensis*'in Değişik pH'lardaki Üreme Eğrileri

P. koreensis'in optimum üreme koşulların belirlenmesi üreme eğrileri oluşturulmuş ve *P. koreensis* için optimum pH'nın 7 olduğu belirlenmiştir. *P. koreensis* pH 7'de 24 saatlik bir inkübasyon sonrasında bakır içeren ortamda 12×10^{11} , bakır içermeyen ortamda ise 16×10^{11} hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. pH 7'de bakır varlığında, hücre sayısında % 15 oranında bir düşüş tespit edilmiştir (Şekil 3.15). pH 7'de ki hücre sayısına bağlı standart eğrileri şekil 3.16'da verilmiştir.



Şekil 3.15. *P. koreensis*'in pH 7 (a) ve pH 9' daki (b) üreme eğrileri

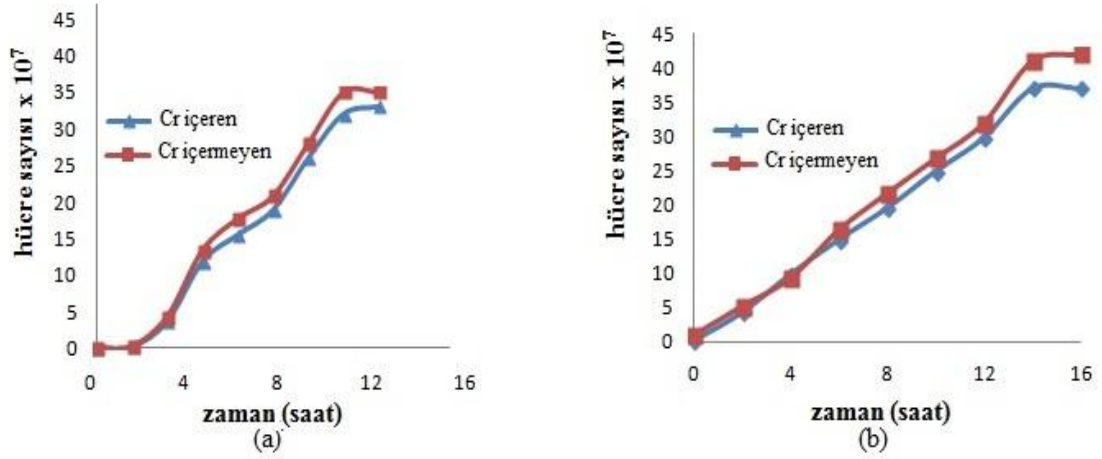


Şekil 3.16. *P. koreensis*'in pH 7'deki bakır içeren (a) ve içermeyen (b) ortamlardaki standart eğrileri

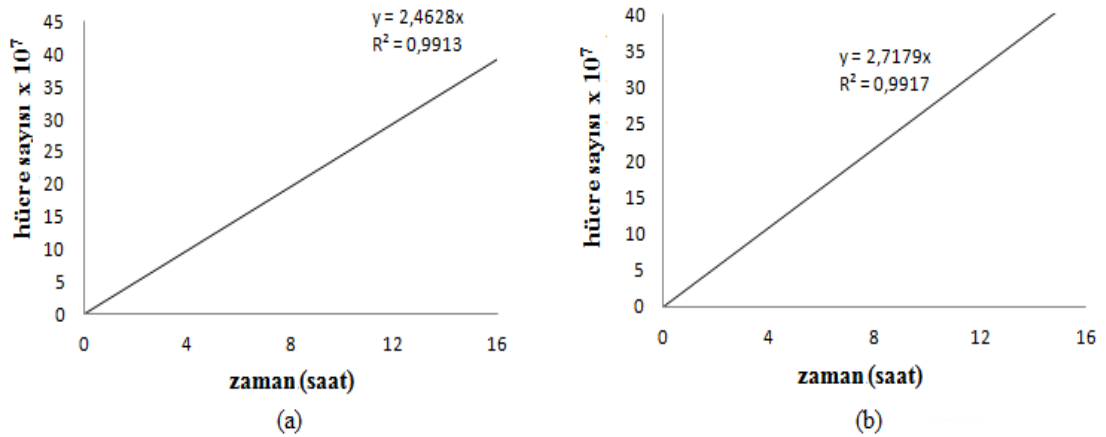
3.2.3. *E. faecalis*'in Değişik pH'lardaki Üreme Eğrileri

E. faecalis'in optimum üreme koşulların belirlenmesi amacıyla üreme eğrileri oluşturulmuş ve *E. faecalis* kodlu suş için optimum pH'nın 7 olduğu belirlenmiştir. *E. faecalis* pH 7'de 16 saatlik bir inkübasyon sonrasında krom içeren ortamda 37×10^7 , krom içermeyen ortamda ise 42×10^7 hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir.

pH 7'de krom varlığında, hücre sayısında % 12 oranında bir düşüş tespit edilmiştir (Şekil 3.17). pH 7'de ki hücre sayısına bağlı standart eğrileri Şekil 3.18'de verilmiştir.



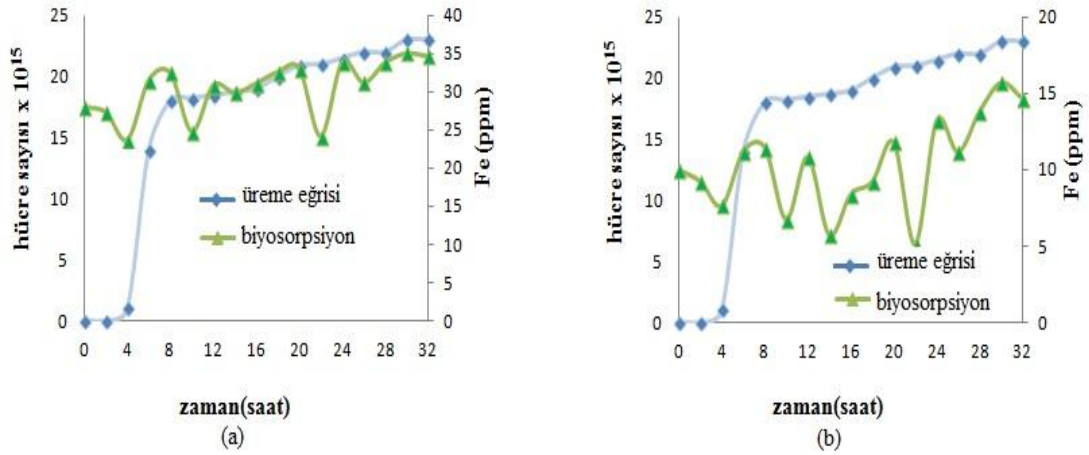
Şekil 3.17. *E. faecalis*'in pH 7 (a) ve pH 9'daki (b) üreme eğrileri



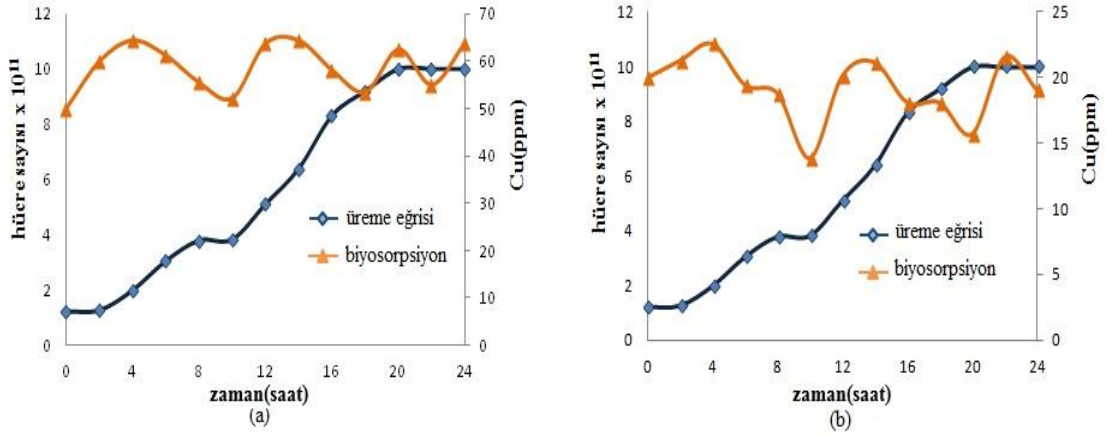
Şekil 3.18. *E. faecalis*'in pH 7'deki krom içeren (a) ve içermeyen (b) ortamlardaki standart eğrileri

3.4. Bakterilerin Biyosorpsiyon Kapasitelerinin Belirlenmesi

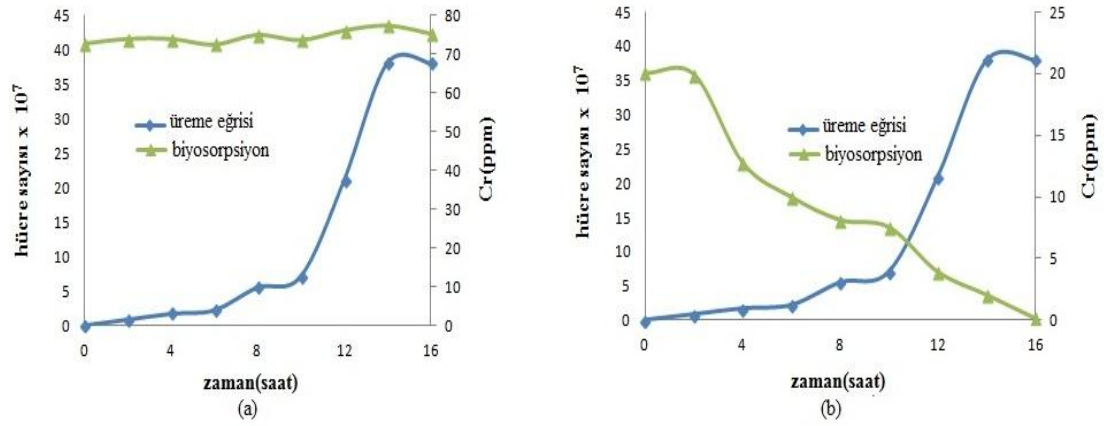
Suşların tanımlamaları yapıldıktan sonra biyosorpsiyon değerleri atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile incelenmiştir. *A. calcoaceticus*, 28 mg/L demir varlığında 32 saatlik inkübasyon sonrası ortamdaki demir konsantrasyonunda herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. *P. koreensis* 50 mg/L bakır varlığında ise 24 saatlik inkübasyon sonrası ortamdaki bakır konsantrasyonunda herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir. *E. faecalis* 72.8 mg/L krom varlığında 16 saatlik inkübasyon sonucu ortamdaki krom konsantrasyonu değiştirmedeği belirlenmiştir. Bu suşların daha düşük konsantrasyonlarda biyosorpsiyon kapasitesinin olup olmadığını belirlemek amacıyla aynı şartlarda 10 mg/L demir, 20 mg/L bakır ve krom varlığında biyosorpsiyon yetenekleri incelenmiştir. Demir dirençli *A. calcoaceticus* ve bakır dirençli *P. koreensis* herhangi bir biyosorpsiyon kapasitesi göstermezken, krom dirençli *E. faecalis* 20 mg/L krom varlığında %100 biyosorpsiyon kapasitesi gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 3.19. *A. calcoaceticus*'un 28 mg/L (a) ve 10 mg/L (b) demir varlığındaki biyosorpsiyonu



Şekil 3.20. *P. koreensis*'in 50 mg/L (a) ve 20 mg/L (b) bakır varlığındaki biyosorpsiyonu

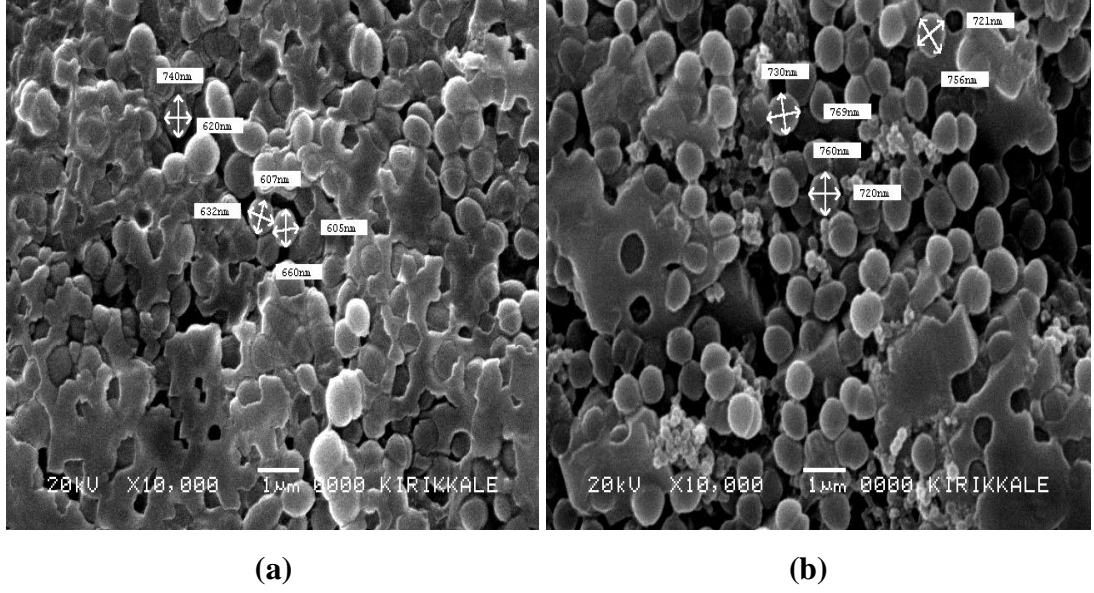


Şekil 3.21. *E. faecalis*'in 72.8 mg/L (a) ve 20 mg/L (b) krom varlığındaki biyosorpsiyonu

3.5. SEM Görüntüleri

Ağır metallerin bakteri morfoloji üzerine etkisini gözlemlemek amacıyla dirençli suşlar taramalı elektron mikroskopunda incelenmiştir. *E. faecalis*'in metal içermeyen ortamda boyutlarının ortalama 619x669 nm iken metal içeren ortamda 736x748

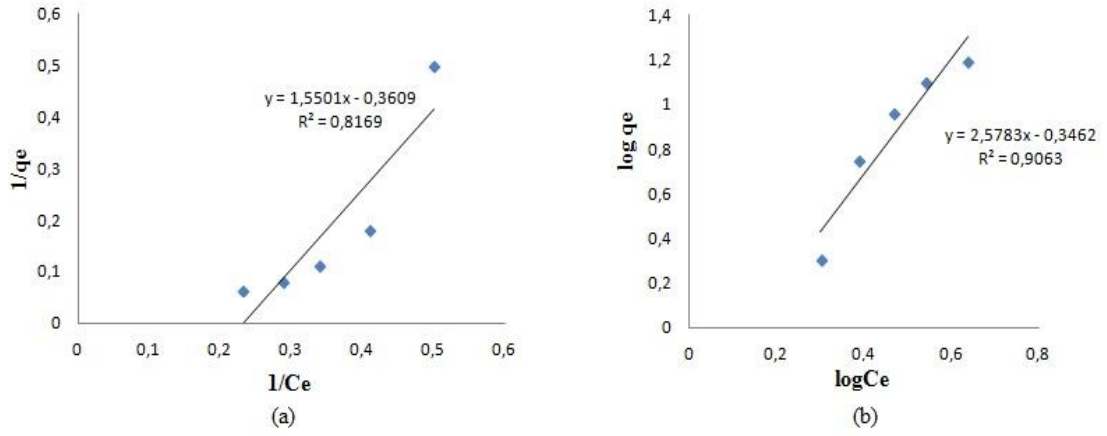
nm'ye yükseldiği gözlemlenmiştir. Boyutlardaki bu değişiklik biyosorpsiyonun gerçekleştiği şekilde değerlendirilmiştir (Şekil 3.22.).



Şekil 3.22. Krom içermeyen (a) ve krom içeren (b) ortamdaki *E. faecalis*'e ait SEM görüntüleri

3.6. *E. faecalis*'e ait İzoterm Eğrilerinin Değerlendirilmesi

Biyosorpsiyon yeteneği belirlenen *E. faecalis* suşu izoterm eğrileri çıkartılmak için atomik absorpsiyon spektrofotometresinde incelenmiştir.



Şekil 3.23. *E. faecalis*'in Langmuir (a) ve Freundlich (b) İzotermi

Elde edilen izoterm sabitleri Çizelge 3.7.'de topluca verilmiştir. *E. faecalis* 'in krom üzerinde Langmuir ve Freundlich izotermine uygunluk durumu korelasyon katsayısı (R^2) ile bulunmuştur.

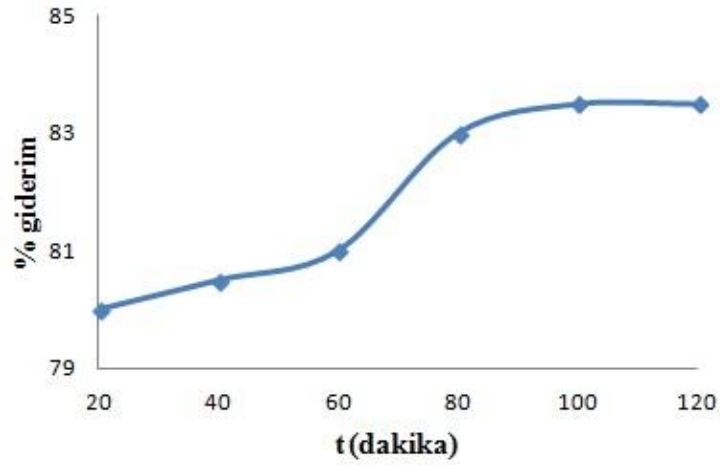
Çizelge 3.7. İzoterm sabitleri

<i>E. faecalis</i>	Langmuir izotermi			Freundlich izotermi		
	qmax	b	R^2	N	Kf	R^2
	0,645	4,306	0,8169	0,389	0,45	0,9063

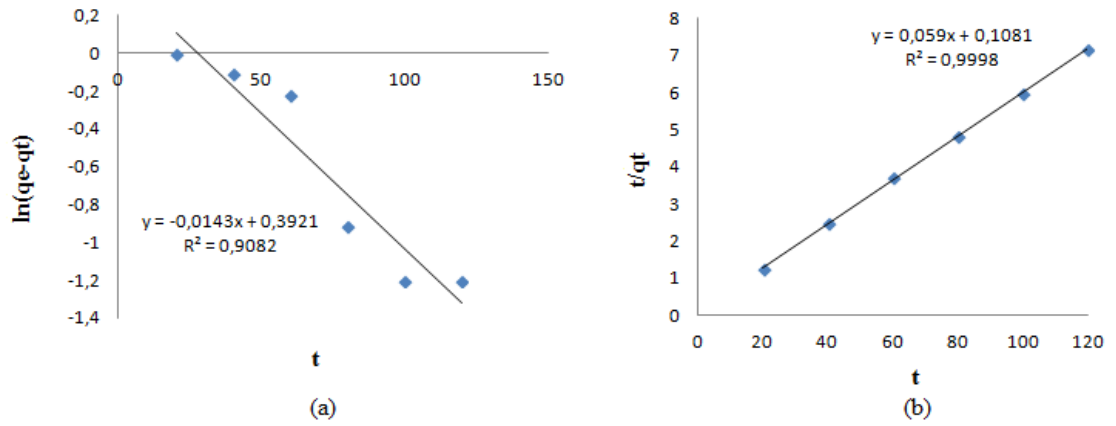
Elde edilen izoterm sabitleri dikkate alındığında Freundlich İzotermi daha büyük R^2 değerine sahip olduğu için Freundlich izotermine uygun olduğu tespit edilmiştir.

3.7 *E. faecalis*' e ait Kinetik Eğrilerinin Belirlenmesi

Biyosorpsiyon yetenekleri belirlenen *E. faecalis*'in kinetik eğrilerinin çıkarılması için atomik absorpsiyon spektrofotometresinde incelenmiştir.



Şekil 3.24. *E. faecalis*'in krom biyosorpsiyonu için kesikli kinetik çalışmasında biyosorpsiyon kapasitesinin zamana bağlı değişimi



Şekil 3.25. *E. faecalis*'in yalancı birinci ve (a) yalancı ikinci dereceden (b) kinetik grafikleri

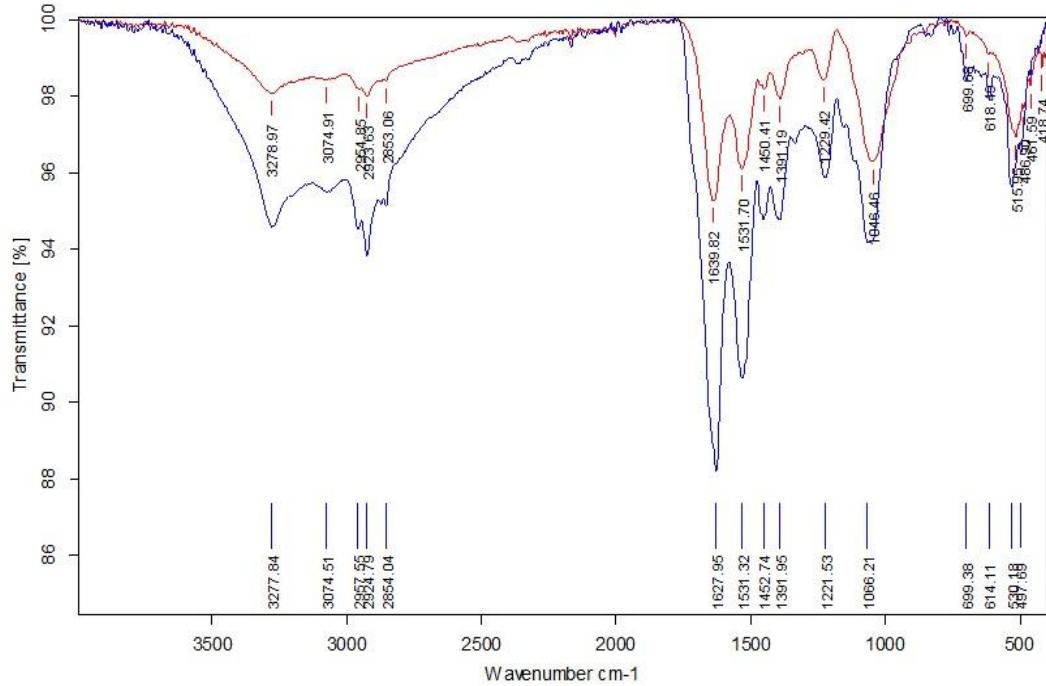
Çizelge 3.8. *E. faecalis* için yalancı birinci ve yalancı ikinci derece kinetik sabitleri

<i>E. faecalis</i>	Yalancı Birinci Derece				Yalancı İkinci Derece			
	q_{den}	q_e	k_1	R^2	q_{den}	q_e	k_2	R^2
	17	12	0.0143	0.9082	17	16.94	0.032	0.9998

Çizilen grafikler ve hesaplamalar sonucunda yalancı ikinci dereceden kinetik modeli daha büyük R^2 değerine sahip olduğundan *E. faecalis*'in yalancı ikinci dereceden kinetik modeline uyumlu olduğu görülmüştür.

3.8. FTIR Analizi

E. faecalis'in krom biyosorpsiyon yeteneği belirlendikten sonra hücre yüzeyindeki krom bağlayan fonksiyonel grupları belirlemek amacıyla meydana gelen farklılıkları belirlemek için FTIR analizi yapılmıştır. Şekil 3.26.'e bakıldığında bakterinin hücre yüzeyinde bulunan fonksiyonel gruplar ve biyosorpsiyondan sorumlu sonraki fonksiyonel gruplar FTIR spektrumundaki değişimlere göre değerlendirilmiştir (Şekil 3.26).



Şekil 3.26. *E. faecalis* suşunun krom metali içeren (kırmızı) ve içermeyen (mavi) ortamda FTIR analizi sonuçları

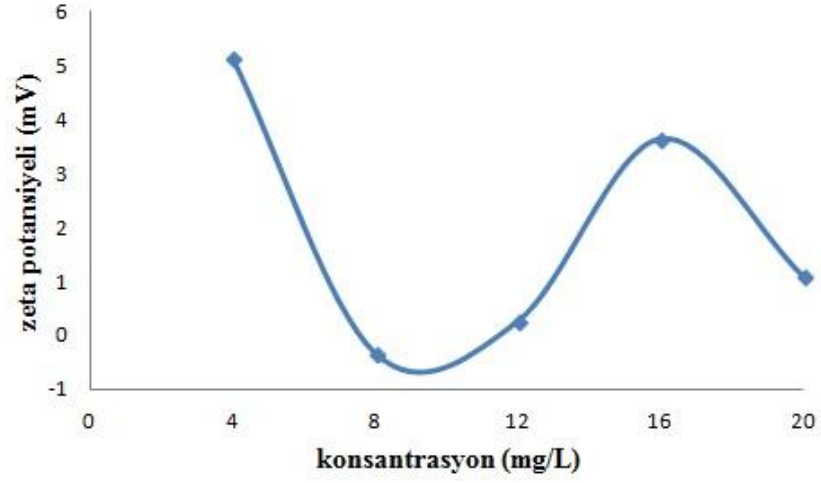
Çizelge 3.9. *E. faecalis*'e ait FTIR sonuçları

Frekans(cm^{-1})	Frekans(cm^{-1})	Fonksiyonel Grup
Cr yüksüz bakteri	Cr yüklü bakteri	
3227.84	3278.97	O-H (alkol, fenol) Stretching
2924.79	2954.86	C-H (alkil) Stretching
2854.04	2923.63	C-H (alkil) Stretching
2166.11	2013.17	C=C (alkinil) Streching
1627.95	1639.82	N-H (amin) Stretching
1452.74	1450.42	=-CH ₃ (metil) Bending
1335.50	1229.42	C-N Stretching
1221.53	1046.47	C-O-C Stretching
1154.04	884.62	R ₂ C=CH ₂ Bending

FTIR analizlerinden anlaşılacağı gibi; metal biyosorpsiyonunun mekanizmasının, biyosorbentin yapısındaki bulunan fonksiyonel gruplar ve metal iyonları arasındaki kompleks oluşumu ve iyonik etkileşim gibi mekanizmalara bağlı olduğu görülmüştür. Sırası ile krom içermeyen ve krom içeren bakterilerin frekanslarına bakıldığında, 2854.04 cm^{-1} 'den 2923.63 cm^{-1} 'e C-H (alkil) gruplarının, 2216.11 cm^{-1} 'den 2013.17 cm^{-1} 'e C=C (alkinil) gruplarının, 1335.50 cm^{-1} 'den 1229.42 cm^{-1} 'e C-N gruplarının, 1221.53 cm^{-1} 'den 1046.47 cm^{-1} 'e C-O-C gruplarının ve 1154.04 cm^{-1} 'den 884.62 cm^{-1} 'e R₂C=CH₂ gruplarının krom metalinin etkisiyle değiştiğini ve bu grupların metalin tutunmasında etkili olduğu belirlenmiştir.

3.9. Zeta Potansiyelinin Değerlendirilmesi

E. faecalis'in farklı konsantrasyonlarda metal içeren ortamlarda hücre yüzeyinde meydana gelen değişimler zeta potansiyeli ölçülerek incelenmiştir (Şekil 3.27).



Şekil 3.27. *E. faecalis*'in krom konsantrasyonuna bağlı zeta potansiyeli

Düşük krom konsantrasyonunda zeta potansiyelinde düşüş görülse de konsantrasyonun artmasıyla zeta potansiyelinde ilk olarak artış daha sonra azalış görülmektedir. Hücre yüzeyi yükünün -25 mV ile +25 mV arasında ölçülmesi metalin hücre yüzeyine bağlandığının bir göstergesidir. *E. faecalis*'in 7.5 ile 12 mg/L krom konsantrasyonunda kromun daha stabil bağlandığı görülmektedir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tezin amacı daha önce laboratuvarımızda yapılan çalışmalar sonucunda [109,110] izole edilen demir, bakır ve krom dirençli bakterilerin moleküler teknikler kullanılarak tanımlanması ve biyosorpsiyon kapasitelerinin belirlenmesidir. Kahyaoğlu'nun [109] yaptığı çalışmada Fe10 kodlu suş biyokimyasal yöntemler kullanılarak tanımlanmış; gram negatif, kok olduğu belirlenmiştir. Turalı'nın [110] yaptığı çalışmada ise Cu12 ve Cr07 kodlu suşlar biyokimyasal yöntemler kullanılarak sırasıyla gram negatif basil; gram pozitif kok oldukları belirlenmiştir. MTK değerleri ise Fe10 için 500 mg/L, Cu12 için 450 mg/L ve Cr07 için ise 1100 mg/L olarak belirlenmiştir.

Biyokimyasal testler tür düzeyinde bir tanımlamada varyasyonlar gösterdiği için bu çalışmada moleküler teknikler (FAME ve 16S rRNA sekans analizleri kullanılarak bakterilerin tanımlaması yapılmıştır. Bu tez kapsamında yapılan FAME analizleri sonucunda Fe10 kodlu suşun C_{18:1} w9c, C_{16:0}, C_{12:0} yağ asitlerini sırasıyla % 32.26, % 15.87, % 5.52 oranlarında içerdiği belirlenmiştir. Bu profil kapsamında Fe10 kodlu suş 0.334 SI değeri ile *Acinetobacter calcoaceticus* olarak tanımlanmıştır. Cu12 kodlu suşun C_{16:0}, C_{18:1} w7c ve C_{12:0} 2OH yağ asitlerini sırasıyla % 19.85, % 17.2 ve % 5.63 oranlarında içerdiği belirlenmiştir. Bu profil kapsamında Cu12 kodlu suş 0.331 SI değeri ile *Pseudomonas koreensis* olarak tanımlanmıştır. Cr07 kodlu suşun C_{18:1} w7c, C_{16:0} ve 19:0 cyclo w8c yağ asitlerini sırasıyla % 49.62, % 17.52 ve % 6.19 oranlarında içerdiği belirlenmiştir. Bu profil kapsamında Cr07 kodlu suş 0.373 SI değeri ile *Enterococcus faecium* olarak tanımlanmıştır. Adıgüzel [114] ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, Erzurum Pasinler kaplıcasından izole edilip seçilen 9 suşun FAME analizleri yapılarak, 4 suşun *Bacillus* spp., kalan 5 suşun ise *Geobacillus* olduğu tespit etmişlerdir. Daha sonrasında yapılan 16S rRNA sekans analizi ile bu sonuçlar desteklenmiştir.

Bakterilerin içerdikleri yağ asidi kompozisyonu buldukları ortama ve sıcaklığa göre değişebilmektedir. Bu nedenle tanımlamalar 16S rRNA sekans analizi

kullanılarak da bakteriler tanımlanmıştır. 16S rRNA bölgesinin tüm bakterilerde bulunması, evrim süresince korunmuş olması, uygun büyüklükte olması ve zengin veri tabanının olması tür düzeyinde tanımlama için sekanslamada en uygun bölge olmasını sağlamaktadır [114].

16S rRNA sekans analizi için izolatların genomik DNA'ları izole edilmiştir. İzole edilen genomik DNA'lar universal primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılmıştır. PZR ürünlerinde spesifik olmayan bağlanmaların en aza indirgenmesi amacıyla annealing sıcaklığı ve tuz konsantrasyonu optimizasyonu yapılmıştır. Optimizasyon çalışmaları sonucunda Fe10 kodlu suş için annealing sıcaklığı 54°C, tuz konsantrasyonu 2mM, Cu12 kodlu suş için annealing sıcaklığı 58°C, tuz konsantrasyonu 2mM ve Cr07 kodlu suş için annealing sıcaklığı 55°C, tuz konsantrasyonu 2 mM olarak belirlenmiştir. Optimum koşullarda PZR uygulanarak elde edilen PZR ürünlerinin sekans analizi gerçekleştirilmiştir. Yapılan 16S rRNA sekans analizleri sonucu Fe10 kodlu suş % 99 homoloji ile *Acinetobacter calcoaceticus*, Cu12 kodlu suş % 99 homoloji ile *Pseudomonas koreensis*, Cr07 kodlu suş % 99 homoloji ile *Enterococcus faecalis* olarak tanımlanmıştır.

Suşların evrimsel akrabalıklarını daha iyi değerlendirmek amacıyla MEGA 5.2 programı kullanılarak uzaklık matrisine bağlı olarak komşu bağlantı ağacı (neighbour joining trees) oluşturulmuş ve evrimsel açıdan korunmuş nükleotid baz dizilerinin türler arası uzaklık-yakınlık analizlerinin yapılabilmesi için uzaklık matrisleri hesaplanmıştır. 16S rRNA verileri ile elde edilen soyağacına ve uzaklık matrislerine göre genetik olarak Fe10 kodlu suş *Acinetobacter calcoaceticus*, Cu12 kodlu suş *Pseudomonas koreensis*, Cr07 kodlu suş *Enterococcus faecalis* ile en yakın tür olarak tespit edilmiştir. Yaptığımız moleküler tanımlamalar sonucunda FAME analizi düşük SI değerleri verirken 16S rRNA analizlerinden alınan sonuçlar yüksek homoloji gösterdiği belirlenmiştir. FAME ve 16S rRNA analiz sonuçları kıyaslandığında Fe10 kodlu suşun sekans analizi ile bire bir uyum gösterdiği, Cu12 ve Cr07 kodlu suşlar için FAME ve 16S rRNA ise sadece cins düzeyinde uyumlu olduğu belirlenmiştir. Şahin [115] yaptığı çalışmaya göre Kızılırmak'tan izole edilen Zn ve Mn dirençli suşlar için FAME ve 16S rRNA analizlerinin genus düzeyinde

uyumlu olduğu belirlenmiştir. Fakat Li ve diğer Mn kodlu suşlar için ise cins düzeyinde dahi uyumlu bulunmamıştır.

Moleküler yöntemlerle tanımlanan bu suşlar için bu tez çalışmasında daha sonra farklı pH değerlerinde optimum üreme şartları belirlenmiştir. *A. calcoaceticus* için pH 6'da yapılan 32 saatlik inkübasyon sonunda demir içeren ortamda 25.5×10^{15} demir içermeyen ortamda ise 31.3×10^{15} hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. *A. calcoaceticus* kodlu suşun koloni oluşturan birim sayısının demir varlığında demir yokluğunda % 22.6 oranda düşük olduğu belirlenmiştir.

A. calcoaceticus pH 7'de yapılan 32 saatlik inkübasyon sonunda demir içeren ortamda 44×10^{15} ve demir içermeyen ortamda ise 47×10^{15} hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. *A. calcoaceticus*'un koloni oluşturan birim sayısının demir varlığında demir yokluğunda % 7 oranda düşük olduğu belirlenmiştir.

A. calcoaceticus için pH 9'da yapılan 32 saatlik inkübasyon sonunda demir içeren ortamda 15.6×10^{15} ve demir içermeyen ortamda ise 33.4×10^{15} hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. *A. calcoaceticus*'un koloni oluşturan birim sayısının demir varlığında demir yokluğunda % 50 oranda düşük olduğu belirlenmiştir.

P. koreensis için pH 7'de yapılan 24 saatlik inkübasyon sonunda bakır içeren ortamda 12×10^{11} ve bakır içermeyen ortamda ise 16×10^{11} hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. *P. koreensis*'in koloni oluşturan birim sayısının bakır varlığında bakır yokluğunda % 15 oranda düşük olduğu belirlenmiştir.

P. koreensis için pH 9'de yapılan 24 saatlik inkübasyon sonunda bakır içeren ortamda 5.8×10^{11} ve bakır içermeyen ortamda ise 8.4×10^{11} hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. *P. koreensis*'in koloni oluşturan birim sayısının bakır varlığında bakır yokluğunda % 45 oranda düşük olduğu belirlenmiştir.

E. faecalis için pH 7'de yapılan 16 saatlik inkübasyon sonunda krom içeren ortamda 37×10^7 ve krom içermeyen ortamda ise 42×10^7 hücre sayısına ulaştığı

gözlemlenmiştir. *E. faecalis*'in koloni oluşturan birim sayısının krom varlığında krom yokluğunda % 12 oranda düşük olduğu belirlenmiştir.

E. faecalis için pH 9'de yapılan 24 saatlik inkübasyon sonunda krom içeren ortamda 37.7×10^7 ve krom içermeyen ortamda ise 44×10^7 hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. *E. faecalis*'in koloni oluşturan birim sayısının krom varlığında krom yokluğunda % 17 oranda düşük olduğu belirlenmiştir.

Hussein ve arkadaşlarının [111] yaptıkları çalışmada Mısır İskenderiye kanalizasyon atık sularından izole edilen Cr, Cu, Ni ve Cd dirençli *Pseudomonas* türleri izole etmiş; biyokimyasal testler sonucunda Cr dirençli *Pseudomonas fluorescens*, Cu, Ni ve Cd dirençli *Pseudomonas putida* olduğunu belirlemişlerdir. MTK değerlerini sırası ile 4, 7, 11 ve 10 mM olarak belirlemişlerdir. Yapılan üreme eğrileri sonucunda ise optimum pH'nin Cr ve Ni dirençli bakteriler için 5.5; Cu ve Cd dirençli bakteriler için 6 olduğunu tespit etmişlerdir. Andrezza ve arkadaşlarının [112] yaptığı çalışmaya göre; bağ toprakları zenginleştirme kültürlerinden alınan örneklerde yüksek oranda Cu dirençli bakteri izole edilmiş; izole edilen bakterilerin 16S rRNA sekans analizleri sonucu *P. putida*, *Pseudomonas plecoglossicida* ve diğer *Pseudomonas* türleri ile homoloji gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca optimum üreme için pH 5.0-8.0 arasından en uygun üreme koşulunun pH 6.0 olduğu belirlenmiştir.

Tanımlanan suşların biyosorpsiyon yetenekleri incelendiğinde *A. calcoaceticus* 28 mg/L demir içeren ortamda 32 saat; *P. koreensis* 50 mg/L bakır içeren ortamda 24 saat ve *E. faecalis* 72.8 mg/L krom içeren ortamda 16 saatlik bir inkübasyon sonucunda herhangi bir biyosorpsiyon kapasitelerinin olmadığı tespit edilmiştir.

Endüstriyel atık suların birçoğu çeşitli su standartlarına göre istenmeyen oranlarda ağır metal iyonları içermektedir [116]. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) ve Çevre Koruma Ajansı (EPA) 'ya göre yüzey sularında bulunması gereken demir, bakır ve krom miktarları sırası ile 0.2-2.0, 0.05-1.0 ve 0.05 mg/L olarak belirlenmiştir [23,117]. Belirlenen bu standartlar çalışmamızda belirlenen konsantrasyon miktarlarından çok daha düşüktür. Bu nedenle daha düşük konsantrasyonlardaki

biyosorpsiyon kapasitesine bakılmış ve *E. faecalis*'in 20 mg/L krom varlığında % 100 biyosorpsiyon kapasitesi gösterdiği belirlenmiştir. Kıvanç ve arkadaşları [115] krom içeren endüstriyel atık sudan izole edilen *Bacillus subtilis* ile Cr^{+6} iyonlarının adsorbsiyonu araştırmıştır. Bununla birlikte farklı pH ve başlangıç iyon konsantrasyonlarının (25-200 mg/L) *Bacillus subtilis*'e Cr^{+6} adsorbsiyonundaki etkileri test edilmiş ve atık sulardan Cr^{+6} iyonlarının giderilmesinde optimum koşulları da araştırmıştır. Konsantrasyon arttıkça adsorbsiyon verimi düşmüştür. Yüksek konsantrasyonlarda adsorbsiyon kapasitesi çok düşmüştür. Atık suda adsorbsiyon kapasitesinin düşük olmasının bir nedeni atık suyun çok kompleks bir çözelti olması ve içerisinde birçok organik ve inorganik maddelerin bulunması olabileceğini belirlemişlerdir.

Suriya ve arkadaşlarının [118] yaptığı çalışmada endüstriyel atıklardan izole edilen ağır metal dirençli suşlardan 16S rRNA sekans analizi ile tanımlanan *Enterobacter cloace*'nin Pb(II), Cd(II), Cr(II), Hg(II) ve Cu(II) 'a direçlilikleri MTK değerlerini hesaplamış ve maksimum biyosorpsiyon potansiyellerini sırası ile; % 65.68, % 56.56, % 54.28, % 45.57 ve % 74.46 olarak belirlemişlerdir. Chatterjee [119] ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Damoda Nehri'nden izole edilen *Geobacillus thermodenitrificans*'ın atıksulardaki metal bağlama yeteneklerini ölçmüşler ve biyosorpsiyon yüzdeleri ve metalleri sırası ile Fe^{+3} için % 43.94, Cr^{+3} için % 39.2, Cd^{+2} için % 35.88, Pb^{+2} için %18.22, Cu^{+2} için %13.03, Co^{+2} için % 11.43, Zn^{+2} için % 9.02 ve Ag^{+} için % 7.65 olduğunu belirlemişlerdir. Oves [118] ve arkadaşları endüstriyel atık su ile sulanan Hindistan topraklarındaki karnıbaharın rizosferinden 22 adet suşu izole ederek katı ve sıvı besi ortamında Cu, Cd, Pb ve Ni metallerine dirençli olduğunu bulmuşlardır. İzole edilen bakterilerden OSM29 kodlu suş bu 5 metale toleransı en yüksek olan suş olduğunu görmüş, 16S rRNA sekans analizi ile *Bacillus thurungiensis* olarak tanımlamıştır. Bu bakterinin biyosorpsiyon yeteneğine bakarken bu yeteneğe pH'ın etkisine de bakmışlardır. Buna göre, Ni ve Cr için uygun pH 7 iken Cd, Cu ve Pb için ise 6 olduğu belirlenmiştir. bu suş için biyosorpsiyon kapasiteleri ise sırası ile Ni'in % 94, Cu'nun % 91.8 ve Cd'un da % 87 olduğunu görmüşler ve FTIR analizi yapmışlardır. Hussein [121] ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada ise izole edilen *Pseudomonas* türlerinde yapılan biyosorpsiyon

çalışmaları sonucunda izole edilen *Pseudomonas* türlerinin biyosorpsiyon yeteneklerine bakmışlar, sırası ile Ni, Cd, Cu ve Cr metallerine karşı biyosorpsiyon yeteneklerinin olduğunu gözlemlemişlerdir.

Ağır metallerin bakteri morfolojisi üzerine etkisini gözlemek amacıyla krom metale dirençli suşlar taramalı elektron mikroskopunda incelenmiştir. *E. faecalis*'in metal içermeyen ortamda boyutlarının ortalama 619x669 nm iken metal içeren ortamda 736x748 nm'ye yükseldiği gözlemlenmiştir. Boyutlardaki bu değişiklik biyosorpsiyonun gerçekleştiği şekilde değerlendirilmiştir. Şahin [115] % 35 biyosorpsiyon kapasitesi gösteren *Serratia nematodiphila*'nın mangan içermeyen ve içeren ortamdaki SEM görüntülerine bakmış ve boyutlarının sırası ile 509x1007nm den 551x1210 nm 'ye yükseldiğini gözlemlemiş ve mangan biyosorpsiyonunun hücre morfolojisi üzerine etkisini göstermiştir.

Dengede birim adsorplayıcı kütleinde adsorplanan metal miktarı ile ortamda kalan metal iyonu derişimleri hesaplanarak Freundlich ve Langmuir adsorpsiyon modeline uygunluğu tespit edilmiştir. İzoterm çalışmasında *E. faecalis* suşunun Langmuir ve Freundlich izotermine uygunluk durumu korelasyon katsayısı (R^2) ile bulunmuştur. Elde edilen izoterm sabitleri dikkate alındığında Freundlich İzotermi daha büyük R^2 değerine sahip olduğu için Freundlich izotermine uygun olduğu tespit edilmiştir. Freundlich izotermine göre deneysel olarak belirlenen adsorpsiyon kapasitesi 0.45, adsorpsiyon yoğunluğu ise 0.389 olarak hesaplanmıştır. Cirik ve arkadaşları [122] *Spirulina Platensis* ile yaptıkları izoterm çalışmasını Langmuir ve Freundlich izotermine uygulamışlardır. Derişim çalışmaları değerlendirildiğinde, Cu (II) iyonu için maksimum adsorplama kapasitesi 11.25 mg/g ve Co (II) iyonu için 18.25 mg/g olarak bulunmuştur. Elde ettikleri sonuçlara göre Co^{+2} iyonu adsorpsiyonu, Freundlich izotermine uygun olduğunu göstermişlerdir. Başka bir çalışmada ise Pan ve arkadaşları [123] *Bacillus cereus* üzerinde yaptıkları izoterm çalışmaları sonucunda Cu^{+2} ve Pb^{+2} biyosorpsiyonlarına en uygun izoterm Langmuir izotermi olduğunu göstermişlerdir. Şahin ve arkadaşları [124] *B. thuringiensis* 'in krom biyosorpsiyonunun hem Langmuir hem de Freundlich izotermine uyum sağladığını belirlemişlerdir.

Adsorpsiyon kinetiğini ve dengedeki adsorbent miktarını etkileyen parametrelerin başlıcaları yüzey alanı, adsorbentın cinsi, metal iyonlarının yükü ve özellikleri, pH, sıcaklık, adsorbent ve metal iyon derişimleri ve diğer iyonların cins ve derişimleridir. Adsorplanan madde ve çözücünün özellikleri adsorpsiyonu etkileyen önemli parametrelerden birisidir. Freundlich adsorpsiyon izoterminden elde edilen Kf ve 1/n in büyüklüğü atık sudaki metal iyonlarının ne kadar kolaylıkla uzaklaştırılabileceğinin göstergesidir [125].

E. faecalis'in krom biyosorpsiyonun hız belirleme basamağı yani etkin adsorbat adsorban temas süresi yani alıkoyma süresi bulunmuş ve elde edilen kinetik sabitleri dikkate alındığında yalancı ikinci dereceden kinetik modeli daha büyük R² değerine sahip olduğundan yalancı ikinci dereceden kinetik modeline uygun olduğu belirlenmiştir. Yalancı ikinci dereceden hız denkleminin hızın adsorbat konsantrasyonundan bağımsız katı fazdaki adsorpsiyon kapasitesine ve zamana bağı olduğunu göstermiştir. Özercan ve arkadaşları [131] ölü formdaki *Saccharomyces cerevisiae* ve *Candida tropicalis* 'in Cr⁺⁶ adsorpsiyon kinetiği hesaplanmış ve yalancı ikinci dereceden hız eşitliğine uygun olduğunu belirlemişlerdir.

Yapılan FTIR analizleri sonucunda ise krom içermeyen ve krom içeren bakterilerin verdiği frekanslar değerlendirilmiştir. Sırası ile krom içermeyen ve krom içeren bakterilerin frekanslarına bakıldığında, 2854.04 cm⁻¹'den 2923.63 cm⁻¹'e C-H (alkil) gruplarının, 2216.11 cm⁻¹' den 2013.17 cm⁻¹ 'e C=C (alkinil) gruplarının, 1335.50cm⁻¹'den 1229.42cm⁻¹ 'e C-N gruplarının, 1221.53cm⁻¹'den 1046.47cm⁻¹ 'e C-O-C gruplarının ve 1154.04cm⁻¹'den 884.62cm⁻¹'e R₂C=CH₂ gruplarının krom metalinin etkisiyle değiştiğini ve bu grupların metalin tutunmasında etkili olduğu belirlenmiştir. Metal iyonlarının biyosorpsiyonu çözeltinin fizikokimyasal koşulları ile mikrobiyal kütlede büyük ölçüde mevcut olan aktif bölgelerindeki fonksiyonel grupları üzerindeki değişimler biribiri ile ilişkilidir. Oves ve arkadaşları [121] bundan yola çıkarak Cu biyosorpsiyon kapasitesini % 91.8 olarak buldukları *B. thuringensis* ile biyosorpsiyon sonucundaki fonksiyonel grup değişimlerini göstermek amacı ile FTIR analizi yapmışlar ve amino, karboksil, hidrosil ve karbonil gruplarının ağır metaller tutunmasına etkisinin olduğunu belirlemişlerdir.

Cirik ve arkadaşları [121] *Spirulina platensis* ile yaptıkları izoterm çalışmasının devamında FTIR analizi yapmışlar ve Cu^{+2} ve Co^{+2} iyonlarının -NH, -OH ve C-O bağları ile etkileştiğini öngörmüşlerdir.

Hemen bütün organizmaların yüzeyi negatif yüklü olduklarından, pozitif yüklü metal iyonlarını (Cu^{+2} , Ni^{+2} , $\text{Cr}^{+3}/\text{Cr}^{+6}$, Cd^{+2} , $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$, Pb^{+2}) adsorbe etme yeteneğine sahiptirler [127]. Bu sebepten dolayı biyosorpsiyonda algler ve küfller daha etkili olmakla birlikte bakteriler ve mayalar da kullanılmaktadır [127-129]. *E. faecalis*'in farklı konsantrasyonlarda metal içeren ortamlarda hücre yüzeyinde meydana gelen değişimler zeta potansiyometre ile incelenmiştir. Düşük metal konsantrasyonunda düşük ve negatife yakın bir değer ölçülse de konsantrasyonun artmasıyla zeta potansiyelinde ilk olarak artış daha sonra azalış görülmektedir. Hücre yüzeyi yükünün -25 mV ile +25 mV arasında ölçülmesi metalin hücre yüzeyine bağlandığının bir göstergesidir. *E. faecalis*'in 7.5 ile 12 mg/L krom konsantrasyonunda kromun daha stabil bağladığı görülmektedir. Sadowski [129], Pb^{+2} , Cu^{+2} ve Cd^{+2} 'ye direnç gösteren *Nocardia* sp.'nin zeta potansiyel değerlerinin artan adsorpsiyon ile doğru orantılı olduğunu görmüştür.

Bu tez çalışmasında demir, bakır ve krom dirençli suşların değişik pH'lardaki optimum üreme koşulları belirlenmiş, moleküler teknikler kullanılarak tanımlamaları yapılmış ve biyosorpsiyon yetenekleri değerlendirilmiştir. Mikrobiyal tanımlamada elde edilen veriler sonucunda FAME analizi sonuçlarının bakır ve krom dirençli suşlarda cins düzeyinde doğru olduğu ve Fe10 kodlu suşun FAME ve 16S rRNA sekans analizi sonuçlarının uyumlu olduğu görülmüştür. Bu nedenle 16S rRNA sekans analizleri yapılmıştır. Analizler sonucunda sonucu Fe10 kodlu suş *A. calcoaceticus*, Cu12 kodlu suş *P. koreensis* ve Cr07 kodlu suş ise *E. faecalis* olarak tanımlanmıştır. Biyosorpsiyon yeteneklerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalar sonucu her üç suşun da biyosorpsiyon kapasitelerinin olmadığı, fakat daha düşük konsantrasyonda *E. faecalis*'in % 100 oranında krom biyosorpsiyonu yaptığı görülmüştür. Tüm bu veriler ışığında *E. faecalis* düşük konsantrasyonda kromu tolere edebilmiştir. Krom biyosorpsiyonunun *E. faecalis*'in morfolojisi üzerine etkisini gözlemlemek amacıyla taramalı elektron mikroskopunda incelenmiştir.

Krom içermeyen ortamda boyutlarının ortalama 619x669 nm iken krom içeren ortamda 736x748 nm'ye yükseldiği gözlemlenmiş ve boyutlardaki bu değişiklik biyosorpsiyonun gerçekleştiği şekilde değerlendirilmiştir. Krom biyosorpsiyon yeteneği dikkate alındığında kesikli adsorpsiyon izotermi ve kinetik değerlendirmeleri yapılmış Freundlich İzotermine ve yalancı ikinci dereceden kinetik modeline uyum gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan FTIR analizi sonucunda ise krom metalinin biyosorpsiyonundan sonraki değişimler belirlenmiştir. Son olarak hücre yüzey yükünü belirlemek amacı ile Zeta potansiyeline bakılmış ve stabilitesi değerlendirilmiştir. Tüm bu veriler ışığında *E. faecalis* kromu tolere edebilmiş ve krom biyosorpsiyon yeteneği dikkate alınarak krom biyoremediasyon çalışmaları için bir potansiyel oluşturacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Sevgi, E., Ağır Metalle Kontamine Olmuş Topraklardan Metal İyonlarına Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve Bu Dirençliliğin Plazmidlerle Olan İlişkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Mersin Üniversitesi, Mersin, 2007.
- [2] Öner, Ö., Çelik, A., Gediz Nehri Aşağı Gediz Havzası'ndan Alınan Su ve Sediment Örneklerinde Bazı Kirlilik Parametrelerinin İncelenmesi. Ekoloji 20 (78): 48-52, 2011.
- [3] Atıcı, T., Ahıska, S., Pollution and Algae of Ankara Stream. Gazi Üniversitesi Journal of Science, 18 (1): 51-59, 2010.
- [4] Sönmez, A. Y., Hisar, O., Yanık, T. Karasu Irmağı'nda Ağır Metal Kirliliğinin Tespiti ve Su Kalitesine Göre Sınıflandırılması. Atatürk Üniv. Ziraat Fakültesi Dergisi, 43 (1): 69-77, 2012.
- [5] Kayıs, T., Emre, I., Ağır Metal Stresinin *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae)'nin Protein ve Glikojen Sentezine Etkileri. Ekoloji, 21 (83): 61-67, 2012.
- [6] Ünal Çakır, E., Tosunoğlu, V., Bayhan, Y. K. Ceviz Ağacı Talaşı (*Juglans Regia* L.)'nin Krom (VI) Adsorpsiyonu Üzerine Etkileri. Alınteri Ziraat Bilimler Dergisi, 24 (1), 2013.
- [7] Türkman A., Aslan Ş., Ege İ., Doğal Zeolitlerle Atıksulardan Kurşun Giderimi, 2001.
- [8] Berkes F., Kışlalıoğlu M. Ekoloji ve Çevre Bilimleri. Türkiye Çevre Sorunları Vakfı Yayınları, Ankara, 1993.

- [9] Çevre Bakanlığı, 2000'li yıllara Doğru Çevre. Ankara: Çevre Bakanlığı yayınları. Çevre Bakanlığı. Çevre notları. Ankara, 1998.
- [10] Atıcı, T., Ahıska, S., Pollution and Algae of Ankara Stream. Gazi Üniversitesi Journal of Science, 18 (1): 51-59, 2010.
- [11] Rathnayake, I.V.N., Megharj, M., Bolan, N., and Naidu, R., Tolerance of Heavy Metals by Gram Positive Soil Bacteria. World Academy of Science, Engineering and Technology, 53, 2009.
- [12] Gadd G.M., Metals, Minerals and Microbes: Geomicrobiology and Bioremediation. Microbiology, (156): 609-643, 2010.
- [13] Anonim, Türkiye'nin Çevre Sorunları, Türkiye Çevre Sorunları Vakfı Yayını, 1991.
- [14] Masters, G. B., Introduction to Environmental Engineering and Science. Prentice Hall, NewJersey, 1997.
- [15] Lall, S. P., The Minerals. In: J. E. Halver., (ed), Fish Nutrition. Academic Press Inc. Sandiago, USA, 1989.
- [16] Ginneken, L.V., Chowdhury, M. J., Blust, R., Bioavailability of Cadmium and Zinc to the Common Carp, *Cyprinus carpio*, in Complexing Environments: A Test for Validity of the Free Ion Activity Model. Environmental Toxicology and Chemistry, (18): 2295-2304, 1999.
- [17] Heath, A.G., Water pollution and fish physiology. CRC Press, Florida, 1995.
- [18] Gündüz T., Çevre Sorunları. 1. baskı, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Ankara, 131-148, 1994.

- [19] Hughes M. N., Poole R. K., Metals and Microorganism. Chapman and Hall, 400 London, 1989.
- [20] Ji G., Silver S., Bacterial Resistance Mechanism for Heavy Metals of Environmental Concern, Journal of Industrial Microbiology, (14): 61-168, 1995.
- [21] Yalçın, T., ŞOK, A. G. A. Demir Cevherlerinin Zenginleştirilmesi.
- [22] Teşkilatı, D.P., Ö.İ. Komisyonu, D.P. Teşkilatı, Altıncı Beş Yıllık Kalkınma Planı Metal Madenler Özel İhtisas Komisyonu Bakır ve Pirit Madenciliği Raporu. DPT, 1992.
- [23] WHO (World Health Organization), Health Criteria Other Supporting Information. In: Guidelines for Drinking Water Quality, 2 (2): 31-388, Geneva, 1996.
- [24] Eisenstein RS, Blemings KP., Iron Regulatory Proteins, Iron Responsive Elements and Iron Homeostasis. Journal of Nutrition, (128): 2295-2298, 1998.
- [25] Yüzbaşı, N., Sezgin, E., Süt Ürünlerindeki Bazı Metalik Kontaminantların Toksikolojik Etkileri. Gıda, 27 (2): 121-127, 2002.
- [26] <http://www.inchem.org> (Erişim tarihi: 12.02.2014)
- [27] Madencilik Özel İhtisas Komisyonu Raporu, Metal Madenler Alt Komisyon Bakır-Pirit Çalışma Grubu Raporu, Ankara, 2001.
- [28] Metals Handbook, Properties and Selection, Non Ferrous Alloys and Pure Metals, 9th Edition, ASM International, Ohio, 239-248, 1978.

- [29] Merian E., *Metalle in der Umwelt*, Verlag Chemie, Weinheim, Basel, ISBN (3): 527-25817, 1985.
- [30] “Copper and Copper Alloys” <http://www.cda.org.uk/megab2/general/pub121/section7.htm#Product%20Forms> (Erişim tarihi: 11.02.2014)
- [31] *Trace Elements in Human Nutrition And Health*, World Health Organization Geneva, 1996.
- [32] Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S., *Metallerin Çevresel Etkileri-I. Metalurji Dergisi*, (136) :47-53, 2003.
- [33] Erol, Y., İnce, A. R., *Stratejik Yönetim Açısından Türkiye Krom Madenciliğinin Rekabetçilik Analizi: Sektörel Üstünlükler, Sorunlar ve Çözüm Önerileri. Zeitschrift für die Welt der Türken/Journal of World of Turks*, 4 (3): 53-72, 2012.
- [34] Mertz M., *Trace elements in human and animal nutrition*, Academic Press, 2012.
- [35] Rouch, D. A., Lee, B. T. D., Morby, A. P., *Understanding Cellular Responses to Toxic Agents: A Model for Mechanism Choice in Bacterial Metal Resistance. Journal of Industrial Microbiology*, (14): 132-141, 1995.
- [36] Ji, G., Silver, S., *Bacterial Resistance Mechanism of Heavy Metals. Journal of Industrial Microbiology*, (18): 69-161, 1994.
- [37] Mergeay, M., *Towards an Understanding of the Genetics of Bacterial Resistance, Trends Biotechnology*, (9): 17-24, 1991.
- [38] Scott, J. A., Palmer, S. J., *Cadmium Biosorption by Bacterial Exopolysaccharide. Biotechnology Letters*, (10): 21-24, 1988.

- [39] Scott, J. A., Palmer, S. J., Sites of Cadmium Uptake in Bacteria Used for Biosorption. *Applied and Environmental Microbiology*, (33): 221-225, 1990.
- [40] McEntee, J. D., Woodrow, J. R., Quirk, A. V., Investigation of Cadmium Resistance in *Alcaligenes* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, (51): 515-520, 1986.
- [41] Silver, S., Misra, T. K., Bacterial Transformation of and Resistances to Heavy Metals. *Basic Life Sciences*, (28): 23-46, 1984.
- [42] Nies, D. H., Silver, S., Ion Efflux Systems Involved in Bacterial Metal Resistances. *Journal of Industrial Microbiology*, (14): 186-199, 1990.
- [43] Wiener, P., Müller-Graf, C., Barcus, V., Bacterial Evolution in Modern Times:Trends and Implications for Research. *Reviews in Undergraduate Research*, (2): 1-6, 2003.
- [44] Archer GL, Niemeyer DM Origin and Evolution of DNA Associated with Resistance to Methicillin in *Staphylococci*. *Trends Microbiology*, (2): 343-347, 1994.
- [45] Choudhury, R., Srivastava, S., Zinc Resistance Mechanisms in Bacteria. www.ias.ac.in/currsci/oct102001/768.pdf, 2007.
- [46] Tunner, J.S., Robinson, N.J., Cyanobacterial Metallothioneins: Biochemistry and Molecular Genetics. *Journal of Industrial Microbiology*, (14): 119-125, 1995.
- [47] Trevors, J. T., Stratton, G. W., Gadd, G. M., Cadmium Transport, Resistance and Toxicity in Bacteria, Algae, and Fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, (32): 447-464, 1986.

- [48] Joho, M., Inouhe, M., Tohoyama, H., and Murayama, T., Nickel Resistance in Yeast and Other Fungi. *Journal of Industrial Microbiology*, (14):64-168, 1995.
- [49] Murphy, R. J., and Leavy, J. F., Production of Copper Oxalate by Some Copper Tolerant Fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, (81): 165-168, 1983.
- [50] Aiking, H., Kok, K., Heerikhuizen, H. V., Van't, R. J., Adaption to Cadmium by *Klebsiella aerogenes* Growing in Continous Culture Proceeds Mainly via Formation of Cadmium Sulfide. *Applied and Environmental Microbiology*, (44): 938-944, 1982.
- [51] Summers, A.O., Organization, Expression, and Evolution of Genes for Mercury Resistance. *Annual Review of Microbiology*, (40): 607-634, 1986.
- [52] Osborn, AM., Bruce, KD., Strike P., Ritchie DA., Distribution, Diversity and Evolution of the Bacterial Mercury Resistance *mer* Operon. *FEMS Microbiology Review*, (19): 239-262, 1997.
- [53] O'Halloran, T., Transition Metals in Control of Gene Expression. *Science* (261): 715-725, 1993.
- [54] Ni'bhriain, N. N., Silver, S., Foster, T. J., Tn5 Insertion Mutation in the Mercuric Ion Resistance Genes Derived from Plasmid R 100-1. *Journal of Bacteriology*, (155): 690-703, 1983.
- [55] Weiss, A., Murphy, S., Silver, S., Mercury and Organomercurial Resistance Determined by Plasmids in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, (132): 197-208, 1997.

- [56] Silver, S., Rosen, B. P., Misra, T. K., DNA Sequencing Analysis of Mercuric and Arsenic Resistance Operons of Plasmids from Gram Negative and Gram Positive Bacteria. In 5th Int. Symp. Genet. Ind. Microorg, Split, Yugoslavia, ed. M. Alacevic, D. Hranueli, Z. Toman, 357-371. Zagreb, Yugoslavia: Pliva, 1986.
- [57] Boyd, E. S., Barkay, T., The Mercury Resistance Operon: From an Origin in a Geothermal Environment to an Efficient Detoxification Machine. *Frontiers in Microbiology*, 2012.
- [58] Beveridge, T. J., Fyfe, W. S., Metal Fixation by Bacterial Cell Walls. *Can. Journal of Earth Science*, (22): 1893-1898, 1985.
- [59] Vijayaraghavan K., Yun, Y. S., Bacterial Biosorbents and Biosorption. *Biotechnology Advances.*, (26): 266–291, 2008.
- [60] Fourest E., Roux J. C., Heavy Metal Biosorption by Fungal Mycelia by-Products: Mechanisms and Influence of pH. *Applied Microbiology and Biotechnology*, (37): 399–403, 1992.
- [61] Volesky B., Biosorbent Materials. *Biotechnology and Bioengineering. Symposium*, (16): 121-126, 1986.
- [62] Gadd G. M., De Rome, L., Biosorption of Copper by Fungal Melanine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, (29): 610-617, 1988.
- [63] Zhang W. X., Majidi V., Monitoring the Cellular Response of *Stichococcus baccillaris* to Exposure of Several Different Metals Using *in vivo* P-31 NMR and Other Spectroscopic Techniques. *Environmental Science and Technology*, (28): 1577-1581, 1994.

- [64] Stevenson R. J., Bothwell M. L., Lowe R. L., Algal Ecology, Freshwater Benthic Ecosystems. Academic Press, 753, California, 1996.
- [65] Kuyucak N., Volesky B., Biosorbents for Recovery of Metals from Industrial Solutions. Biotechnology Letters, (10): 137-142, 1988.
- [66] Moat A. G., Foster J. W., Spector M.P., Microbial Physiology. Wiley-Liss. Inc., New York, 2002.
- [67] <http://nanoenarge.com.tr/sayfa.asp> (Erişim tarihi 23.04.2014)
- [68] Gourdon R., Bhende S., Rus E., Sofer S. S., Biotech Letters, 12 (11): 8, 1990.
- [69] Golab Z., Breitenbach M., Sites of Copper Binding in *Streptomyces pilosus*. Water Air and Soil Pollution, (82): 713–21, 1995.
- [70] Gupta R., Ahuja P., Khan S., Saxena R. K., Mohapatra H., Microbial Biosorbents: Meeting Challenges of Heavy Metal Pollution in Aqueous Solutions. Current Science, 78 (8): 967-73, 2000.
- [71] Alemdar S., Biyosorpsiyon Yöntemi ile Kadmiyum Giderimi. Doktora Tezi. Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Zonguldak, 2011.
- [72] Kılıç., M., Kurşun (II) ve Cıva (II) İyonlarının Biyokütle Üzerine Adsorpsiyonunun İncelenmesi. Doktora Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 2004.
- [73] Boysan F., Poliüre-Poliamin Reçinesi Kullanılarak Atıksulardaki Ağır Metal Kirliliğinin Adsorpsiyonla Gideriminin İncelenmesi. Doktora Tezi. Sakarya Üniversitesi, Sakarya, 2008.

- [74] Şencan, A., Sulu Çözelti ve Deri Endüstrisi Atıksuyundan Cr⁺⁶ İyonunun Aktif Çamur Biyokütleri ile Biyosorpsiyonu. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 2006.
- [75] Turan, Z., Atıksulardan Cr⁺⁶ İyonunun Biyosorpsiyon Yöntemi İle Giderimi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, 2012.
- [76] De Voort F. R., Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis. Food Res Int, 25, 397– 403, 1992.
- [77] <http://merlab.metu.edu.tr/zeta-potansiyel-ve-mobilite-olcum-cihazı> (Erişim tarihi: 15.04.2014)
- [78] <http://nanocomposix.com/pages/characterization-techniques> (Erişim tarihi 23.04.14)
- [79] Akan E. *Staphylococcus*. In. Akan E. ed. Tıbbi Mikrobiyoloji. İzmir: Saray Kitapevi, (1): 19, 1993.
- [80] Gutnick, D., Bacterial Interaction with Heavy Metals in the Environment, Research in Microbiology, (148): 513-551, 1997.
- [81] Kıran, F., Ağaosmanoğlu, Ö., Laktik Asit Bakterilerinin İdentifikasyonunda/ Tiplendirilmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 27 (1): 62-74, 2011.
- [82] Muyzer, G., DGGE/TGGE a Method for Identifying Genes From Natural Ekosystems. Current Opinion in Microbiology, (2): 317-322, 1999.

- [83] Muyzer, G. and Smalla, K., Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE) in Microbial Ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, (73): 127-141, 1998.
- [84] Yiğit, N., Aktaş A. E., Uslu, H., Comparison of Different Systems for Identification of Candida Strains. *Türk Mikrobiyoloji Cem Dergisi*, 38 (2): 83-86, 2008.
- [85] Welch, D.F., Applications of Cellular Fatty Acid Analysis. *Clinical Microbiology Reviews*, (4): 422-438, 1991.
- [86] <http://www.royalgroupinfo.com/products.html> (Erişim tarihi: 12.03.2014)
- [87] Tozoğlu, S., Uslu, H., Ertaş, Ü., Kaya, Ö., Antimicrobial Susceptibility of Microorganisms Isolated from Orofacial Infections. *Düzce Tıp Dergisi*. 12 (1): 48-53, 2010.
- [88] Özkaya B., Microbial Community Analysis with PCR-DGGE-Sequencing Based Molecular Methods in Municipal Solid Waste Management. *Yıldız Teknik Üniversitesi Sigma Dergisi*. (3): 219-227, 2011.
- [89] http://www.acgtinc.com/specialty_dna_sequencing.htm
(Erişim tarihi 22.04.2014)
- [90] Klijn, N., Weerkamp, A. H., De Vos, W.M., Identification of Mesophilic Lactic Acid Bacteria by Using Polymerase Chain Reaction Amplified Variable Regions of 16S rRNA and Specific DNA Probes. *Applied and Environmental Microbiology*, (57): 3390-3393, 1991.
- [91] Stefan, R. I., Atlas, R.M., Polymerase Chain Reaction, Application in *Environmental Microbiology*, (45): 137-161, 1991.

- [92] Gasson, M.J., De Vos, W.M., Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Blackie Academic and Professional, London, 398, 1994.
- [93] Swamithan, B., Feng, P., Applied and Environmental Microbiology, (48): 401-426, 1994.
- [94] Watson, J.D., Gilman, M., Witkovski, J. Zoller, M., Recombinant DNA, Scientific American Books, USA, 1992.
- [95] Yılmaz, R., Temiz, A., *Streptococcus salivarius subs. Thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*'un Klasik ve Moleküler Yöntemler Kullanılarak Tanımlanması ve Karakterizasyonu. Orta Mikrobiyoloji Dergisi, 1 (3): 19-42, 2003.
- [96] Ludwig, W., Schleifer, K.H., Bacterial Phylogeny Based on 16S and 23S rRNA Sequence Analysis. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews, 15 (2-3) :155-173, 1994.
- [97] Çallı, B., Mertoğlu, B., Roest, K., İnanç, B., "Comparison of Long-Term Performances and Final Microbial Compositions of Anaerobic Reactors Treating Landfill Leachate. Bioresource Technology, (97) :641-647, 2006.
- [98] Britschi, T. B., Giovannoni, S. J., Phylogenetic Analyses of Natural Marine Bacterioplankton Population by rRNA Gene Cloning and Sequencing. Applied and Environmental Microbiology, (57) :1707-1713, 1991.
- [99] Edgcomb, V. P., Kysela, D. T., Tekse, A., Gomez, A. V., Sogin, M. L., Benthic Eucaryotic Diversity in the Guaymas Basin Hydrothermal Vent Environment. PNAS, (11): 7658-7662, 2002.
- [100] Bahadır, M., Kızılırmak Nehri Akım Değişimlerinin İstatistiksel Analizi. International periodical for the languages. Literature and History of Turkish or Turkich, 6 (3): 1339-1356, 2011.

- [101] Çavuşoğlu, K., Gündoğan, Y., Çakır Arıca, Ş., Kırındı, T., *Mytilus sp* (midye), *Gammarus sp* (nehir tırnağı) ve *Cladophora sp.* (yeşil alg) Örnekleri Kullanılarak Kızılırmak Nehri'ndeki Ağır Metal Kirliliğinin Araştırılması. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 9 (1): 52-60, 2007.
- [102] Önganer, A.N., Kırbağ, S., Diyarbakır'da Taze Olarak Tüketilen Çökelek Peynirlerinin Mikrobiyolojik Kalitesi. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 25 (1-2): 24-33, 2009.
- [103] Sherlock Microbial Identification System MIDI, Inc., Newark, DE. 2001.
- [104] Cutting, S.M., and Horn, P.B., Edited by: Harwood C, Cutting S. John Wiley and Sons, Chichester, Genetic Analysis in Molecular Biological Methods for *Bacillus.*, 27-74, UK, 1990.
- [105] Yılmaz, F., Orman, N., Serim, G., Kochan, C., Ergene, A., Içgen, B., Surface water-borne multidrug and heavy metal-resistant *Staphylococcus* isolates characterized by 16S rDNA sequencing. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 91 (6): 697-703, 2013.
- [106] Zolgharnein, H., Karami, K., Assadi, M.M., Sohrab, A.D., Molecular Characterization and Phylogenetic Analyses of Heavy Metal Removal Bacteria from the Persian Gulf. Biotechnology, 9 (1): 1-8, 2010.
- [107] Kebelmann-Betzing, C., Seeger, K., Dragon, S., Schmitt, G., Moricke, A., Schild, T. A., Henze, G., and Beyermann, B., Advantages of a New *Taq* DNA Polymerase in Multiplex and Time-Release PCR. BioTechniques, 24 (1): 154-158, 1998.
- [108] Figueira, M.M., Volesky, B., Ciminelli, V.S.T., Assessment of Interference in Biosorption of a Heavy Metal. Biotechnology and Bioengineering, 54 (4): 344-350, 1997.

- [109] Kahyaoğlu, B., Kırıkkale Kızılırmak'tan Ağır Demir Metaline Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale, 2013.
- [110] Turalı, G., Bakır ve Kroma Dirençli Bakterilerin Biyokimyasal ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale, 2012.
- [111] Hussein, H., Moawad, H., Farag, S., Isolation and Characterization of *Pseudomonas* Resistant to Heavy Metals Contaminants. Environmental Biotechnology Department, Genetic Engineering and Biotechnology Research Institute, Mubarak City for Scientific Research and Technology Applications, Egypt, 2003.
- [112] Andrezza, R., Pieniz, S., Wolf, L., Lee, M. K., Characterization of Copper Bioreduction and Biosorption by a Highly Copper Resistant Bacterium Isolated from Copper-Contaminated Vineyard Soil. Science of the Total Environment, 2010.
- [113] Adıgüzel, A., İnan, K., Şahin, F., Arasoğlu, T., Güllüce, M., Beldüz, A. O., Barış, Ö., Molecular Diversity of Thermophilic Bacteria Isolated from Pasinler Hot Spring (Erzurum, Turkey). Turkish Journal of Biology, (35): 267-274, 2011.
- [114] Demirel S., Molecular Techniques For Determining Microbial Diversity In Treatment Systems. Sigma 30, 179-192, 2012.
- [115] Şahin, Ö., Yağ Asidi ve 16S rRNA Sekans Analizleri İle Tanımlanan Lityum, Mangan ve Çinko Dirençli Bakterilerin Biyosorpsiyon Yeteneklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale, 2013.

- [116] Kıvanç, M., Karakaş, N., Platin, S., Atık Sulardaki Krom İyonlarının Giderilmesinde *Bacillus subtilis*'in Kullanılması. Ekoloji Çevre Dergisi, 1996.
- [117] EPA (Environmental Protection Agency, Parameters o Water Quality Interpretation and Standarts. ISBN-184096-015-3, Ireland, 2001.
- [118] Suriya, J., Bharathiraja, S., Rajasekaran, R., Biosorption of Hevay Metals by Biomass of *Enterobacter cloacae* Isolated from Metal-Polluted Soils. International Journal of Chemistry Technology Research, 0974-4290, (5): 3, 1329-1338, 2013.
- [119] Chatterjee, S. K., Bhattacharjee, I., Chandra, G., Biosorption of Heavy Metals from Industrial Waste Water by *Geobacillus thermodenitrificans*. Journal of Hazardous Materials, (175): 117–125, 2010.
- [120] Oves, M., Khan, M. S., Zaidi, A., Biosorption of Heavy Metals by *Bacillus thuringiensis* strain OSM29 Originating from Industrial Effluent Contaminated North Indian Soil. Saudi Journal of Biological Sciences, (20): 121-129, 2014.
- [121] Hussein, H., Ibrahim, S. F., Kandeel, K., Biosorption of Heavy Metals from Waste Water Using *Pseudomonas* sp. Journal of Biotechnology, (7): 1, 2004.
- [122] Cirik, Y., Büyükkateş, Y., Merdivan, M., Ak, İ., Göksan, T., Cu (II) ve Co (II) İyonlarının *Spirulina platensis* (Cyanophyceae) ile Biyosorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi. Biyoloji Bölümleri Araştırma Dergisi, 5 (1): 7-12, 2012.
- [123] Pan, J., Liu, R., tang, H., Surface reaction of *Bacillus cereus* Biomass and Its Biosorption for Lead and Copper Ions. Journal of Environmental Sciences, 19 (2007): 403-408, 2006.

- [124] Şahin, Y., Öztürk, A., Biosorption of Chromium(VI) Ions from Aqueous Solution by the Bacterium *Bacillus thuringiensis*. *Process Biochemistry*, 40 (2005): 1895–1901, 2004.
- [125] Öner, İ., Tutuklanmış *Synechocystis aquatilis* ile Cu^{+2} Uzaklaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale, 2004.
- [126] Wehrheim, B., Wttern, M., *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41 (6): 725-728, 1994.
- [127] Huang, C., Chiu, H.H., *Water Science and Technology*, 30 (3): 245-253, 1994.
- [128] Norberg, A.B., Persson, H., *Biotechnology and Bioengineering* 26, 239-245, 1984.
- [129] Chang, J.S., Hong, J., *Biotechnology and Bioengineering*, 44, 999-1006, 1994.
- [130] Sadowski, Z., Effect of Biosorption of Pb(II), Cu(II) and Cd(II) on the Zeta Potential and Flocculation of *Nocardia* sp. *Minerals Engineering* (14) 5: 547-552, 2001.
- [131] Özeran, S., Tosun, A., Ergun, M., *Saccharomyces cerevisiae* ve *Candida tropicalis* Mikroorganizmaları ile Cr(VI) İyonu Biyosorpsiyonu ve Biyosorpsiyon Mekanizması. Gazi Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü, Ankara, 2008.