

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FAME VE 16S rRNA SEKANS ANALİZLERİ İLE İDENTİFİYE EDİLEN NİKEL,
KOBALT VE KALAY DİRENÇLİ YÜZEY SUYU İZOLATLARININ
BİYOSORPSİYON YETENEKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

SEMİH CERİT

MAYIS 2014

Biyoloji Anabilim Dalında Semih CERİT tarafından hazırlanan FAME VE 16S rRNA SEKANS ANALİZLERİ İLE İDENTİFİYE EDİLEN NİKEL, KOBALT VE KALAY DİRENÇLİ YÜZEY SUYU İZOLATLARININ BİYOSORPSİYON YETENEKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ 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

Ortak Danışman

Prof. Dr. Aysun ERGENE

Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Doç. Dr. Muhammet IŞIKLAN _____

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

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

Üye : Yrd. Doç. Dr. Tarık DANIŞMAN _____

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

FAME VE 16S rRNA SEKANS ANALİZLERİ İLE İDENTİFİYE EDİLEN NİKEL,
KOBALT VE KALAY DİRENÇLİ YÜZEY SUYU İZOLATLARININ
BİYOSORPSİYON YETENEKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

CERİT, Semih

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Aysun ERGENE

Eş Danışman: Doç. Dr. Bülent İÇGEN

Mayıs 2014, 102 Sayfa

Endüstriyel kullanımları sonucu çevreye salınımları gerçekleşen ağır metaller yüzey sularında kirliliğe sebep olmaktadır. Yüzey sularında oluşan bu ağır metal kirliliğinin giderimine yönelik olarak kullanılan yöntemlerin çoğu yeterince etkin olmamakla birlikte ekonomik de değildirler. Bu nedenle atık sulardan metal uzaklaştırılmasında mikroorganizmaların kullanılması metal geri kazanımı ya da uzaklaştırılması için geleneksel metotlara oranla daha ekonomik ve alternatif bir çözüm olarak ortaya çıkmaktadır. Bu çalışmada da laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalar sonucu kültüre alınmış olan nikel, kobalt ve kalay direnci gösteren yüzey suyu izolatlarının söz konusu metaller için biyosorpsiyon yetenekleri araştırılmıştır. İlk olarak yüzey suyu izolatları yağ asidi metil ester (FAME) ve 16S rRNA sekans analizleri kullanılarak identifiye edilmiştir. Sonraki aşamada ise direnç gösterdikleri metaller için biyosorpsiyon potansiyelleri belirlenmiştir. Son olarakta biyosorpsiyon potansiyeli yüksek olan yüzey suyu izolatlarına yönelik yapılan Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), zeta potansiyometre, izoterm ve kinetik çalışmaları ile biyosorpsiyon verimlilikleri değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Nikel, Kobalt, Kalay, PZR, FAME, 16S rRNA, Biyosorpsiyon, FTIR, Zeta potansiyeli

ABSTRACT

ASSESSMENT OF BIOSORPTION ABILITIES OF NICKEL-, COBALT- AND TIN- RESISTANT SURFACE WATER ISOLATES IDENTIFIED BY FAME AND 16S rRNA SEQUENCE ANALYSES

CERİT, Semih

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied

Department of Biology, MSc. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Aysun ERGENE

Co-supervisor: Assoc. Prof. Bülent İÇGEN

May 2014, 102 Pages

Due to their several applications in industry, heavy metal discharges cause pollution in surface waters. Although there are several methods to remove heavy metals from surface waters, most of these methods are neither efficient nor cost effective enough. On the other hand, the use of microbial biosorbents for this purpose appears to be just opposite. For this reason in this study, the isolates which were found to be resistant to the heavy metals nickel, cobalt and tin previously in our lab used to investigate interms of their biosorption abilities for the corresponding heavy metals. Therefore, first, the isolates were identified by using fatty acid methyl ester (FAME) and 16S rRNA sequence analyses, respectively. Then, the identified isolates were further investigated for their biosorption efficiencies. Finally, the potential biosorbents were also assessed through Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) , zeta potential, biosorption isotherms and kinetic studies.

Keywords: Nickel, Cobalt, Tin, PCR, FAME, 16S rRNA, Biosorption, FTIR, Zeta potential

TEŞEKKÜR

Tez alıőmamın baőından sonuna kadar ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, tecrübe ve eşőiz bilgilerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Aysun ERGENE'ye ve ortak danıőmanım Sayın Doç. Dr. Bülent İÇGEN'e teşekkür ederim.

Tezimin deney aşamasında benden yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Doç. Dr. Sema ÇETİN'e teşekkür ederim.

Çalıőmam boyunca her türlü desteğini esirgemeyen Dr. Fadime YILMAZ'a, Özgün, ŞAHİN, İlhan COŐAR, Ramazan KOÇAK, İrem AKIN, Barıő KAHYAOĞLU, Mehmet GÜVEN, Selçuk TOKLUCU, Güven Emre SARIKAYA, Sıla CANPOLAT, Salih Batuhan SALIK, Lale GÖKSU, Hüseyin ULUSOY, Eren YİĞİT'e ve yardımlarını eksik etmeyen Murat ARTUÇ'a teőekkürlerimi borç bilirim.

Bugüne kadar beni maddi manevi destekleyen babam Yücel CERİT, annem Leyla CERİT ve kardeőim Melih CERİT'e sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Üniversite hayatım boyunca çalıőmalarımnda yanımda olan ve her daim yanımda olacak olan Yağmur AKDEMİR'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	2
1.1.3. Ağır Metaller ve Biyolojik Fonksiyonları	3
1.1.3.1. Nikelin Fonksiyonları	5
1.1.3.2. Kobaltın Fonksiyonları	5
1.1.3.3. Kalayın Fonksiyonları.....	6
1.1.4. Ağır Metallerin Çevresel Etkileri	6
1.1.4.1. Nikelin Çevresel Etkileri.....	7
1.1.4.2. Kobaltın Çevresel Etkileri	7
1.1.4.3. Kalayın Çevresel Etkileri.....	8
1.1.5. Ağır Metallerin Kullanıldığı Endüstri Dalları	8
1.1.5.1. Nikelin Kullanım Alanları	9
1.1.5.2. Kobaltın Kullanım Alanları	9
1.1.5.3. Kalayın Kullanım Alanları	10
1.1.6. Metal Uzaklaştırma Yöntemleri.....	10
1.1.6.1. Geleneksel Metal Uzaklaştırma Yöntemleri.....	10
1.1.6.2. Biyolojik Arınma Yöntemleri.....	11
1.1.6.2.1. Bakterilerin Ağır Metal Dirençlilik Mekanizmaları	11
1.1.6.2.1.1. Permeabilite Bariyeriyle Metallerin Uzaklaştırılması....	11
1.1.6.2.1.2. Metallerin Aktif Transportla Uzaklaştırılması.....	12
1.1.6.2.1.3. Metallerin Proteinlere Bağlanarak Alıkonulması.....	13

1.1.6.2.1.4. Ekstraselüler Alıkonma.....	13
1.1.6.2.1.4. Metallerin Daha Az Toksik Forma Dönüştürülmesi.....	14
1.1.7. Biyosorpsiyon	15
1.1.7.1. Biyosorpsiyon Mekanizmaları.....	17
1.1.8. Adsorbsiyon	19
1.1.8.1. Adsorbsiyon İzotermi.....	19
1.1.8.1.1. Langmuir İzortermi	20
1.1.8.1.2. Freundlich İzortermi.....	22
1.1.9. Adsorbsiyon Kinetiği	23
1.1.8.1. Pseudo Birinci Derece Eşitliği.....	23
1.1.8.1. Pseudo İkinci Derece Eşitliği	24
1.1.10. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR).....	25
1.1.11.Zeta Potansiyeli	28
1.1.12.Bakteriyel İdentifikasyon	29
1.1.12.1. Geleneksel Teknikler.....	29
1.1.12.2. Moleküler Teknikler.....	30
1.1.12.3. Yağ Asidi Metil Ester (FAME) Analizi	31
1.1.12.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	33
1.1.12.5. 16S rRNA Dizi Analizi	34
1.2. Çalışmanın Amacı	36
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	37
2.1. Materyal.....	37
2.1.1. Kullanılan Besiyerleri	37
2.1.1.1. Nutrient Agar (NA) Besiyerinin Hazırlanışı	37
2.1.1.2. Nutrient Broth (NB) Besiyerinin Hazırlanışı.....	37
2.1.1.3. Trypticase Soy Broth Agar Besiyerinin Hazırlanışı	38
2.1.1.4. Plate Count Agar	38
2.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar	38
2.1.2.1. Ağır Metal Stok Çözeltilerinin Hazırlanması.....	39
2.1.2.1.1. 0.5 M Nikel Sülfat Çözeltisi ($\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	39
2.1.2.1.2. 0.5 M Bakır Sülfat Çözeltisi ($\text{CoNO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).....	39
2.1.2.1.3. 0.5 M Krom Nitrat Çözeltisi ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	39
2.1.2.2. Kullanılan Tampon Çözeltiler	39

2.1.2.2.1. Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon	
Çözeltiler	39
2.1.2.2.1.1. Tris/EDTA Tamponu	39
2.1.2.2.1.2. % 10'luk SDS Tamponu	40
2.1.2.2.1.3. Proteinaz-K'nın Hazırlanması	40
2.1.2.2.1.4. NaCl Tamponu.....	40
2.1.2.2.2.5. CTAB/NaCl Tamponu.....	40
2.1.2.2.2.6. Kloroform/ İzoamil Alkol Tamponu	40
2.1.2.2.2.7. Kloroform/ İzoamil Fenol Tamponu	40
2.1.2.2.2.8. İzopropanol Alkol.....	41
2.1.2.2.2.9. % 70'lik Etil Alkol.....	41
2.1.2.2.2.10. Tris-HCl Tamponu (50 mM)	41
2.1.2.2.2.11. Tris-HCl Tamponu (1 M)	41
2.1.2.2.2.12. Elektroforez Tamponu (50x TAE) Hazırlama.....	41
2.1.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Primerler ve	
Özellikleri	42
2.1.2.4. Yağ Asidi Çalışma Solüsyonları ve Hazırlanışı	42
2.1.2.4.1. Solüsyon I	42
2.1.2.4.2. Solüsyon II	42
2.1.2.4.3. Solüsyon III.....	42
2.1.2.4.4. Solüsyon IV.....	43
2.2. Yöntem	43
2.2.1. Çalışma Alanı.....	43
2.2.2. Örneklerin Toplanması	44
2.2.3. Nikel, Kobalt ve Kalay Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve Kodlanması	45
2.2.4. İzolatların Morfolojik Özelliklerin Saptanması	46
2.2.5. Maksimum Tolere Edilebilen Metal Konsantrasyonu (MTK) Değerlerinin	
Belirlenmesi.....	46
2.2.6. Bakteri Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi	46
2.2.7. Koloni Oluşturan Birim Sayısı	46
2.2.8. FAME Analizi.....	47
2.2.9. Kromozomal DNA İzolasyonu ve DNA Miktar Tayini	48
2.2.10. Kromozomal DNA Amplifikasyonu.....	48

2.2.11. PZR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi	49
2.2.12. DNA'nın Etidyum Bromür ile Boyanması	50
2.2.13. DNA Sekans Analizi.....	50
2.2.14. Filogenetik Soy Ağaçlarının Oluşturulması	50
2.2.15. Biyosorpsiyon Kapasitesinin Değerlendirilmesi	50
2.2.16. İzolatların Elektron Mikroskop Analizleri.....	51
2.2.17. İzoterm Çalışmaları.....	51
2.2.18. Adsorbsiyon Kinetiği Çalışmaları	51
2.2.19. Bakterilerin FTIR Analizi ile Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi	52
2.2.20. Zeta Potansiyeli Ölçümü.....	52
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	53
3.1. Bakterilerin İzolasyonu	53
3.2. Ni11 Kodlu Suş	53
3.2.1. Ni11 Kodlu Suşun FAME Analizi ile İdentifikasyonu	53
3.2.2. Ni11 Kodlu DNA İzolasyonu	55
3.2.3. Ni11 Kodlu Suşun PZR Optimizasyonu	55
3.2.4. Ni11 Kodlu suşun 16S rRNA Sekans Analizi ile İdentifikasyonu	57
3.2.5. <i>Comamonas testosteroni</i> 'nin Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi	59
3.2.6. <i>Comamonas testosteroni</i> 'nin Biyosorpsiyon Yeteneği Belirlenmesi	61
3.3. Co11 Kodlu Suş.....	61
3.3.1. Co11 Kodlu Suşun FAME Analizi ile İdentifikasyonu	61
3.3.2. Co11 Kodlu DNA İzolasyonu	63
3.3.3. Co11 Kodlu Suşun PZR Optimizasyonu	63
3.3.4. Co11 Kodlu suşun 16S rRNA Sekans Analizi ile İdentifikasyonu	65
3.3.5. <i>Staphylococcus warneri</i> 'nin Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi	67
3.3.6. <i>Staphylococcus warneri</i> 'nin Biyosorpsiyon Yeteneği Belirlenmesi	68
3.4. Sn11 Kodlu Suş	69
3.4.1. Sn11 Kodlu Suşun FAME Analizi ile İdentifikasyonu.....	69
3.4.2. Sn11 Kodlu DNA İzolasyonu	71
3.4.3. Sn11 Kodlu Suşun PZR Optimizasyonu	71
3.4.4. Sn11 Kodlu suşun 16S rRNA Sekans Analizi ile İdentifikasyonu	73
3.4.5. <i>P. agglomerans</i> 'in Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi	75
3.4.6. <i>P. agglomerans</i> 'in Biyosorpsiyon Yeteneği Belirlenmesi	77

3.4.7. <i>P. agglomerans</i> 'ın SEM Görüntüleri	78
3.4.8. <i>P. agglomerans</i> 'a ait Kesikli İzoterm Eğrilerinin Değerlendirilmesi	78
3.4.9. <i>P. agglomerans</i> 'a ait Kesikli Kinetik Çalışması	80
3.4.10. <i>P. agglomerans</i> 'ın FTIR Analizi Değerlendirilmesi	81
3.4.11. <i>P. agglomerans</i> 'ın Zeta Potansiyelinin Değerlendirilmesi	84
4. TARTIŞMA SONUÇ	85
KAYNAKLAR	92

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL	Sayfa
1.1. Şematik olarak ağır metallerin doğaya yayınımları.....	4
1.2. Hücrenin metal alım yolları.....	11
1.3. İki değerlikli metal iyonlarının proteinlerce taşınımı ve detoksifikasyonu.....	13
1.4. Metal-mikroorganizma etkileşimi.....	16
1.5. Biosorpsiyon mekanizmaları.....	17
1.6. Langmuir izotermi.....	21
1.7. Freundlich izotermi.....	22
1.8. FTIR şeması.....	26
1.9. Zeta potansiyeli.....	28
1.10. FAME Analizi.....	33
1.11. PZR Döngüsü.....	34
1.12. Bakterilerin 16S rRNA sekansına dayalı moleküler identifikasyonu.....	36
2.1. Örneklerin toplandığı bölgelerin uydu fotoğrafı.....	45
3.1. Ni11 kodlu suşa ait GC kromotogramı.....	55
3.2. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında Ni11 kodlu suşa ait PZR ürünleri.....	56
3.3. Farklı MgCl ₂ konsantrasyonlarında Ni11 suşuna ait PZR ürünleri.....	56
3.4. Ni11 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram.....	60
3.5. <i>C. testosteroni</i> 'nin pH 6, pH 7 ve pH 9'daki üreme eğrileri.....	60
3.6. <i>C. testosteroni</i> 'nin metal içeren ve içermeyen ortamlarda hücre sayısına bağlı standart eğrileri.....	60
3.7. <i>Comamonas testosteroni</i> 'nin nikel biyosorpsiyonu.....	61
3.8. Co11 kodlu suşa ait GC kromotogramı.....	63
3.9. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında Co11 kodlu suşa ait PZR ürünleri.....	64
3.10. Farklı MgCl ₂ konsantrasyonlarında Co11 suşuna ait PZR ürünleri.....	64
3.11. Co11 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram.....	67
3.12. <i>Staphylococcus warneri</i> 'nin pH 6, pH 7 ve pH 9'daki üreme eğrileri.....	68
3.13. <i>Staphylococcus warneri</i> 'ye ait metal içeren ve içermeyen ortamlardaki koloni oluşturan birim değerine bağlı standart eğrileri.....	68
3.14. <i>S. warneri</i> 'nin kobalt biyosorpsiyonu.....	69

3.15. Sn11 kodlu suşa ait GC kromotogramı	71
3.16. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında Sn11 kodlu suşa ait PZR ürünleri .	72
3.17. Farklı MgCl ₂ konsantrasyonlarında Sn11 suşuna ait PZR ürünleri	72
3.18. Sn11 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram .	75
3.19. <i>P. agglomerans</i> 'a ait pH 5, pH 7 , pH 9'daki üreme eğrileri	76
3.20. <i>P. agglomerans</i> 'a ait metal içeren ve içermeyen ortamlardaki koloni oluşturan birim değerine bağlı standart eğrileri	77
3.21. <i>P. agglomerans</i> 'a ait kalay biyosorpsiyonu	77
3.22. <i>P. agglomerans</i> 'a ait kalay içeren ve içermeyen ortamlarda ki SEM görüntüleri	78
3.23. <i>P. agglomerans</i> 'a ait Freundlich ve Langmuir izoterm grafikleri.....	79
3.24. Kalay metali için kesikli kinetik çalışmasında biyosorpsiyon kapasitesinin zamana bağlı değişimi.....	80
3.25. <i>P. agglomerans</i> yüzeyinde kalay adsorpsiyonunun pseudo birinci derece ve pseudo ikinci derece reaksiyon kinetiği	81
3.26. <i>P. agglomerans</i> 'ın metalli ve metalsiz ortamda FTIR analizi sonuçları	82
3.27. <i>P. agglomerans</i> 'ın kalay konsantrasyonuna bağlı zeta potansiyeli değişim grafığı	84

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE	Sayfa
1.1. Çeşitli endüstrilerden doğaya ağır metal salınımı	43
1.2. FTIR kütüphanesi	27
1.3. Mikrobiyal çeşitliliği belirlemede kullanılan teknikler ve kıyaslamalar	31
2.1. PZR da kullanılan primerler ve özellikleri	42
2.2. Örneklerin alındığı bölgeler ve koordinatları	44
3.1. Ni11 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri	54
3.2. Ni11 kodlu suş için 16S rRNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri	58
3.3. Co11 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri	62
3.4. Co11 kodlu suş için 16S rRNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri	66
3.5. Sn11 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri	70
3.6. Sn11 kodlu suş için 16S rRNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri	74
3.7. İzoterm sabitleri	79
3.8. <i>P. agglomerans</i> için pseudo birinci ve ikinci derece kinetik model sabitleri	81
3.9. <i>P. agglomerans</i> 'a 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
NiSO ₄	Nikel Sülfat
CoNO ₃	Kobalt Nitrat
SnCl ₂	Kalay Klorür

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
KOB	Koloni Oluşturan Birim

1. GİRİŞ

Sanayi devriminden itibaren ağır metal üretiminin zirai, endüstriyel ve askeri uygulamalarda hızlı bir şekilde artması özellikle endüstriyel toplumlarda önemli çevre problemlerinden birini, ağır metallerin doğal çevrede birikimine neden olmuştur [1]. Su ortamları insanlar tarafından uzun süredir görmezden gelinerek sınırsız kapasitedeki atık bölgeleri olarak görülmektedir. Endüstriyel atık suların, zirai kaynakların ve evsel atıkların su ortamına deşarjı dünyanın birçok kesiminde giderek yaygınlaşmaktadır. Bunun sonucu olarak su ortamlarında kirlilik hızla artmaktadır [2]. Suda bulunabilecek her türlü madde belirli bir derişim üzerinde sağlık için zararlıdır. Zehirlilik etkisine sahip maddeler düşük derişimlerde bulunmaları halinde bile insan sağlığına zarar vererek hastalıklara ve hatta ölümlere neden olabilirler. Eser miktarda bile sakıncalı olan bu maddeler arasında en önemli grubu ağır metaller olarak adlandırılan antimon, gümüş, kurşun, kadmiyum, nikel, krom, civa, kobalt, kalay, çinko gibi elementler oluşturur [3]. Ağır metallerin farklı formlarda çevreye girmesi mikrobiyal topluluklarda ve onların aktivitelerinde kayda değer modifikasyonlar yapmaktadır. Endüstriyel ve maden atıklarıyla sucul ortamlara giren ağır metaller önemli derecede kirletici rolü üstlenmektedir [1]. Sularda bulunan bunun gibi çeşitli kirlenmelerden dolayı bu atıkların uzaklaştırılması gerekmektedir. Son yıllarda ağır metal içeren atık suların arıtımında biyolojik yöntemler; etkili, pratik ve ekonomik olmaları nedeniyle fiziksel-kimyasal arıtım yöntemlerine tercih edilmekte ve bilimsel çalışmalar bu yönde ağırlık kazanmaktadır. Ağır metal gideriminde özellikle çeşitli bakteri, maya, mantar türleri kullanılmaktadır [4].

İndikatör organizmalar ağır metalin alımı, atılımı ve biyokullanılabilirliğinin izlenmesinde ve toksik etkilerin belirlenmesinde kullanılabilir, buldukları su ortamları ile doğrudan temas halinde olduklarından su ortamındaki kirleticileri alarak bünyelerinde biriktirebilirler ve bu sayede ortamın kirlilik seviyesi hakkında bilgi verebilirler [2].

1.1. Literatür Özeti

1.1.1. Çevre Kirliliği

Son yıllarda nüfustaki hızlı artış, enerji ve besin yetersizliği, düzensiz kentleşme, insanların aşırı tüketim isteği ve baş döndürücü bir hızla gelişen teknolojik ilerlemeler, çevre kirliliği sorununun önemini iyice hissettirir hale getirmiştir. Söz konusu sorunların çözümlenmesinde önemli rol oynayan teknolojik gelişmeler, insanlığın yararına birçok yeni ve alternatif ürünler sunarken küçümsenmeyecek oranda ve nitel-nicel yönden oldukça farklı atıklar oluşmaktadır. Bu tür katı ve sıvı atıkların arıtmaları mevcut konvansiyonel arıtım süreçleri ile yeterli düzeyde yapılamamaktadır. Bunun yanında etkili bir arıtım ise, ilgili endüstri kuruluşlarına oldukça pahalıya mal olmaktadır. Bu nedenle, günümüzde birçok endüstri kuruluşlarının önemli sorunu olan bu tür atıkların arıtımında; ekonomik yönden ucuz, pratik uygulamalarda kolaylık sağlayacak arıtım süreçlerine yönelik geniş bilimsel araştırmalar yapılmaktadır [4].

Çevre kirliliğini artıran ve ekolojik dengenin bozulmasında önemli rol oynayan endüstri kuruluşlarının başında, atık sularında ağır metal içeren kuruluşlar gelmektedir. İlgili endüstri kuruluşları, süreçler gereği çeşitli ağır metalleri kullanmakta ve atıklarında civa (Hg), çinko (Zn), kobalt (Co), bakır (Cu), demir (Fe), kurşun (Pb), krom (Cr) ve gümüş (Ag) gibi metal iyonlarını ihtiva etmektedir [2,4].

1.1.2. Su Kirliliği

Dünya nüfusunun giderek artmasından dolayı su kirliliğinin çeşitli nedenlerden dolayı arttığı bilinmektedir. Yeryüzündeki sular, güneşin sağladığı enerji ile birlikte sürekli bir döngü içinde bulunurlar. İnsanoğlu, ihtiyaçlarını karşılayabilmek için, suyu bu doğal döngüden alır ve kullandıktan sonra tekrar aynı döngüye geri verir [4]. Bu doğal süreç sırasında suya karışan her türlü zararlı madde suyun fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini değiştirerek su kirliliğine sebep olur. Bu

sebeplerin başında; nüfus artışı, kentleşme, sanayileşme, tarımsal mücadele ilaçları ve kimyasal gübreler gelmektedir [4].

Etkili bir arıtım yapılmaması durumunda bu tür atıkların göl, nehir, deniz, okyanus gibi alıcı ortamlara deşarj edilmesi, suda yaşayan ve bu suyu kullanan canlı sistemleri ve çevresi için oldukça toksik olmaktadır. Ayrıca, arıtım sistemlerinde hiçbir zaman parçalanamayan bu tür maddeler, temel arıtımda etkin olan; özellikle biyolojik arıtım süreçlerinde önemli rolü bulunan mikroorganizmalar (aktif çamur vb.) için de çok küçük miktarlarında bile toksik etki yaptığı için arıtımının gerçekleşmediği görülmektedir [4,5].

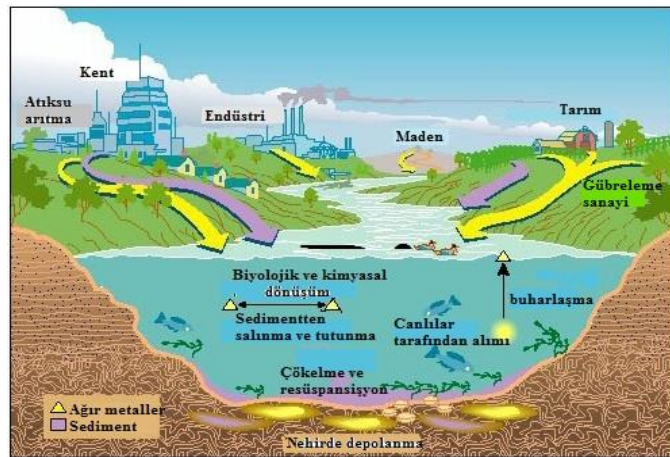
1.1.3. Ağır Metaller ve Biyolojik Fonksiyonları

Ağır metal, periyodik cetvelin, üçüncü ya da daha yüksek periyodunda bulunan metaller için kullanılan ve bilimsel olmayan bir deyimdir. Genel olarak zehirli ve çevre kirliliğine neden olan tüm metaller ağır metal olarak adlandırılmaktadır. Ağır metal tanımı fiziksel özellik açısından yoğunluğu 5 g/cm³'ten daha yüksek olan metaller için kullanılır. Bu gruba kurşun, kadmiyum, krom, demir, kobalt, bakır, nikel, civa ve çinko olmak üzere 60'tan fazla metal dahildir. Metallerin ekolojik sistem üzerine etkilerinden bahsederken aslında metalin ait olduğu grubun ele alınması ve bu özelliğin vurgulanması biyolojik etki açısından çok daha anlamlıdır [6,7].

Antik çağlarda bu metallerin cevherleri işlenmeye başlandığından beri metaller insan faaliyetleri sonucu olarak doğal çevrimler dışında atmosfere, hidrosfere ve pedosfere yayılmaya başlamışlardır. Yüzyıllar boyunca insanlar ağır metalleri etkilerini bilmeden takı, silah, su borusu gibi çeşitli amaçlar için kullanmışlardır. Sanayileşme ile birlikte ağır metal içeren kömürlerin yakılmaya başlanması ile endüstri bölgelerindeki ağır metal kirliliği aşırı boyutlara ulaşmış ve ağır metal kirliliğinden kaynaklanan ilk tanımlanan zehirlenmeler Japonya'da ortaya çıkmıştır [7].

Ağır metaller su kaynaklarına, endüstriyel atıklar veya asit yağmurlarının toprağı ve dolayısıyla bileşimde bulunan ağır metalleri çözmesi ve çözünen ağır metallerin ırmak, göl ve yeraltı sularına ulaşmasıyla geçerler. Sulara taşınan ağır metaller aşırı derecede seyrelirler ve kısmen karbonat, sülfat, sülfür olarak katı bileşik oluşturarak su tabanına çöker ve bu bölgede zenginleşirler. Sediment tabakasının adsorpsiyon kapasitesi sınırlı olduğundan dolayı da suların ağır metal konsantrasyonu sürekli olarak yükselir. Ülkemizde de başta tuz ihtiyacımızı karşıladığımız tuz gölü olmak üzere kapalı göllerimizde yeterli çevresel önlem almadığımız ve su havzalarında kontrolsüz sanayileşmeye izin verdiğimizden dolayı ağır metal konsantrasyonu sürekli yükselmektedir [7].

Ağır metallerin çevreye yayınında etken olan en önemli endüstriyel faaliyetler çimento üretimi, demir çelik sanayi, termik santraller, cam üretimi, çöp ve atık çamur yakma tesisleridir. Havaya atılan ağır metaller, sonuçta karaya ve buradan bitkiler ve besin zinciri yoluyla da hayvanlara ve insanlara ulaşırlar ve aynı zamanda hayvan ve insanlar tarafından havadan aerosol olarak veya toz halinde solunurlar. Ağır metaller endüstriyel atık suların içme sularına karışması yoluyla veya ağır metallerle kirlenmiş partiküllerin tozlaşması yoluyla da hayvan ve insanlar üzerinde etkin olurlar [7]. Bazı metaller, örneğin Cu ve Zn biyokimyasal fonksiyonların korunması için gereklidir. Diğer yandan Pb ve Hg biyokimyasal fonksiyonların herhangi birisi için gerekli değildir [8].



Şekil 1.1. Şematik olarak ağır metallerin doğaya yayınımları [7]

1.1.3.1. Nikelin Fonksiyonları

Nikel ilk olarak Axel Cronstedt adlı İsveçli mineralojist tarafından, gersdorffit cevheri araştırılırken bulunmuştur. Atom numarası 28'dir. Nikelin organik formu, inorganik formundan daha zehirleyicidir. Deriyi tahriş etmesinin yanında kalp-damar sistemine çok zararlı ve kanserojen bir metaldir [9,10]. Bazı bitki türleri, örneğin; baklagiller, için yararlı bir element olan nikel, belli bir doz aşımında (0.18-5 ppm) zehirleyici olmaktadır [10]. Zararlı etkilerine rağmen nikel ve tuzlarıyla zehirlenme nadir rastlanır. Nikelin toksikolojik etkileri kanserojen, solunum sistemine etki ve dermatolojik etki olarak 3 grupta incelenmektedir [9].

1.1.3.2. Kobaltın Fonksiyonları

Kobalt 1735 yılında keşfedilmiş olup, atom numarası 27 simgesi ise Co'dur. Yeryüzünde 25 mg/ton ortalama ile kobalt en az sıklıkla bulunan elementler grubundadır [9,10]. Kobalt ve kobalt bileşiklerinin insanlar üzerinde kansere neden olduğuna dair henüz kesin bulgular olmamasına rağmen, kobalt bileşikleri risk teşkil etmektedirler ve kanserojen madde gibi muamele görürler [9]. Suda çözünürlüğü olmayan kobalt oksit (Co_3O_4) solunum yolu ile alındığında vücut tarafından çok iyi emilmekte ve hücrelerde birkaç günde çözünerek kana karışmaktadır. Suda çözünür kobalt bileşikleri ağız yolu ile alındığında %75'i tekrar atılırken geriye kalan kobalt kan, karaciğer, akciğer, böbrek, testisler ve bağırsaklarda toplanmaktadır. Uzun süre kobalt tozuna maruz kalındığında, alerjik tepkilere ve kronik bronşite neden olmasına rağmen kobalt kaynaklı deri tahrişi ve hastalıklar çok nadir gözlenir ve etki iki ayrı gruba ayrılabilir. Birinci grup vücudun bazı bölgelerinde meydana gelen kızarıklıklar şeklinde; özellikle sıcak havalarda, ellerde kobalt temasından kısa süre sonra oluşur. İkinci grup; uzun yıllar kobalt bileşikleri ile temas sonucunda ortaya çıkan egzamadır [10].

1.1.3.3. Kalayın Fonksiyonları

Kalay çeşitli organik maddelerde kullanılır. Organik kalay bağları insanlar için en tehlikeli olan kalay formlarıdır. Kalay bileşikleri tarım alanında; tarım ilaçları şeklinde, plastik endüstrisi, boya endüstrisi gibi çok sayıda endüstride kullanılır. Organik kalay maddelerinin kullanıldığı alanların sayısı her gün artmaktadır [10]. Organik kalay maddelerinin etkileri çeşitlilik gösterebilir. Bulunduğu maddenin çeşidine ve etki altında kalan organizmaya bağlıdır. Trietilkalay insanlar için en tehlikeli organik kalay maddesidir. İnsanlar kalay bağlarını gıdalarla, solunumla ve deri yoluyla alabilirler. Kalay bileşiklerinin alınması; uzun dönem etkileri kadar, akut etkilere de sebep olabilir. Akut etkileri; göz ve cilt tahrişleri, baş ağrısı, karın ağrısı, bulantı ve baş dönmesi, şiddetli terleme, nefes darlığı, idrara çıkma problemleridir. Uzun dönem etkileri; karaciğer hasarları, bağışıklık sistemlerinin yetersizliği, kromozomal zedelenme, anemi, beyin zedelenmesi gibi etkileri vardır. Fakat gıdalardan kaynaklanan kalay zehirlenmeleri çok nadirdir ve sadece çevresel kirliliklerden sonra meydana gelir [11].

1.1.4. Ağır Metallerin Çevresel Etkileri

Ağır metaller, su kaynaklarına, endüstriyel atıklar veya asit yağmurlarının toprağı ve dolayısı ile bileşimde bulunan ağır metalleri çözmesi ve çözünen ağır metallerin ırmak, göl ve yeraltı sularına ulaşmasıyla geçerler. Sulara taşınan ağır metaller aşırı derecede seyrelirler ve kısmen karbonat, sülfat, sülfür olarak katı bileşik oluşturarak su tabanına çöker ve bu bölgede zenginleşirler. Sediment tabakasının adsorpsiyon kapasitesi sınırlı olduğundan dolayı da suların ağır metal konsantrasyonu sürekli olarak yükselir. Ülkemizde de başta tuz ihtiyacımızı karşıladığımız tuz gölü olmak üzere kapalı göllerimizde yeterli çevresel önlem almadığımız ve su havzalarında kontrolsüz sanayileşmeye izin verdiğimizden dolayı ağır metal konsantrasyonu sürekli yükselmektedir. Ağır metallerin ekolojik sistemde yayınımları dikkate alındığında doğal çevrimlerden daha çok insanın neden olduğu etkiler nedeniyle çevreye yayınımları söz konusu olduğu görülmektedir. Sürekli ve kullanıma bağlı kirlenmenin yanı sıra kazalar sonucu da ağır metallerin çevreye yayınımları önemli

miktarlara ulaşabilmektedir. Yıllık olarak doğal çevrimler sonucu 7600 ton Cd, 18800 ton arsen, 3600 ton civa 332000 ton kurşun atmosfere atılmaktayken insan faaliyetleri sonucu deşarj edilen miktarlar dikkate alındığında ise selen (19 kat), kadmiyum 8 kat, civa, kurşun, kalay 6 kat, arsen, nikel ve krom 3 kat daha fazladır [12].

1.1.4.1. Nikelin Çevresel Etkileri

Toprakta eser element olarak bulunan nikel, demir ve alüminyum silikatların latisinde yer almaktadır. Çoğunlukla sülfat ve oksitler halinde bulunan ve yeryüzünde bulunma sıklığı 24. sırada olan nikelin ortalama konsantrasyonu %0.008'dir. Toplam rezerv 130×10^6 ton olarak tahmin edilmektedir [10]. Nikel alaşımları, fabrikaların bacalarından ya da elektrik santralleri ve çöp yakma tesislerinden çevreye salınımı gerçekleşebilir. Nikel bitkilere ve toprağa yerleşmek için havadan yağmur ve kar taneleri sonucu yeryüzüne inerek bunlara tutunur. Bununla beraber toprağa karışan nikel buradan yer altı sularına da geçiş yapabilir. Suda balıklarda üzerinde gözlenmemiştir. Çalışmalar bazı bitki türlerinde nikelin birikim yaptığını göstermiştir [13].

1.1.4.2. Kobaltın Çevresel Etkileri

Kobalt, hava, su, toprak, kaya, bitki ve hayvanlarda ortamda doğal olarak bulunan bir elementtir. İnsanlara madencilikte kobalt içeren cevherleri işleme ve kobalt kimyasalları kullanılmasıyla atmosferden geçer. Kobalt radyoaktif izotopları doğal ortamda mevcut değildir. Ancak nükleer santral işletmesi ve nükleer kazalar yoluyla serbest bırakılır. Yarı ömrü çok kısa olmakla beraber tehlikeli değildir. Çevreye giren kobalt yok edilemez. Toprak parçacıkları ya da suya adsorbe olabilir. Kobalt çok düşük miktarda bitkinin büyümesine etki edebilir. Hayvanlar otlama yaparken kendileri için gerekli kobaltı alacaklardır. Madencilik tesislerinin yakınındaki topraklar kobalt açısından zengin olabilir. Buralardan beslenen hayvanlar ve yaşayan

bitkiler üzerinde kobalt daha çok birikim yapar. Ancak yediğimiz sebze, meyve, balık ve diğer hayvansal gıdalarda yüksek oranda içermez [14].

1.1.4.3. Kalayın Çevresel Etkileri

Kalay hem doğal yolla hem de insan kaynaklı yollarla atmosfere salınımı gerçekleşebilir. Kalay tarımsal faaliyetler ve fırtına gibi aktiviteler sonucu oluşan tozlarla topraktan serbest kalabilir. Ayrıca orman yangınları, volkanik faaliyetler sonucu da açığa çıkabilir. Kalay klorür suda diğer bileşenlerine göre daha iyi çözünürlük gösterir. İnorganik kalayın bakteriler tarafından biometile edilebilir [15].

1.1.5. Ağır Metallerin Kullanıldığı Endüstri Dalları

Atık suda bulunan ağır metallerin önemli bir miktarı arıtma çamurlarında bulunurlar. Çözünmüş kısımlar ise yüzey suları ve denizlere ulaşarak bu bölgelerde kalırlar. Buralardan ağır metaller tekrar mobilize olarak içme sularına ve besin zincirine ulaşabilirler. Besin zincirine ulaşan ağır metaller kimyasal veya biyolojik olarak bünyeden atılamazlar ve akümüle olurlar. Buna rağmen canlı organizmalarda her ne kadar taban, hava veya sulara rastlanılan konsantrasyonlardan çok daha yüksek oranda ağır metal konsantrasyon değerlerine ulaşılsa dahi, çok nadir olarak hayvan ve insanlarda sağlık riski doğuracak ağır metal akümülyasyon sınırına ulaşılır [7]. Tekstil, deri, boya, metal ve kâğıt endüstrilerinden kaynaklanan atık sular fazla miktarda ağır metal içermektedir. Bu tip atık suların arıtılmadan kontrolsüz bir şekilde çevreye boşaltılmaları o çevredeki canlılara toksik ve mutajenik etki yapmaktadır. Çeşitli metaller bazı organizmalarda canlılığın devam ettirilmesi için çok az miktarlarda kullanılırsalar da yüksek konsantrasyonları hücrede zararlı etkilere yol açmaktadır. Ag, Al, Au, Cd, Pb ve Hg gibi toksik metallerin ise biyolojik önemi bulunmamakla birlikte hücrede düşük konsantrasyonda bile bulunmaları tehlikeli olmaktadır [16]. Cd, Zn, Cu, Ni, Pb, Hg ve Cr gibi ağır metallerin çöp depolama alanlarından sızan sızıntı suları bileşiklerinin kaynakları; metal kaplama, para basımı, metal yüzeyi temizleme, madencilik aktiviteleri, otomotiv sanayi, pil ve akü üretimi,

deri sanayi, petrol rafinerileri, kimya ve çevre laboratuvarları, boya üretimi, pestisitler ve pigment üretimi, foto grafik gibi endüstrilerdir [17].

Çizelge 1.1. Çeşitli endüstrilerden doğaya ağır metal salınımı [17]

Endüstri Türü	Cd	Cr	Cu	Hg	Pb	Ni	Sn	Zn
Kağıt Endüstrisi	-	+	+	+	+	+	-	-
Petrokimya	+	+	-	+	+	-	+	+
Klor-alkali Üretimi	+	+	-	+	+	-	+	+
Gübre Sanayi	+	+	+	+	+	+	-	+
Demir-Çelik Sanayi	+	+	+	+	+	+	+	+
Enerji Üretimi (Termik)	+	+	+	+	+	+	+	+

(+; var, -; yok)

1.1.5.1. Nikelin Kullanım Alanları

Nikelin büyük bir çoğunluğu (%80), korozyon ve ısı direncinin yüksek, sertliğinin ve dayanımının iyi olması sebebiyle alaşım üretiminde kullanılmaktadır. Nikelin ana kullanım alanı paslanmaz çelik, bakır-nikel alaşımları ve diğer korozyona dayanıklı alaşım üretimleridir. Saf nikel kimyasal katalizör olarak elektrolitik kaplamada ve alkali pillerde, pigmentler, madeni para, kaynak ürünleri, mıknatıslar, elektrotlarda, elektrik fişlerinde, makine parçaları ve tıbbi protezlerde kullanılmaktadır [10,18]. Nikel hem altın için mükemmel bir beyazlaştırıcı olduğu gibi hem de bakır ile birlikte kullanıldığında mekanik özellikleri, işlenebilirliği ve döküm özellikleri iyi olan bir alaşım eldesini mümkün kılan önemli bir alaşım elementidir [19].

1.1.5.2. Kobaltın Kullanım Alanları

Kobalt stratejik ve endüstriyel uygulamalarda ve askeri alanda önemli kullanım alanlarına sahiptir. Kobalt, en çok süper alaşım olarak jet motor türbinlerinde kullanılırken, malzemelere manyetiklik özelliği kazandırma, korozyondan korunma

ve mekanik özelliklerin iyileştirilmesi amacıyla alaşımlarda, yüksek hız çeliklerinde, takım çeliklerinde, elmas takımlarında ve kesici uçlarda alaşım elementi olarak da kullanılır. Bileşikleri ise petrol ve seramik endüstrisinde katalizör ve boyalarda pigment, mürekkep ve verniklerde kurutma maddesi olarak kullanılır. Ayrıca pil elektrotlarında, her tip manyetik malzemelerde ve kayıt cihazlarında kullanılmaktadır. Günümüzde kobaltın en büyük maden üretici ülke Zaire (%52) ve en büyük metal kullanıcısı ise Amerika Bileşik Devletleri'dir [10,20].

1.1.5.3. Kalayın Kullanım Alanları

Çelik konserve kutularının kaplama maddesidir. Ayrıca lehim, bronz ve kurşun alaşımlarında yer alır. Bazı diş macunlarının içeriğinde, kalay ve flor bileşiği olan SnF5 kullanılır [21,22]. Süper iletken mıknatısların yapımında da kullanılır. Saf element halinin kullanımı çok sınırlıdır [21]. Kalay, teneke yapımında, kaplamacılıkta, çeşitli alaşımlar, lehim ve kimyasal madde yapımında kullanılır. Otomotiv endüstrisinde de motor yataklarında, kaporta, radyatör, yağ ve hava filtrelerinde kullanılır. Uçak ve gemi endüstrisi ile elektronik ve elektrik sanayinde geniş bir kullanım alanı vardır. Kimya sanayinde boya, parfüm, sabun, poliüretan üretimine kadar geniş bir alanda tüketilir. Bunların yanında, matbaacılıkta, mutfak malzemeleri ve cam endüstrisinde de kullanılmaktadır [22].

1.1.6. Metal Uzaklaştırma Yöntemleri

1.1.6.1. Geleneksel Metal Uzaklaştırma Yöntemleri

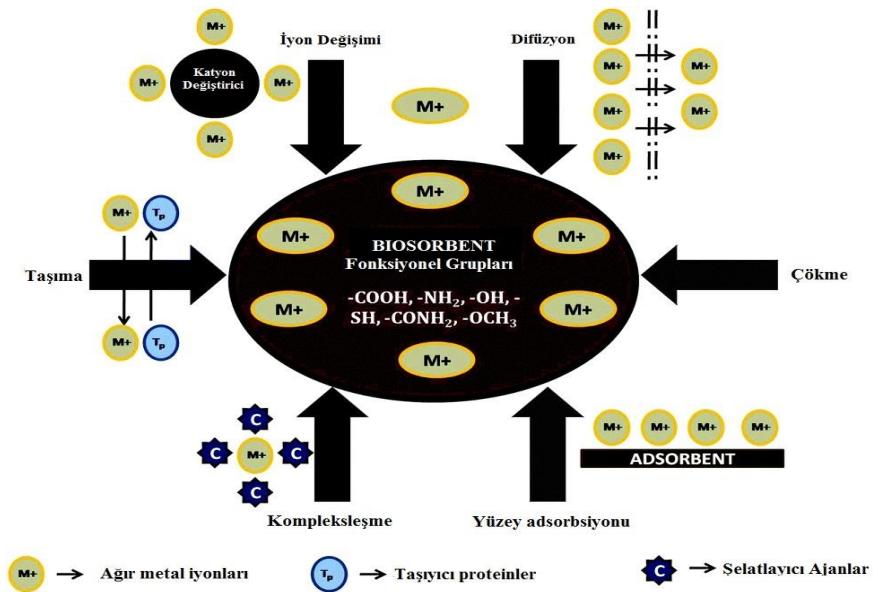
Ağır metal kontaminasyonu özellikle gelişmekte olan ülkeler açısından insan yoğunluğu sebebiyle ciddi endişeye neden olmaktadır [23]. Kimyasal çöktürme, kimyasal oksidasyon ve indirgenme, elektrokimyasal yöntemler, buharlaştırma yoluyla geri kazanım, filtrasyon, iyon değiştirme, membran teknolojisi endüstriyel atık sulardan ağır metalleri uzaklaştırmak için kullanılan bazı yöntemlerdir. Ancak bu yöntemler ekonomik açıdan karmaşık ve yetersizdirler [24,25].

1.1.6.2. Biyolojik Arıtma Yöntemleri

Son yıllarda geleneksel arıtma yöntemlerine alternatif ve etkin bir yöntem olarak biyolojik arıtma yöntemleri çalışılmıştır. Bu yöntemler hedef kirleticileri yüksek emilim yaparak uzaklaştırması, çevre dostu olması, düşük işletme maliyeti ve mükemmel performans göstermesi gibi çeşitli sebeplerden dolayı geleneksel yöntemlere göre daha çok avantaja sahiptir [25].

1.1.6.2.1. Bakterilerin Ağır Metal Dirençlilik Mekanizmaları

Mikroorganizmaların kompleks yapısı nedeniyle mikrobiyal hücrenin metalleri çok farklı giderim yolları mevcuttur [26].



1.1.6.2.1.1. Permeabilite Bariyeri ile Metallerin Uzaklaştırılması

Bakterilerin doğal formlarında metal iyonlarını absorbe etme kabiliyeti ekstrasellüler polisakkarit katmanda tanımlanmıştır ve metaller bakterilerin hayati hücrel komponentleri ile ilişki içerisindeyler. Bu yetenek bakterilerin dış polisakkarit katmanlarına metal katyonlarının tutunması için alan sağlamaktadır. Bakterilerin birçoğunda metalleri ekstrasellüler olarak bağlama kabiliyeti saptanmıştır. Dış polisakkarit katmanın koruyuculuğu sayesinde, Cd^{+2} içeren buyyonlarda bulunan *Klebsiella aerogenes* suşu hayatta kalmaktadır. Ayrıca aynı suşun dış polisakkarit katmanı giderildiğinde de Cd^{+2} 'nin birikimi gözlenmiştir [27].

Pseudomonas sp.'de Cu^{+2} 'nin periplazmik bağlanması olduğunda dirençlilik bir operonda bulunan dört gen tarafından kodlanmaktadır; *copA*, *copB*, *copC* ve *copD*. *copA* ve *copB* kısmi bir direnç sağlarken, *copC* ve *copD* Cu^{+2} 'ye tam bir direnç oluşumu sağlamaktadır. *copA* ve *copC* proteinleri iç ve dış membran arasında yer alırken, *copB* dış membranda yer almaktadır [27].

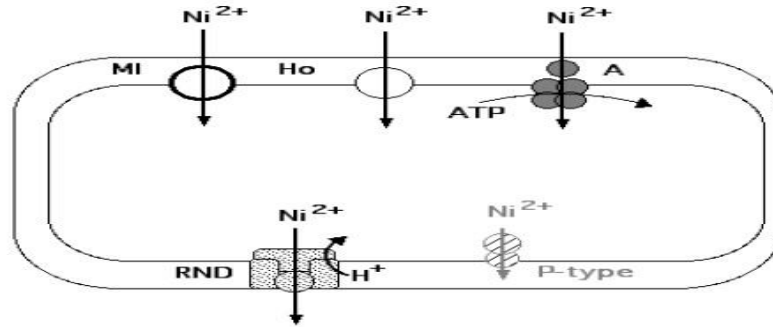
1.1.6.2.1.2. Metallerin Hücreden Aktif Transport ile Uzaklaştırılması

Metal dirençlilik sisteminde en büyük kategoriye aktif transport ya da aktif transport sistemi içermektedir. Mikroorganizmalar sitoplazmalarında bulunan toksik metalleri uzaklaştırmak için aktif transport mekanizmasını kullanmaktadırlar. Bu mekanizmalar kromozomal olarak ya da plazmidlerce kodlanmaktadır. Esansiyel olmayan metaller, normal besleyici transport sistemleri vasıtasıyla hücre içerisine giriş yaparlar, ancak hızlı bir şekilde de dışarı atılırlar. Bu aktif taşıma sistemleri ATPaz'a bağımlı olmadan da oluşabilir ve yüksek düzeyde spesifik katyon veya anyon atılmasını sağlamaktadır. ATP bağımlılığı ise, iyonofor antibiyotikler ve eşleşmeyen enerjinin kullanımıyla gösterilmektedir. Eşleşmeme durumunda ATP'nin oluşumu katyon ve anyonların aktif taşınımının azalması ile sonuçlanmaktadır [27-29].

Staphylococcus aureus ve *E. coli*'de bulunan *ars* operonu aracılığı ile oluşan antimonit ilişkili As^{+5} , arsenit (As^{+3}) direnci, *S. aureus*, *Bacillus* spp. ve *Listeria* spp.'de bulunan *cad* operonuna veya *Alcaligenes eutrophus*'da bulunan *czc* operonuna kodlanan Cd^{+2} direnci, ve *S. aureus*'da bulunan *cadA* ve *E. coli*'de bulunan *zntA* vasıtasıyla oluşan Pb^{+2} direncidir [27,28].

1.1.6.2.1.3. Metallerin Proteinlere Bağlanarak Hücre İçinde Alınması

İntrasellüler alıkonulma, sitoplazma içerisinde biriken metalin esansiyel hücresel komponentlere etki etmesi ile sonuçlanmaktadır. Bu mekanizma ile Cd^{+2} , Cu^{+2} ve Zn^{+2} birikimi gözlenmektedir. Bu şekilde meydana gelen metal direncine iki örnek verilebilir; metallothionein üreten *Synechococcus* spp. ve sisteinden zengin protein içeren *Pseudomonas* spp.'dir [27,28].



Şekil 1.3. İki değerlikli metal iyonlarının proteinlerce taşınımı ve detoksifikasyonu [28]

1.1.6.2.1.4. Ekstrasellüler Alıkonma

Metal direncinde ortaya konulan bu hipotez sadece bakteriler için geçerliken, son zamanlarda mantarlar ve mayalar için de geçerli hale gelmiştir. Örneğin; *Saccharomyces cerevisiae*, fazla miktarda glutatyon salgılayarak Ni^{+2} absorpsiyonunu azaltmaktadır. Glutatyon, ağır metallere affinite göstererek

bağlanmayı sağlamaktadır. Mayalar, metilglioksal direnç geni taşımaktadırlar ve metalden zengin sıvı besiyerlerinde ekstrasellüler olarak metal-glutasyon komplekslerinin oluşumunu sağlamaktadırlar. Toksik metal bir komplekse bağlandığında direnç şekillenmektedir ve hücre membranından içeriye girememektedir [27,28].

Metallerin dış zara veya kılıf proteinlerine spesifik olmayan bir şekilde bağlanması da metalin geçirgen zardan içeri alınmaması ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca, bakterilerin doğal olarak bulundukları ekstrasellüler polisakkarit kısım metal iyonlarını biyolojik olarak tutmakta ve onları hücre bileşenleri ile etkileşiminden korumaktadır. Bu polisakkarit kısım metal iyonlarının tutunabileceği bölgeler de oluşturabilmektedir [27,28,30]. Ekstrasellüler olarak metal direnci gösteren bakterilerden bazıları, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas putida*, *Arthrobacter viscosus*'dur. Bu suşlar, koruyucu ekzopolisakkarit kısmı olmayan bakterilere göre iki kat daha fazla metal direnci göstermektedir. Deniz bakterisi *Vibrio alginolyticus*, Cu^{+2} değişiminde Cu^{+2} bağlayan ekstrasellüler proteinler sentezlemektedir [30].

1.1.6.2.1.5. Metallerin Daha Az Toksik Forma Dönüştürülmesi

Metallerin daha az toksik forma dönüştürülmesi genellikle hücre içinde ve enzimatik olarak gerçekleşmektedir. Bu tip direnç mekanizmasına gram negatif ve gram pozitif bakterilerde rastlanmaktadır. Aşağıda bugüne kadar indirgenme mekanizmaları belirlenmiş $(AsO_4)_3$, Hg^{+2} ve Cu^{+2} gibi metallerin mikroorganizmalarca daha az toksik forma dönüştürülmeleri açıklanmıştır [30].

E. coli ve *S. aureus*'taki arsenat direnci, dirençli hücreler tarafından arsenatın indirgenerek içeri alınmasıyla ilgilidir. Arsenat yapısı bakımından fosfatla $(PO_4)_3$ oldukça yakından ilgilidir. Metalin toksikliği bir biyoelement olan fosfor metabolizması ile karışmasının sonucudur [31].

Başka bir toksik ağır metal olan civa ise bütün ağır metaller arasında en toksik olan olarak bilinmektedir. Civanın mikroorganizmalara yararlı bir fonksiyonu

bulunmamaktadır. Yüksek konsantrasyonda civa, biosidal etki gösterirken, düşük konsantrasyonda bulunması da mutajenik etki göstermektedir [30-32].

Civaya direnç gösteren bakterilerde *mer* operonu bulunmaktadır. Operon, hem Hg^{+2} 'yi detoksifikiye etmekte hem de taşımaktadır. Kendi kendini düzenleyebilen operon, Hg^{+2} yokluğunda transkripsiyonu azaltan düzenleyici bir protein kodlamaktadır. Aynı zamanda operondaki genler periplazmik bağlanma proteinleri ve membrana bağlı taşıma proteinlerini de kodlamaktadır. Periplazmik bağlanma proteinleri Hg^{+2} 'yi biriktirirken taşıma proteinleri bunları detoksifikasyon için sitoplazmaya götürmektedir [28,30].

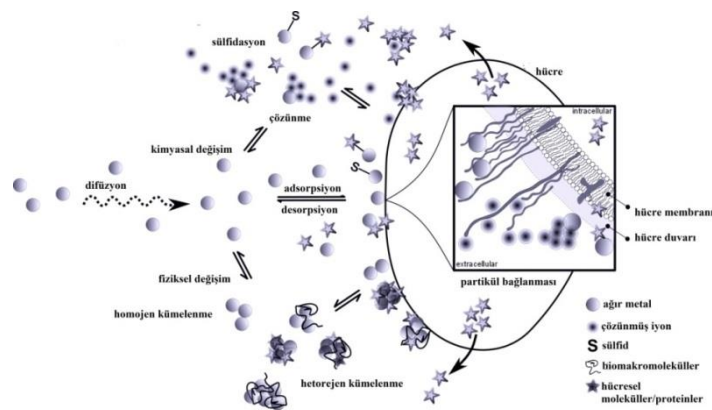
1.1.7. Biyosorpsiyon

Kontamine sulardan ağır metallerin kaldırılması için kullanılan teknikler; kimyasal çöktürme, iyon değişimi, ters osmoz, elektrodializ, ultrafiltrasyon gibi yöntemlerdir [24,25,33]. Ancak bu yöntemlerin yüksek maliyet gerektirmesi, enerjinin fazlaca harcanması, potansiyel metal uzaklaştırmalarının yetersiz olması gibi dezavantajları vardır [33].

Metal iyonlarının sulu ortamlardan giderilmesi üzerine farklı teknolojiler geliştirmek, günümüzde önemli bir araştırma konusudur. Bu konuda geliştirilen yöntemlerden biri de biyosorpsiyon yöntemidir. Su ve atık sulardan toksik ağır metallerin giderilmesinde mikrobiyal biyokütlelerin kullanılması var olan metotlara ve geleneksel adsorbentlere, düşük maliyeti ile yeni bir alternatif oluşturmaktadır. Biyosorpsiyon teknolojisinin en önemli avantajları atık sulardaki ağır metal konsantrasyonlarını çok düşük seviyelere indirgemekteki etkinliği ve bol miktarda kolayca üretilen, ekonomik biyosorbent materyallerinin kullanılmasıdır. Bu biyosorbentler metal iyonlarının giderilmesinde yüksek seçiciliğe sahiptirler. Ayrıca bu yöntem ile çok seyreltik sulardan bile kirleticiler etkili bir şekilde giderilebilmektedir. Biyosorpsiyon yönteminin diğer avantajları ise bu yöntemin yerinde uygulanabilen bir yöntem olması, çok özel dizaynlar ve endüstriyel işlemler gerektirmemesi ve birçok sistemle ekonomik bir şekilde birleştirilebilmesidir [33,40].

Biyokütleler ile (fungus, bakteri, alg vb.) yapılan adsorpsiyon işlemine biyosorpsiyon denir. Bu olay kompleksleşme, koordinasyon, şelat oluşturma iyon değişimi, adsorpsiyon, mikro çökeltme proseslerini içerebilir. Alg, mantar, bakteri ve mayalar gibi kolay elde edilebilir mikroorganizmaların, yüksek verimle seyreltik çözeltilerden ağır metalleri bağlayabildikleri rapor edilmiştir [34].

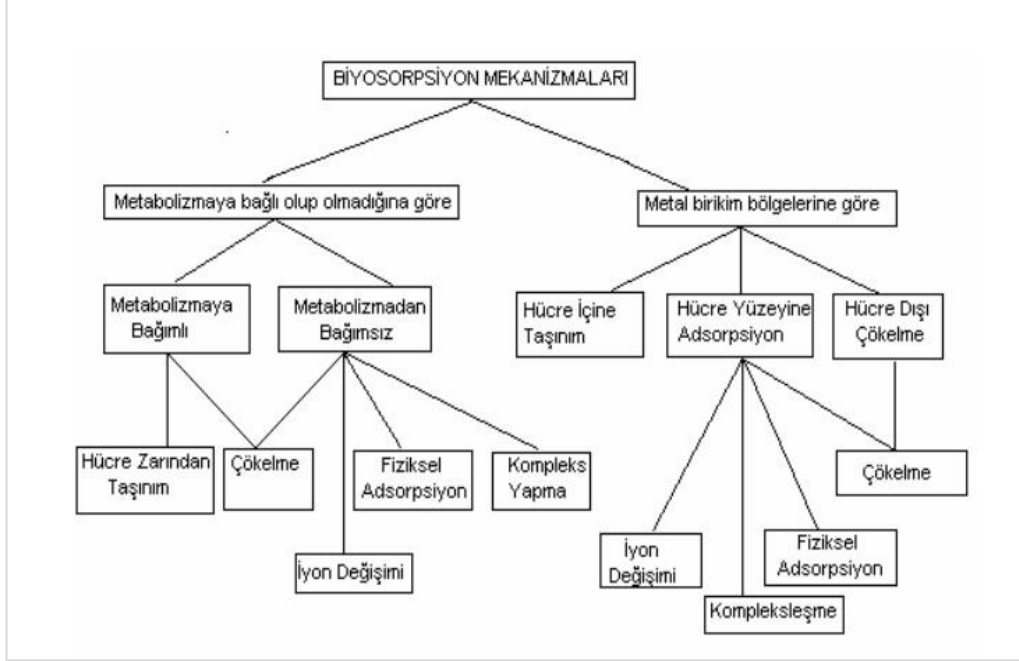
Biyosorpsiyon yeni bir teknolojidir. Bu teknolojiyle atık sulardan biyolojik malzemelerle ağır metallerin uzaklaştırılması gerçekleşmektedir [34]. Alg, bakteri ve mantarların potansiyel biyosorbent oldukları kanıtlanmıştır [35-37]. Mantar ve alglerle yapılan biyosorpsiyon çalışmaları, onların doğada elde edilebilirliği ve fermentasyon endüstrisi gibi değişik proseslerin atığı veya ürünü olduğu için bakterilerden daha fazla ilgi çekmektedir. Biyosorpsiyon aslında fiziksel ve kimyasal adsorpsiyon, iyon değişimi, koordinasyon, kompleksleşme, mikro çökeltme vb. gibi birçok pasif giderim proseslerini adlandırmakta kullanılan ortak bir terimdir. Biyosorpsiyon fizikokimyasal bir olay olduğu için tersinir bir reaksiyondur ve ayrıca yaşamayan biyokütlelerde bile meydana gelir. Biyokütle karboksilik, fosfat ve amino grupları gibi belirli asidik grupları içeren çeşitli biyopolimerlerin bir araya gelmiş şeklidir. Bundan dolayı, biyosorpsiyon metal iyonlarının biyokütle üzerindeki asidik sitelere bağlanma reaksiyonları olarak açıklanabilir. Biyokütlelerin güçlü metal bağlama yeteneği toksik ağır metallerle kirletilmiş çevreyi temizlemede ve atık suların iyileştirilmesinde çok büyük ilgi çekmektedir [38].



Şekil 1.4. Metal-mikroorganizma etkileşimi [39]

1.1.7.1. Biyosorpsiyon Mekanizmaları

Mikroorganizmaların hücre yapılarının çok kompleks oluşu, hücrelerin metalleri bağlamasının birçok yolu olduğunu düşündürmektedir. Biyosorpsiyon işleminin mekanizması henüz tam olarak anlaşılammıştır, fakat farklı açılardan değerlendirmeler ile aşağıdaki gibi bir sınıflandırma yapılmıştır [38,41].



Şekil 1.5. Biyosorpsiyon mekanizmaları [40]

Hücre zarından içeri taşınım olayı hücre metabolizması ile ilgilidir. Canlı hücrelerde çalışırken bazı toksik elementlerin yüksek konsantrasyonda olması, biyosorpsiyon araştırmalarına imkan vermemektedir. Bu nedenle, bu çeşit biyosorpsiyonun mekanizması hakkında yeterli bilgi bulunamamaktadır. Mikrobiyal hücre zarlarındaki ağır metal iyonları taşınımı hücre metabolizmasında gerekli olan potasyum, magnezyum ve sodyum gibi iyonların taşınma mekanizmasıyla aynı olabilir. Metal taşınma sistemi, aynı yüklü ve iyonik yarıçaplı ağır metal iyonlarının varlığında, karışık bir durum arz eder. Bu mekanizma genellikle metabolik aktiviteye bağlı olmayan biyosorpsiyon olayıyla eş zamanlı olarak meydana gelmektedir. Literatürdeki birçok örnekte canlı organizmalar vasıtasıyla yapılan biyosorpsiyon, iki temel basamağı kapsamaktadır. Bunlardan birincisi metabolizmaya bağlı olmadan

hücre duvarlarına bağlanma ve ikincisi de metabolizmaya bağlı olarak metal iyonlarının hücre zarından hücre içine taşınıp biriktirilmesidir [38].

Fiziksel adsorpsiyon olayında biyosorpsiyon, Van der Waals kuvvetlerinin ve diğer zayıf moleküller arası kuvvetlerinin (dipol-dipol gibi) varlığıyla gerçekleşir. Bir fungal biyokütle olan *Rhizopus arrhizus* ile toryum ve uranyumun biyosorpsiyonu üzerine yapılan bir çalışmada; bu metallerin biyosorpsiyonunun hücre duvarında yapı elemanı olarak bulunan kitin tarafından fiziksel bağlanma yoluyla sağlandığı tespit edilmiştir. Uranyum, kadmiyum, çinko, bakır ve kobalt gibi metallerin canlı olmayan alg, mantar ve maya biyokütleleri ile biyosorpsiyonunda, çözeltideki iyonlar ile hücre duvarları arasında elektrostatik etkileşimin etkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Elektrostatik etkileşimin, bakteri ve alglerle yapılan bakır biyosorpsiyonunda da etkili olduğu kanıtlanmıştır [38,41].

İyon değişimi mekanizması da şu şekilde yapılabilir. Mikroorganizmaların hücre duvarları, temel yapı bloku olarak polisakkaritleri içermektedir. Doğal polisakkaritlerin iyon değişimi özellikleri detaylı olarak çalışılmış ve iyice belirlenmiştir ki bivalent metal iyonları polisakkaritlerin karşı iyonları ile yer değiştirmektedir [38,40]. Örneğin, deniz alglerinin alginatları genellikle potasyum, sodyum, kalsiyum ve magnezyum gibi elementlerin doğal tuzlarından oluşmaktadır. Bu metalik iyonlar; kobalt, bakır, kadmiyum ve çinko gibi karşı iyonlarla yer değiştirebilmekte ve sonuç olarak metallerin bağlanması ve arıtımı sağlanmaktadır [38, 43].

Bir başka adsorpsiyon mekanizması olan çökelme hücre metabolizmasına bağlı olduğu gibi, ondan bağımsız da gerçekleşebilir. Birinci durumda genellikle çözeltideki metalin arıtımı, mikroorganizmaların aktif savunma sistemleri aracılığıyla olmaktadır. Çözeltide bir toksik metalin varlığı halinde, savunma sistemi onunla reaksiyona girerek, çökelme işlemini hızlandıran bazı bileşikler üretir. Bazı *Arthrobacter* ve *Pseudomonas* türleri ile çözeltiden kadmiyumu ayırma işleminin, detoksifikasyon yoluyla gerçekleştiği ve kadmiyumun hücre yüzeyi üzerine çöktüğü belirlenmiştir. Bu çökelme olayı, hücre metabolizmasına bağlı değildir. Belki hücre yüzeyi ile metal arasındaki kimyasal etkileşimin bir sonucu olabilir. Biyosorpsiyon

olayının mekanizması tek tip değildir. Aynı anda birden fazla mekanizmada meydana gelebilmektedir [38, 41]. Biyosorpsiyon çalışmalarında, ağır metal giderimini; metal iyonu konsantrasyonu, biyosorbent konsantrasyonu, pH, sıcaklık, karıştırma hızı ve kontakt zamanı direkt olarak etkilemektedir [44].

1.1.8. 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 sularındaki organik ve kimyasal kirleticilerin uygun bir katı yüzey üzerine tutularak giderilmesi işleminde de sıklıkla kullanılmaktadır [45].

1.1.8.1. 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 [46]. Sabit sıcaklıkta adsorban

tarafından adsorplanan madde miktarı ile denge basıncı veya konsantrasyonu arasındaki bağıntıya adsorpsiyon izotermi denir [47]. 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 [48]. Ağır metal iyonlarının biyosorbent yüzeyine bağlanması, adsorpsiyon izotermine uygunluk gösterir. Bunlardan en sık kullanılanları; Freundlich ve Langmuir izotermidir [46].

1.1.8.1.1. 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 [48]. Langmuir izoterminde 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 [48].

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 (ppm)

Langmuir adsorpsiyon izotermi linerize edilmiş şekli ile;

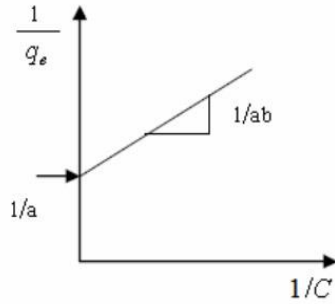
$$C/q_e = C/(X/M) = 1/a.b + C/ \quad (1.3)$$

veya

$$1/q_e = 1/(X/M) = 1/a + (1/a.b) (1/C) \quad (1.4)$$

denklemleri 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 [49].



Şekil 1.6. Langmuir izotermi [49]

Langmuir modelinden elde edilen a ve b değerlerinin büyüklüğü iyi bir biyosorpsiyona işaret etmektedir [49].

1.1.8.1.2. 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 [45, 50].

$$qe = Kf \cdot Ce^{1/n} \quad (1.5)$$

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

Kf : deneysel olarak belirlenen adsorbsiyonun kapasitesini gösteren sabit

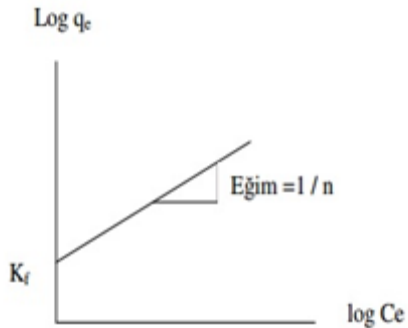
n : Adsorbsiyonun yoğunluğunu gösteren sabit (Freundlich izotermi sabiti)

Ce : Denge halindeki çözeltide adsorban (adsorbent) konsantrasyonu, (ppm veya mol/L)

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

$$\log qe = \log Kf + 1/n \log Ce \quad (1.6)$$

Böylece, $\log qe$ değerlerine karşı $\log Ce$ değerleri grafik üzerinde gösterildiğinde, eğer izoterm Freundlich izotermine uyuyorsa Şekil 1.7. gibi bir doğru elde edilir. Burada n ve Kf sabitleri doğrunun eğimi ve eksenini kesme noktalarıdır [45].



Şekil 1.7. Freundlich izotermi [45]

1.1.9. Adsorpsiyon Kinetiği

Adsorpsiyon kinetiği adsorban ve adsorbant arasındaki etkileşime ve sistem koşullarına bağlıdır. Adsorpsiyon prosesinde mekanizma ve reaksiyon hızı önemlidir. Kinetik analizinden katı alım hızı hesaplanabilir. Bunun formüle edilebilmesi için bir çok çalışma yapılmıştır. Lagergren (1898) oksalik asit ve malonik asidin odun kömürü ile adsorpsiyonunu formüle etmiştir. Lagergren Eşitliği katı maddenin kapasitesine dayanan sıvı-katı sistemin adsorpsiyonunu tarif eden ilk eşitliktir. Katının adsorpsiyon kapasitesi ve çözeltinin konsantrasyonuna dayanan kinetik eşitliğini ayırmak için Lagergren'in birinci dereceden eşitliği Pseudo-birinci mertebeden eşitlik tanımlanmıştır [47].

Daha önce Lagergren'in adsorpsiyon kinetik eşitliği uygulaması Trivedi tarafından kalsiyum silikat kullanılarak kloroformdan selüloz triasetat adsorpsiyonu için kullanılmıştır. Son otuz yılda kinetik eşitlik kirleticilerin adsorpsiyonunda sulu çözeltilerden metaller, boyalar ve organizmalar gibi maddelerin adsorpsiyonunda hesaplanmıştır. Weber-Morris Eşitliği, Pseudo-birinci-derece eşitliği, Pseudo-ikinci-derece eşitliği, Düzenlenmiş-ikinci-derece eşitliği ve Elovich eşitliği adsorpsiyon kinetiğini açıklamak üzere tanımlanmış eşitliklerdir. Ancak Düzenlenmiş-ikinci-derece eşitliği ve Elovich eşitliği daha çok gazların katı maddeler tarafından adsorpsiyonunda kullanılmaktadır [47].

1.1.9.1. Pseudo Birinci Derece Eşitliği

Sıvı-katı adsorpsiyon sistemlerinde katının adsorplama kapasitesi esas alan, Lagergren tarafından önerilmiş eşitliktir.

$$dq/dt=k_1(qe-qt) \quad (1.7)$$

Denklem, $t = 0$, $t = t$, $qt = 0$ ve $qe = qt$ sınır değerleri için integre edildiğinde:

$$\ln(qe-qt) = \ln qe - k_1t \quad (1.8)$$

şeklını alır.

Bu denklemde:

t : Zaman (dakika)

k_1 : Pseudo birinci derece kinetik sabiti (dak^{-1})

q_e : Denge halinde adsorplanan madde miktarı(mg/g)

q_t : Herhangi bir t anındaki adsorplanan madde miktarı (mg/g)

Grafik $\ln(q_e - q_t)$ ye karşı t değerleri alınarak çizilmekte ve k_1 ile q_e değerleri elde edilmektedir [47].

1.1.9.2. Pseudo İkinci Derece Eşitliği

Pseudo-ikinci-derece eşitliği, katı fazın adsorplama kapasitesini ölçmek için kullanılmaktadır ve bir hız kontrol adımı olarak kemisorpsiyon mekanizmasını tanımlamaktadır.

$$dq_t/dt = k_2.(q_e - q_t)^2 \quad (1.9)$$

t : Zaman (dak.)

k_2 : Pseudo ikinci derece kinetik sabiti (g/mg dak)

q_e : Denge halinde adsorplanan madde miktarı(mg/g)

q_t : Herhangi bir t anındaki adsorplanan madde miktarı(mg/g)

Denklem (16), $t_0 = 0$, $t = t$, $q = 0$ ve $q_e = q$ sınır değerleri için integre edildiğinde:

$$q_t = t/(1/k_2 q_e^2 + t/q_e) \quad (1.10)$$

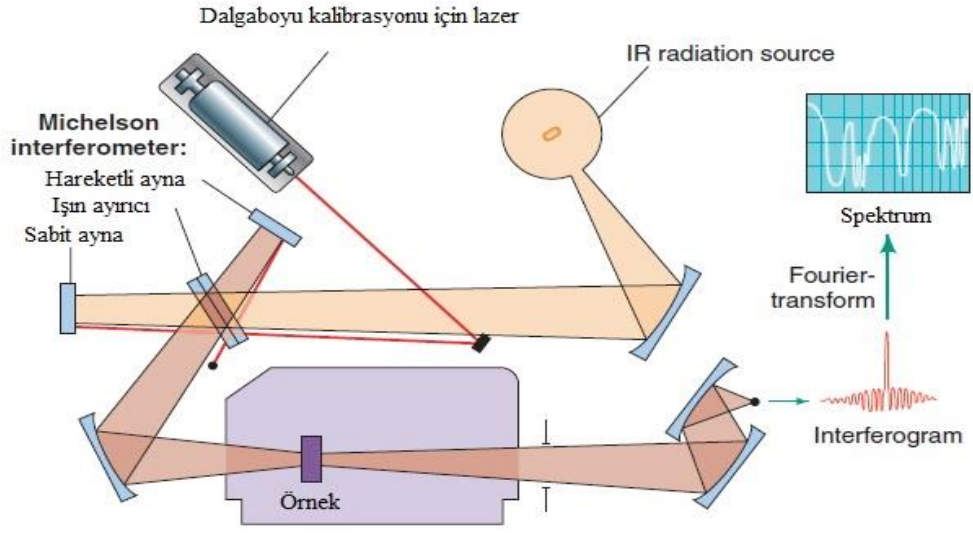
Denklem doğrusallaştırılırsa:

$$t/q_t = (1/k_2 q_e^2) + (1/q_e).t \quad (1.11)$$

şeklını alır [47].

1.1.10. Fourier Dönüşümlü 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 [51].



Şekil 1.8. FTIR çalışma prensibi [52]

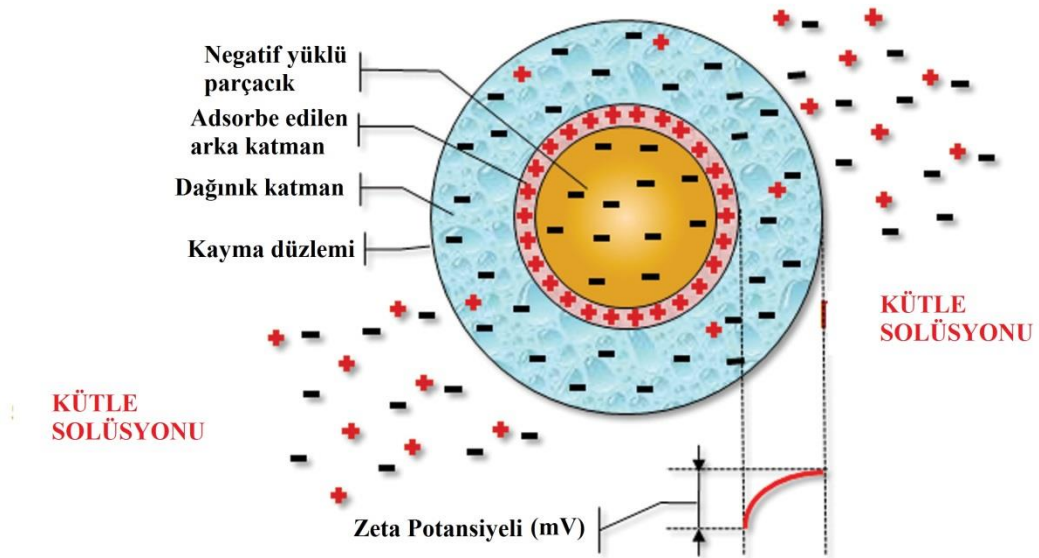
Çizelge 1.2. FTIR Kütüphanesi [52]

Gruplar	Frekans aralığı (cm ⁻¹)
A. Alkil	
C-H (stretching)	2853-2962
isopropil, -CH(CH ₂) ₂	1380-1385
tert-bütül, -C(CH ₃) ₃	1365-1370 ~1365
B. Alken	
C-H	3010-3095
C=C	1620-1680
R-CH=CH ₂	985-1000 905-920
R ₂ C=CH ₂	880-900
cis RCH-CHR	
trans-RCH=CHR	960-975
C. Alkil	
=C-H	~3300
C=C	2100-2260
D. Aromatik	
Ar-H	~3030
C=C	1450-1600
C-H	690-860
E. Alkol, Fenol ve Karboksilik Asitler	
O-H	
Alkoller, Fenoller (seyreltik çözelti)	3590-3650
Alkoller, Fenoller (hidrojen bağlı)	3200-3550
Karboksilik asitler (hidrojen bağlı)	2500-3000
F. Eter ve alkoller	
C-O-C	1020-1275
G. Aldehit, keton, ester, karboksilik asit ve amidler	
C=O	1630-1780
Aldehitler	1690-1740
Ketonlar	1680-1750
Esterler	1735-1750
Karboksilik asitler	1710-1780
Amidler	1630-1690

1.1.11. Zeta Potansiyeli

Zeta potansiyel partiküllerin yüzey yüklerinin oluşturduğu potansiyelin dolaylı olarak ölçümüdür [53]. Başka bir ifade ile partiküller arasındaki itme veya çekme değeri ölçümüdür. Ölçümü ve tanımı çift iyon tabakası teorisi 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 [53].

Sıvı çözelti içerisinde bulunan katı parçacıkların veya mineralin ölçülebilir 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 [54].



Şekil 1.9. Zeta potansiyeli [54]

1.1.12. Bakteriyel İdentifikasyon

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. 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 [55].

1.1.12.1. Geleneksel Teknikler

Saf kültürlerin izolasyonu, morfolojik, metabolik ve biyokimyasal temellere dayanan geleneksel mikrobiyolojik teknikler, mikrobiyal çeşitlilik ile ilgili geniş bilgi vermektedir. Ancak bu teknikler, mikroorganizmaların ekosistemdeki rolünü algılamaya yönelik çalışmalarda tek başına yetersiz kalmaktadır. Çünkü bu yöntemlerin çoğu ya mikrobiyal aktiviteyi dolaylı yollardan ölçen yöntemlerdir ya da *ex-situ* tekniklerdir. Bu tekniklerle mikroorganizma grubu kendi yaşam ortamı dışında teşhis edilmektedir. Ayrıca, klasik yöntemlerde saf kültür elde etme aşamasında, mikroorganizmaların yaşam ortamları tam olarak temsil edilemediği için, ortamda istenmeyen başka türler oluşabilmektedir [56].

Ekosistemdeki bakteriyel çeşitliliğin fazlalığı göz önünde bulundurulduğunda, klasik yöntemlerle tespit edilen prokaryotik türlerin sayısı oldukça azdır ve bakteriyel

çeşitliliğe ait resmin tamamını tespit etmek oldukça zordur. Şimdiye kadar yaklaşık 7000 bakteri türü tespit edilmiştir. Fakat moleküler ve ekolojik tahminler bu sayının kat kat fazla olduğu görüşündedir [56,57]. Bununla birlikte, mikroorganizma çeşitliliğinin ve dağılımının belirlenmesinde, moleküler tekniklerin kullanılması kültürden bağımsız ve geniş aralıkta mikroorganizma türünün tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. Bu nedenle son yıllarda arıtma sistemlerinde hem arıtma verimini değerlendirmek hem de mikroorganizma gruplarındaki değişimi izleyebilmek için moleküler teknikler kullanılmaya başlanmıştır [58].

1.1.12.2. Moleküler Teknikler

Tüm bakterilerde ortak genler bulunması bilinen bir gerçektir ve bu genlerin bazı dizilerinde türden türe değişen kısımlar bulunur. 16S rRNA molekülü yaşayan tüm canlılarda bulunmaktadır ve evrim süreci boyunca korunmuştur. Bu özellik organizmaların karşılaştırılmasına, hatta aynı türdeki farklılaşmaların tespitine imkân vermektedir. Dahası gen dizilimi ile ilave istatistiki olarak ilgili verilerin elde edilmesi mümkün olabilmektedir [55].

RNA 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 [59].

Çizelge 1.3. Mikrobiyal çeşitliliği belirlemede kullanılan teknikler ve kıyaslamalar
[55]

Teknik	Avantajları	Kısıtlamaları	Kullanım Örnekleri
Çoğaltılmış rRNA kesim analizi	Kültürden bağımsız Geniş bir aralıktaki mikroorganizmalar için uygun bir analiz yöntemidir.	DNA ekstraksiyonu ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) saptamaları Sayısal değildir.	Aktif çamurda mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesi
Denatürleyici kademeli jel elektroforezi (DGGE)	Kültürden bağımsız Geniş bir aralıktaki mikroorganizmalar için uygun bir analiz yöntemidir. rRNA gen dizilimi heterojenliğinin kullanımı	DNA ekstraksiyonu ve PZR saptamaları Sayısal değildir Kısa hedef dizilemelerinden dolayı özgünlük sorunu	Mikrobiyal komünite kompozisyonu Populasyon değişimi
Uçtan kesilmiş parça uzunluğu polimorfizmi (t-RFLP)	Kültürden bağımsız Geniş bir aralıktaki mikroorganizmalar için uygun bir analiz yöntemidir.	DNA ekstraksiyonu ve PZR saptamaları	Selüloz fabrikası atıksuyunda mikrobiyal komünite kompozisyonu
Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon (FISH)	Sayısal Kültür edilemeyenleri de içeren mikrobiyal hücrelerin doğrudan görsel olarak ayırt edilmesi	İnaktif hücreler tespit edilemeyebilir.	Evsel atık suyunda bakteriyel komünite kompozisyonu mikrobiyal komünite yapısının yerinde analizi

1.1.12.3. Yağ Asidi Metil Ester (FAME) Analizi

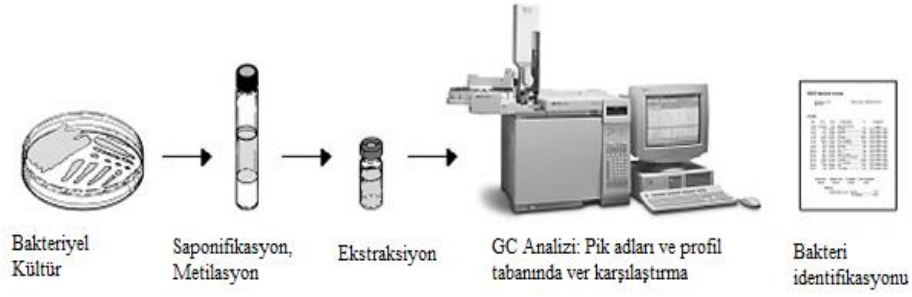
İlk defa 1980'li yıllarda MIDI firması tarafından ABD'de geliştirilerek hizmete sunulan bilgisayar kontrollü bir gaz kromatografi sistemi yardımı ile kültüre alınabilen her türlü mikroorganizmanın tanısında kullanılabilen Mikrobiyal Tanı Sistemi (Microbial Identification System, MIDI Sherlock Delawaore, USA) geliştirilmiştir [60].

Yağ asidi profillerindeki farklılıklar genetiksel akrabalıkların dolaylı bir göstergesi olup; bu profiller kullanılarak mikroorganizmaların tür düzeyinde tanımlanmasında kullanılmaktadır [61]. Mikroorganizmalarda yağ asitleri hücre membranındaki lipitlerde bulunurlar. Bu yağ asitleri gram negatiflerde lipopolisakkaritlerin lipid A

bileşigi olarak, gram pozitiflerde ise lipoteikoik asit olarak bulunur. Bakterilerin hücre membranında ökaryotlardan farklı olarak kendilerine özgü yağ asitlerine sahiptirler. Gram pozitif bakteride yağ asitleri, dallı zincirli yapıdadır. Gram negatif bakterilerde ise düz zincirli yapı şeklindedir. Gram negatif bakteriler gram pozitif bakterilere göre daha çok sayıda karbon içeren yağ asidi içerirler [61].

24-48 saat inkübe edilen örnekler gerekli miktarda kültürden alınır ve sodyum hidroksit-metanol karışımı ile muamele edilir. Bu muamele ile canlı hücreler parçalanarak yağ asitlerinin serbest kalması sağlanır (saponifikasyon). İkinci aşamada HCl-metanol karışımı ile örnek muamele edilir. Bu durum yağ asitlerine yüksek sıcaklıkta buharlaşma özelliği vermektedir (metilasyon). Üçüncü aşamada, oluşan yağ asidi metil esterlerine hekzan ve metil terbütül eterden oluşan solüsyonla ekstrakte edilir (ekstraksiyon). Son aşamada sodyum hidroksit çözeltisi ile ekstrakt yıkanıp daha saf hale getirildikten sonra gaz kromatografisi için GLC tüplerine aktarılır (yıkama). Örneklerin değerlendirilmesi MIS ile yapılır. Sistem, alev iyonizasyon dedektörü, kapiler silikon kolon, otomatik örnekleyici, entegratör, bilgisayar ve yazıcıdan oluşur [62].

Yağ asitleri ile bakterilerin tanılanması sistemi ile bakteriyel organizmalar alt tür düzeyinde bile tanılabilmekte 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 klasik yöntemlerden pahalı olsa da özellikle zaman açısından çok uygun bir tanı yöntemi olduğu düşünülmektedir [65]. Ayrıca örneklerin hazırlanması yaklaşık 1 saat sürmekte ve aynı gün içerisinde sonuç alınabilmektedir [64]. Ancak yağ asidi analizinin enstrümantasyonu diğer analizlere nazaran maliyetli ve komplekstir ve kimi zaman doğru sonuç vermeyebilir [63,64].

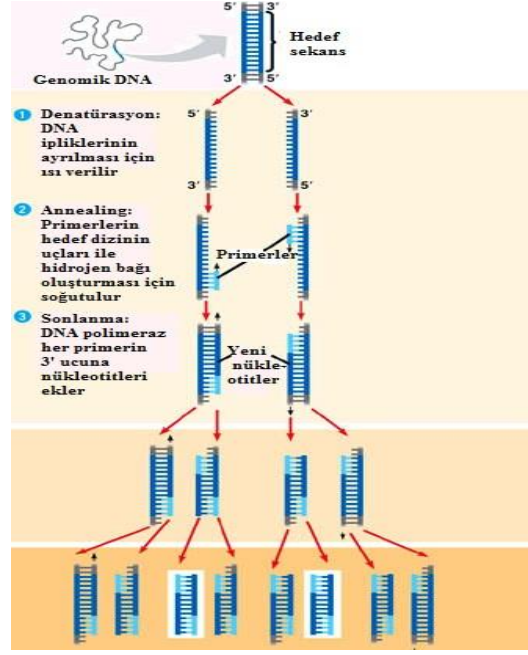


Şekil 1.10. FAME Analizi [65]

1.1.12.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Belirli bir nükleik asit dizisinin *in vitro* şartlarda, enzimatik olarak çoğaltılması işlemi olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ilk kez 1983 yılında Kary Mullis tarafından tanımlanmıştır. Moleküler yöntemlerden en geniş kullanım alanına sahip olan bu yöntem tek bir nükleik asidi bile gösterebilecek kadar güçlü bir çoğaltma yöntemidir. Özgül primerler kullanılarak hedef DNA'nın çoğaltılması esasına dayanmaktadır. PZR için, belirlenen nükleik asit kısmının her bir zincirinin 3' ucuna tutunacak ve 5' yönünde uzayacak iki kısa nükleotid dizisi (primer), uzamayı sağlayacak olan DNA polimeraz enzimi, yeni zincirlerin yapısında yer alacak oligonükleotidler ve reaksiyon için gerekli tuzu içeren tampon solüsyonlara ihtiyaç vardır [66].

PZR ile bir hedef DNA parçasının milyonlarcasının çoğaltımı mümkün olmaktadır. Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı olan, 18-20 baz uzunluğunda bir çift sentetik oligonükleotid primer kullanılarak, bu iki primer ile sınırlandırılan bölgenin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır. PZR'nin en önemli özelliği çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamasıdır [67].



Şekil 1.11. PZR döngüsü [66]

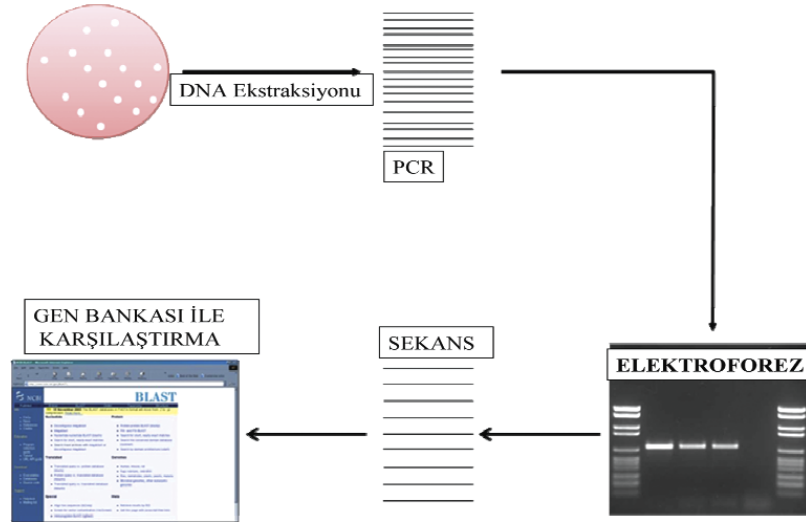
1.1.12.5. 16S rRNA Dizi Analizi

Ribozomal RNA'lar, mükemmel evrimsel kronometreler olmalarını sağlayan çeşitli özelliklere sahiptirler. Ribozomal RNA'lar oldukça büyük, işlevsel olarak sabit, evrensel olarak yaygın moleküller olup, tüm hücrelerde nükleotid dizisinin korunduğu çok sayıda bölge içerirler. Prokaryotlarda büyüklükleri; 5S, 16S ve 23S olan 3 çeşit ribozomal RNA molekülü vardır [68]. Son yıllarda bakterilerin moleküler yöntemlerle identifikasyonunda hedef olarak seçilen önemli gen bölgelerinden biri 16S rRNA genidir. 16S rRNA gen dizisi, tüm canlılarda yüksek derecede korunmuşluk göstermektedir. Genomda bu rRNA bölgesi hem bakteriye özgü çok iyi saklanmış dizileri içermekte, hem de türe göre değişken olan dizileri barındırmaktadır. Bu değişken diziler genellikle araştırmacılar tarafından heterojen fenotipe sahip veya konvensiyonel bakteriyolojik testlerle kültürü zor olan bakterilerin PZR ile tanısı için primer bölgelerinin tasarlanmasında kullanılmaktadır [68]. Bu değişken dizilerin PZR ile çoğaltılması sayesinde tür tayini mümkün olabilmektedir. 16S rRNA'yı kodlayan gen dizisinin özellikle bakteriler arasındaki

akrabalık ilişkilerinin çıkarılmasında kullanımı yaygınlaşmıştır. Bu evrensel molekülün taşıdığı nükleotid dizileri, filogenetik gruplar arasında gösterdiği benzerliklere göre, evrimsel yakınlığın yorumlanmasında etkin rol oynamaktadır. Günümüzde bilinmeyen bir bakterinin cins hatta tür seviyesine kadar tanımlanabilmesi 16S rRNA geni yardımıyla mümkün olabilmektedir [68].

16S rRNA dizisi bakteriler arasındaki filogenetik ilişkiyi açıklamada kullanılan güçlü bir araçtır. rRNA'ların filogenetik bir araç olarak kullanımına 1970'lerde Illinois Üniversitesi'nden Carl Woese öncülük etmiştir ve bu yöntem günümüzde tüm biyolojide yaygın olarak kullanılmaktadır [69]. Sayılan avantajlarının yanı sıra bu metodun bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Yöntem zaman alıcı ve emek gerektirir. DNA ekstraksiyonu esnasında sert ve katı örneklerle çalışırken problem yaratabilir. Tüm mikroorganizmaların belirlenebilmesi için taranması gereken klon sayısı büyük olmalıdır. Son olarak da kantitatif bir sonuç vermez [70].

Sekans analizi, etken DNA'nın belirli bir bölgesinin nükleotid dizilerinin saptanmasında geliştirilen bir tekniktir. DNA dizi analizi, bir ucu aynı olan ve bir nükleotid farkı ile uzunlukları değişen oligonükleotidleri ayırabilme tekniğine dayanır [71]. Bir oligonükleotidi dizilemek için iki farklı yöntem geliştirilmiştir. Sanger ve arkadaşlarının [72] geliştirdikleri yöntemde, DNA nükleotid dizisinin belirlenmesi için enzimatik teknikler ve sentezin 2,3-dideoksinükleotidtrifosfatlar (ddNTP) kullanılarak belli bazlarda sonlandırılması prensibine dayanır. Buna karşılık Maxam ve Gilbert [73] ise kimyasal bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu teknikte kullanılan kimyasal maddeler oldukça toksik maddelerdir. Ayırım gücü yüksek, fakat uygulama kolaylığı olmayan ve değerlendirme aşaması son derece uzun bir yöntemdir. DNA dizi analizi ile birçok organizmanın genlerinin yapısı ve organizasyonu hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir [71].



Şekil 1.12. Bakterilerin 16S rRNA sekansına dayalı moleküler identifikasyonu [72]

1.2. Çalışmanın Amacı

Bu tezin amacı daha önce laboratuvarımızca yapılan çalışmalar sonucu [74,75] Kırıkkale-Kızılırmak'tan izole edilen nikel, kobalt ve kalay dirençli bakterilerin moleküler teknikler kullanılarak tanımlanması ve biyosorpsiyon kapasitelerinin belirlenmesidir. Nikel, kobalt ve kalaya direnç gösteren suşlar 16S rRNA ve yağ asidi analizleri (FAME) kullanılarak tanımlamaları yapılmış, biyosorpsiyon yeteneği gösteren suşların bu yetenekleri izoterm, kinetik, FTIR ve zeta potansiyel ölçümü çalışmaları yapılarak değerlendirilmiştir.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan besiyerleri

2.1.1.1. Nutrient Agar

Stok kültürlerin saklanması, koloni oluşturan birim ve elektron mikroskopundan görüntü almak için kullanılmıştır. Gerekli miktarda hazırlanan besiyeri kullanılmadan önce 121°C'de 1 atm basınç altında otoklavda steril edilmiştir.

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Pepton	5.0 g/L
Et özütü	5.0 g/L
Maya özütü	1.0 g/L
Agar	12.0 g/L

2.1.1.2. Nutrient Broth

İzole edilen bakterilerin büyüme eğrisi, yağ asidi analizi, koloni oluşturan birim, DNA izolasyonu ve biyosorpsiyon çalışmalarında kullanılmıştır. Gerekli miktarda hazırlanan besiyeri kullanılmadan önce 121°C'de 1 atm basınç altında otoklavda steril edilmiştir.

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Pepton	5.0 g/L
Et özütü	3.0 g/L

2.1.1.3. Trypticase Soy Broth Agar

İzole edilen bakteriler yağ asidi analizi ile tanımlanması için kullanılmıştır. Gerekli miktarda hazırlanan besiyeri 121°C'de 1 atm basınç altında otoklavda steril edilmiştir.

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Trypticase Soy Broth	30.0 g/L
Agar	15.0 g/L

2.1.1.4. Plate Count Agar

Bakteri sayımında kullanılan inhibitör veya indikatör içermeyen genel katı besiyeridir. Koloni oluşturan birim (Kob) sayımı için alınan örneklerin inkübasyonunda kullanılmıştır. Gerekli miktarda besiyeri 121°C'de 1 atm basınç altında otoklavda steril edilmiştir.

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Tripton	5.0 g/L
Maya özütü	2.5 g/L
Glukoz	1.0 g/L
Agar	12.0 g/L

2.1.2. Kullanılan Kimyasal ve Tamponlar

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 Nikel Sülfat Çözeltisi (NiSO₄7H₂O)

3.286 g NiSO₄7H₂O tartılarak 25 mL distile suda çözülmüştür. Hazırlanan çözelti 0.2 µm'luk filtre ile steril edilmiştir.

2.1.2.1.2. 0.5 M Kobalt Nitrat Çözeltisi (CoNO₃6H₂O)

3.638 g CoNO₃6H₂O tartılarak 25 mL distile suda çözülmüştür. Hazırlanan çözelti 0.2 µm'luk filtre ile steril edilmiştir.

2.1.2.1.3. 0.5 M Kalay Klorür Çözeltisi (SnCl₂2H₂O)

2.831 g SnCl₂2H₂O tartılarak 25 mL distile suda çözülmüştür. Hazırlanan çözelti 0.2 µm'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)

Toplam hacim 250 mL olacak şekilde distile suyla tamamlanmıştır (pH 8.0).

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Tris	0.3 g
EDTA	0.008 g

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

10 g SDS tartılarak 100 mL distile suda çözülmüştür.

2.1.2.2.1.3. Proteinaz-K'nın Hazırlanması (10 mL)

0.0384 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 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

Toplam hacim 1000 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanmıştır.

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Tris	242 g
Na ₂ EDTA2H ₂ O	37.2 g
Glasiyel Asetikasit	57.1 mL

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	Tm (°C)	Referans
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Öbakteriyel, düz	48	Frank ve diğ. [76]
1492R	ACCTTGTTACGACTT	Üniversal, ters	43	

2.1.2.4. Yağ Asit 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

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

2.2. Yöntem

2.2.1. Çalışma Alanı

Türkiye topraklarından doğarak yine Türkiye topraklarından denize dökülen en uzun akarsudur. Adını akarsu yatağının tabanında bulunan 3. zaman ortalarında çökelmiş kırmızı renkteki kumlu-killi tortudan alır. Uzunluğu 1355 km'dir. Nehir, İç Anadolu'nun en doğusundaki Sivas ilinde Kızıldağ'ın güney yamaçlarından yaklaşık 39.8° kuzey 38.8° doğu noktasından doğar, ilk önce batı ve güney batıya 38.7° kuzey 34.8° doğuya kadar akar, daha sonra yay şeklinde biçimlenir. İlk batıya, daha sonra kuzeydoğudaki Tuz Gölü'nü geçerek kuzeybatıya akar. Daha sonra kuzey ve kuzeydoğuya yönelir. Burada Delice Irmağı ile e 40.47° doğu 34.14° batı noktasında birleşir. Sonra zigzaglar çizerek kuzeybatıya akar. 41.10° doğu 34.42° batıda Devrez Nehri ile birlikte akar ve kuzeydoğuya doğru döner. Sonuçta Karadeniz'e 41.72° kuzey 35.95° doğu noktasında boşalır. Sırasıyla 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 [77].

Kızılırmak Nehri Türkiye'nin en uzun akarsuyu olduğundan ülkemiz açısından çok önemli bir su kaynağıdır. Özellikle geçtiği illerde veya yakın illerde hem içme suyu, hem sulama hem de enerji üretimi açısından hayati öneme sahiptir. Günümüzde kuraklık ve küresel ısınma tehlikesinin gözle görülür derecede arttığı düşünülürse su kaynaklarının kullanımı, işletilmesi gibi konular ön plana çıkmıştır [77].

2.2.2. Örneklerin Toplanması

Kırıkkale-Kızılırmak üzerinde endüstriyel kuruluşlara yakın olarak belirlenen ve Çizelge 2.1’de gösterilen 12 istasyondan 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 - Kıybağı 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



Şekil 2.1. Örneklerin toplandığı bölgelerin uydu fotoğrafı [78]

2.2.3. Nikel, Kobalt ve Kalay Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve Kodlanması

Ni, Co ve Sn ağır metallerini tolere eden suşların seçimi için ağır metal içeren ortam kullanılmıştır. 12 bölgeden alınan su örneklerinden Ni, Co ve Sn dirençli suşları seçmek için literatürde belirtilen konsantrasyonlarda ayrı ayrı NiSO_4 , CoNO_3 ve SnCl_2 ağır metalleri içeren nutrient agar ortamları hazırlanmıştır. Bu ortamlara her bölgeden alınan su örnekleri seyreltme yapılarak ekilmiştir. Sırasıyla 30°C , 37°C ve 30°C 'de 48 saat inkübe edilen örneklerden üreme olan Ni, Co ve Sn dirençli farklı koloniler seçilerek saflaştırma işlemi yapılmıştır.

2.2.4. İzolatların Morfolojik Özelliklerinin Saptanması

Ni, Co ve Sn dirençli saf kültürlerin her biri ayrı ayrı dirençli olduğu metali içeren ve içermeyen ortamlarda gerekli üreme sıcaklığında 24-48 saat inkübe edildikten sonra PBS ile fiksasyonu yapılarak elektron mikroskopunda altında incelenerek metal içeren ve içermeyen ortamlardaki morfolojik özellikleri incelenerek kıyaslama yapılmıştır.

2.2.5. Maksimum Tolere Edilebilen Metal Konsantrasyon (MTK) Değerlerinin Belirlenmesi

Ni, Co ve Sn ağır metallerine dirençli suşların MTK değerleri, nutrient agar ortamına giderek artan konsantrasyonlarda Ni için NiSO₄, Co için CoNO₃ ve Sn için SnCl₂ eklenerek saptanmıştır. Gerekli sıcaklıklarda inkübe edilmiştir ve üreme olan petrilerdeki kültürler daha yüksek konsantrasyondaki ayrı ayrı Ni, Co ve Sn metalleri bulunan ortamlara ekilmiştir. Bu işlem üreme görülmeyinceye kadar tekrarlanmıştır. Üremenin görüldüğü en yüksek konsantrasyon MTK değeri olarak belirlenmiştir.

2.2.6. Bakteri Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi

MTK değerleri belirlenen Ni, Co ve Sn metallerinin bulunduğu NB ortamında, kültürlerden 100 µL örnek alınarak, 100 mL NB içinde inoküle edilmiştir. Bu işlem belirlenen konsantrasyonlarda Ni, Co ve Sn metallerinin bulunduğu NB ortamları için de tekrarlanmıştır. Ni ve Sn içeren kültürler 30°C ve Co içeren kültür ise 37°C'de çalkalamalı olarak inkübe edilmiştir ve 0. saatten itibaren, OD₆₀₀ nm'de, her iki saatte bir spektrofotometre ile ölçüm değerleri alınarak üreme eğrisi çıkarılmıştır.

2.2.7. 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 yapıldı. Seyreltilmiş örnekler plate count agarlara ekilip bir gün beklenerek koloni oluşumu gözlemlendi ve sayıldı.

2.2.8. FAME Analizi

Seçilen Ni11, Co11 ve Sn11 suşlarının tüm yağ asit analizleri için gerekli olan tüm kimyasallar ve uygulama prosedürleri Sherlock tarafından tarif edilen metoda göre gerçekleştirilmiştir [79].

Örnekler nutrient agara dört bölgeden oluşan çizgi ekim yapılmış 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra üçüncü bölgede gelişen hücrelerden steril cam tüplere öze ile 40 mg tartılmıştır. İlk basamakta saponifikasyonla hücresel lipidlerin 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°C’lik su banyosunda 5 dakika tutulduktan sonra tekrar vortekslenmiş ve daha sonra tekrar 100°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°C’lik su banyosundan çıkarılan tüplere Solüsyon II’den 2 mL ilave edilmiş ve 5-10 saniye vortekslenmiş ve 80°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.

2.2.9. Kromozomal DNA İzolasyonu ve DNA Miktar Tayini

İzole edilen Ni, Co ve Sn dirençli bakterilerin kromozomal DNA izolasyonu Cutting ve Horn tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır [80]. 15 mL'lik 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.

2.2.10. 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' [76]; ve 1492 R primer: 5'-CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' [76] 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 cyclers da 30 döngü ile çoğaltılan örnekler sekans analizi yapılana kadar -20°C'de saklanacaktır [94].

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 (nükleaz içermeyen su) ile 50 µL'ye tamamlanmıştır. Techne TC-Plus marka otomatik termocyclers PZR amplifikasyonu amacıyla kullanılmıştır. Döngüler; 94°C'de 5 dakika denatürasyon, 30 döngü şeklinde 94°C'de 1 dakika, 55°C'de 1 dakika bağlanma basamağı, 72°C'de 1 dakika uzama ve bu döngüleri takiben 72°C'de 5 dakikalık bir inkübasyon süresinin tamamlanmasıyla gerçekleştirilmiştir [81].

2.2.11. PZR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi

%0.7'lik agaroz jel hazırlamak için 0.35 g agaroz tartılıp 50 mL 1x TBE 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 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 Blue 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.

2.2.12. DNA'nın Etidyum Bromür ile Boyanması

Elektroforez işlemi tamamlanınca jel elektroforez aparatından alınıp boyama kabına konulmuştur ve jel üzerine 0,5 µg/mL konsantrasyonda etidyum bromür boyama solüsyonu eklenerek 45 dakika boyanmıştır. Boyanın fazlası 1 mM MgSO₄ ile 15 dakika muamele edilerek geri alınmıştır. Jel daha sonra jel görüntüleme cihazı (Gel Logic 2200 Pro Imaging System, USA) kullanılarak bantların göreceli miktarlarını belirlemek için taranmıştır.

2.2.13. DNA Sekans Analizi

İzole edilen Ni11, Co11 ve Sn11 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.

2.2.14. Filogenetik Soy Ağaçlarının Oluşturulması

İzole edilen ağır metal 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.

2.2.15. Biyosorpsiyon Kapasitelerinin Değerlendirilmesi

Her bir suş için belirlenen MTK değerleri kadar metal içeren, Ni11 kodlu suş için 16, Co11 kodlu suş için 20, Sn11 kodlu suş için 21 tane sıvı besiyeri hazırlanmıştır. Besiyerlerine bir gecelik kültürlerden 100 µL konuldu ve 30°C ve 37°C sıcaklıklarda 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 ile ölçülerek bakterinin durağan faza kadar ki biyosorpsiyon yeteneği değerlendirilmiştir [47].

2.2.16. İzolatların Elektron Mikroskop Analizleri

Biyosorpsiyon kapasitesi gösteren Sn dirençli saf kültürün, kalay içeren ve içermeyen ortamlarda gerekli üreme sıcaklığında 24-48 saat inkübe edildikten sonra paraformaldehit ile fiksasyonu yapılarak örnekten bir miktar numune tutucu üzerine konularak altın kaplama yapılmıştır. Kaplama işleminden sonra elektron mikroskobu analizleri yapılmıştır.

2.2.17. 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 10, 20, 30, 40, 50, ve 60 ppm'lik konsantrasyonlarda metal içeren 25 mL'lik 6 adet flaska, kurutulan bakteriler, her bir flask için 25 mg olacak şekilde eklenmiştir. 120 dakika sonra flasklardan örnekler alınmıştır. 20 dakika, 5000 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatant ayrı bir tüpe alınarak besiyeri ortamından bakteri uzaklaştırılmıştır. Besiyeri ortamında kalan ağır metal miktarı atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile ölçülmüş ve izoterm eğrileri çizilmiştir [48].

2.2.18. Adsorpsiyon Kinetiği Çalışmaları

Kinetik parametreleri hesaplanırken Pseudo birinci derece eşitliği ve Pseudo ikinci derece eşitliğine uygunlukları araştırılmıştır. İçerisinde 60 ppm kalay bulunan 25 mL'lik 10 adet flaska kurutulan bakterilerden her bir flask için 25 mg olacak şekilde

eklenmiştir. 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120. dakikalarda flasklardan örnekler alınmıştır. 20 dakika, 5000 rpm’de santrifüj edildikten sonra süpernatant ayrı bir tüpe alınarak besiyeri ortamından bakteri uzaklaştırılmıştır. Besiyeri ortamında kalan ağır metal miktarı atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile ölçülmüş ve kinetik uygunluğu araştırılmıştır [47].

2.2.18. Bakterilerin FTIR Analizi ile 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 bir gece kurumaya bırakılmıştır. Sıvıdan tamamen ayrılan kuru bakterilerin analizi yapılarak fonksiyonel grupların değerlendirilmesi yapılmıştır [51].

2.2.19. Zeta Potansiyeli Ölçümü

Bir gecelik kültürlerden ependorf tüpe alınan bakteriler 14500 rpm’de 10 dakika santrifüjlenir. Besiyeri ortamdan uzaklaştırılır 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 yapıldıktan sonra değerlendirilmesi yapılmıştır [96].

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. Bakterilerin İzolasyonu

Laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalar sonucu Kırıkkale-Kızılırmak'tan nikel, kobalt ve kalay dirençli gösteren suşlar izole edilmiş ve suşlar dirençli oldukları metalleri ve izole edildikleri lokasyonu temsil edecek şekilde kodlanmıştır. Nikel dirençli suş Ni11, kobalt dirençli suş Co11 ve kalay dirençli suş Sn11 olarak kodlanmıştır.

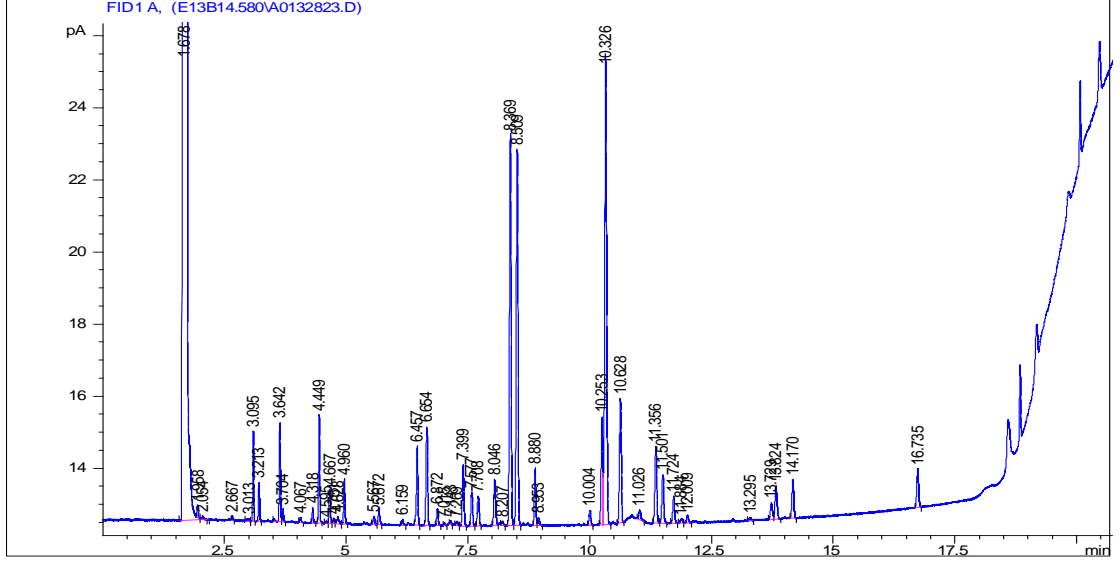
3.2. Ni11 Kodlu Suş

3.2.1. Ni11 Kodlu Suşun FAME Analizi ile İdentifikasyonu

Ni11 kodlu suşun içerdiği yağ asitleri yüzde oranları ile Çizelge 3.1'de ve GC kromotogramı Şekil 3.1'de verilmiştir. Ni11 kodlu suşun yağ asidi profilinin %16.26 C_{15:0} iso, %16.22 oranında C_{15:0} anteiso ve %5.42 oranında C_{16:0} ve içerdiği belirlenmiştir. %2.22 oranında yağ asidi ise tanımlanamamıştır. Yağ asidi profili temel alınarak yapılan veri tabanı analizi sonucunda Ni11 suşu cins düzeyinde dahi tespit edilememiştir.

Çizelge 3.1. Ni11 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	3.796E+8	0.026	----	7.010	SOLVENT	----	< min rt	
1.958	1062	0.025	----	7.555		----	< min rt	
2.054	463	0.036	----	7.743		----	< min rt	
2.667	354	0.022	----	8.936		----	< min rt	
3.013	378	0.038	1.282	9.610	10:0 ISO	0.16	ECL deviates	
3.095	6651	0.021	----	9.771		----		
3.213	3254	0.024	1.232	10.000	10:0	1.33	ECL deviates	Reference -0.001
3.642	9015	0.026	1.164	10.607	11:0 ISO	3.47	ECL deviates	Reference 0.000
3.704	1285	0.028	1.155	10.694	11:0 ANTEISO	0.49	ECL deviates -	Reference -0.001
4.067	558	0.034	1.112	11.158	10:0 2OH	0.21	ECL deviates	
4.318	1519	0.029	1.089	11.427	10:0 3OH	0.55	ECL deviates	
4.449	9847	0.026	----	11.567		----		
4.595	210	0.028	----	11.725		----		
4.667	3703	0.031	1.059	11.801	unknown 11.799	1.30	ECL deviates	
4.751	609	0.032	----	11.891		----		
4.828	1159	0.042	----	11.974		----		
4.960	4955	0.031	1.039	12.093	11:0 ISO 3OH	1.70	ECL deviates	
5.567	837	0.030	1.007	12.614	13:0 ISO	0.28	ECL deviates	Reference -0.002
5.672	1921	0.035	1.002	12.704	13:0 ANTEISO	0.64	ECL deviates	Reference 0.000
6.159	687	0.031	0.982	13.102	12:0 ISO 3OH	0.22	ECL deviates	
6.457	9484	0.032	----	13.318		----		
6.654	12695	0.036	0.966	13.460	12:0 3OH	4.06	ECL deviates	
6.872	2203	0.037	0.960	13.618	14:0 ISO	0.70	ECL deviates -	Reference -0.003
7.015	234	0.021	0.957	13.721	14:0 ANTEISO	0.07	ECL deviates	
7.143	354	0.024	----	13.813		----		
7.269	589	0.035	0.950	13.904	14:1 w5c	0.19	ECL deviates	
7.399	8080	0.036	0.947	13.999	14:0	2.53	ECL deviates -	Reference -0.003
7.577	4549	0.039	0.944	14.114	13:0 ISO 3OH	1.42	ECL deviates	
7.708	4089	0.039	0.941	14.198	13:0 2OH	1.27	ECL deviates	
8.046	6384	0.039	0.935	14.416	15:1 ISO F	1.98	ECL deviates	
8.207	411	0.026	0.933	14.520	15:1 ANTEISO	0.13	ECL deviates -	
8.369	52793	0.037	0.931	14.624	15:0 ISO	16.26	ECL deviates	Reference -0.001
8.509	52781	0.040	0.929	14.714	15:0 ANTEISO	16.22	ECL deviates	Reference -0.001
8.880	7250	0.036	0.924	14.953	unknown 14.959	2.22	ECL deviates -	
8.953	890	0.033	0.923	15.000	15:0	----	ECL deviates	
10.004	2142	0.038	0.915	15.627	16:0 ISO	0.65	ECL deviates	Reference -0.002
10.253	15709	0.040	0.913	15.775	16:1 w9c	4.75	ECL deviates	
10.326	70021	0.040	0.913	15.819	Sum In Feature 3	21.15	ECL deviates -	16:1 w7c/15 iso 2OH
10.628	17955	0.042	0.912	15.999	16:0	5.42	ECL deviates -	Reference -0.003
11.026	1742	0.052	0.910	16.229	15:0 2OH	0.52	ECL deviates	
11.356	11813	0.044	0.909	16.419	ISO 17:1 w9c	3.56	ECL deviates	
11.501	7358	0.043	0.909	16.502	15:0 3OH	2.21	ECL deviates -	
11.724	4250	0.044	0.909	16.630	17:0 ISO	1.28	ECL deviates	Reference -0.003
11.884	678	0.044	0.909	16.723	17:0 ANTEISO	0.20	ECL deviates	Reference -0.003
12.009	1194	0.044	0.909	16.795	17:1 w8c	0.36	ECL deviates	
13.295	394	0.038	0.910	17.526	16:0 3OH	0.12	ECL deviates	
13.729	2764	0.047	0.911	17.772	18:1 w9c	0.83	ECL deviates	
13.824	5220	0.047	0.911	17.825	18:1 w7c	1.57	ECL deviates	
14.170	5778	0.042	----	18.021		----		
16.735	5918	0.045	----	19.487		----		
----	70021	---	----	----	Summed Feature	21.15	16:1 w7c/15 iso	15:0 ISO



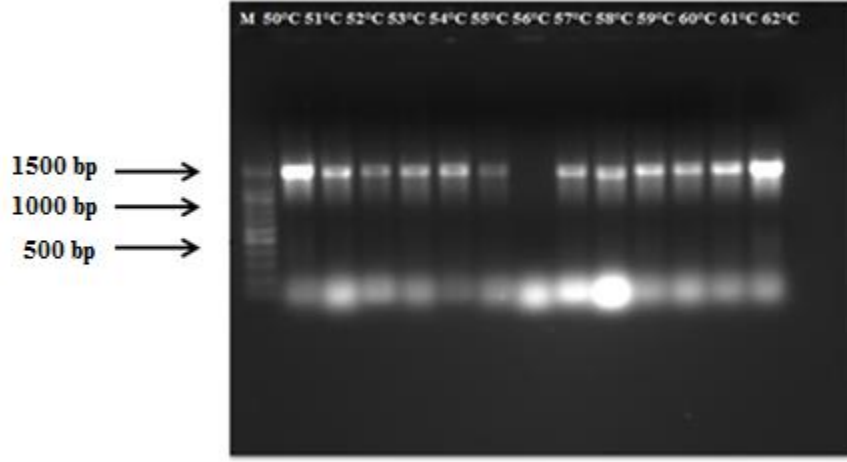
Şekil 3.1. Ni11 kodlu suş a ait GC kromotogramı (Agilent 6890N GC, USA cihazı çıktısı)

3.2.2. Ni11 Kodlu Suşun DNA İzolasyonu

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

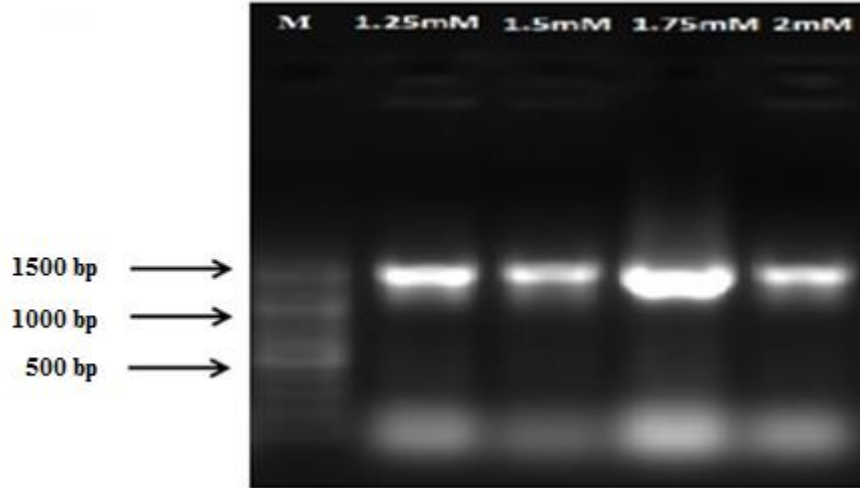
3.2.3. Ni11 Kodlu Suşun PZR Optimizasyonu

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 3.2'de Ni11 kodlu suş a ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcak 62°C olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.2. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında Ni11 kodlu suşa ait PZR ürünleri;
Marker (M)

Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik bağlanmanın giderilmesi için farklı $MgCl_2$ konsantrasyonları denenmiştir. Bu sırada diğer PZR şartları sabit tutulmuştur. Şekil 3.3'de Ni11 suşuna ait farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarındaki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu $MgCl_2$ konsantrasyonu 1.5 mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.3. Farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında Ni11 suşuna ait PZR ürünleri;
Marker(M)

3.2.4. Ni11 Kodlu Suşun 16S rRNA Sekans Analizi ile İdentifikasyonu

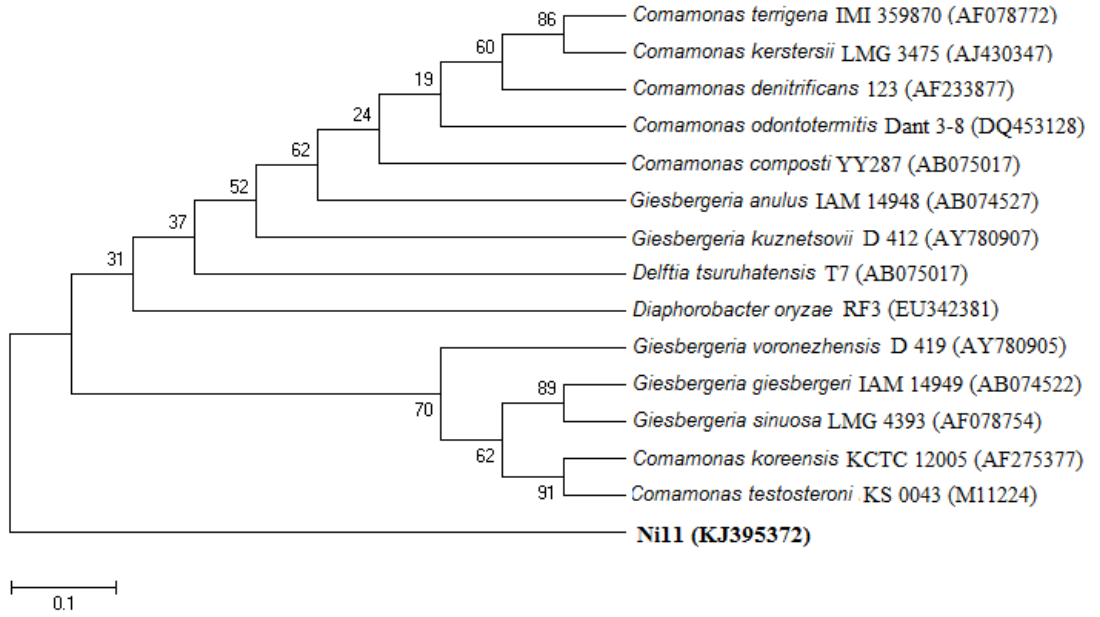
Ni11 kodlu suşun 16S rRNA sekans analiziyle elde edilen nükleotid dizileri BLAST programı doğrultusunda yayımlanan sekanslarla kıyaslanmıştır. Gen bankasında yapılan BLAST analizlerinde Ni11 suşunun %99 oranında *Comamonas testosteroni* ile homoloji gösterdiği saptanmıştır. *C. testosteroni* olarak tanımlanan Ni11 kodlu suşa ait 16S rRNA bölgesi ile gen bankasından alınan 15 bakteriye ait 16S rRNA nükleotid dizileri MEGA 5.2 programında yer alan Clustal W seçeneği kullanılarak hizalama yapılmıştır. Hizalama sonucu filogenetik analizler gerçekleştirilmiştir.

Filogeniyi oluştururken uzaklık matrisi (Distance Matrix) metodu kullanılmış ve bu veriler ışığında filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Bu çalışmada veriler MEGA 5.2 programına veri olarak yüklenerek Ni11 kodlu suşa en yakın homoloji gösteren türler arasındaki genetik varyasyon ve filogenetik ilişki belirlenmiştir. Nümerik analizlerin gerçekleştirilebilmesi için türler arası uzaklık/yakınlık matrisinin hesaplanması gerekmektedir. Bu amaçla türler arası uzaklık matrisi 16S rRNA bölgelerine göre hesaplanmıştır (Çizelge 3.2)

Çizelge 3.2. Ni11 kodlu suş için 16S rRNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme

Türler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1- Ni11 KJ395372															
2- <i>Comamonas testosteroni</i>	1.121														
3- <i>Comamonas odontotermitis</i>	1.152	0.028													
4- <i>Comamonas composti</i>	1.127	0.033	0.038												
5- <i>Comamonas koreensis</i>	1.122	0.038	0.032	0.044											
6- <i>Giesbergeria voronezhensis</i>	1.140	0.045	0.045	0.048	0.055										
7- <i>Delftia tsuruhatensis</i>	1.137	0.050	0.041	0.043	0.043	0.052									
8- <i>Comamonas denitrificans</i>	1.178	0.048	0.047	0.055	0.049	0.066	0.069								
9- <i>Giesbergeria giesbergi</i>	1.127	0.049	0.053	0.037	0.053	0.016	0.052	0.070							
10- <i>Comamonas terrigena</i>	1.206	0.046	0.038	0.038	0.049	0.053	0.066	0.052	0.047						
11- <i>Giesbergeria sinusa</i>	1.122	0.048	0.052	0.036	0.052	0.017	0.051	0.069	0.001	0.046					
12- <i>Giesbergeria kuznetsovii</i>	1.131	0.050	0.052	0.038	0.054	0.018	0.047	0.069	0.010	0.053	0.011				
13- <i>Giesbergeria anulus</i>	1.132	0.050	0.052	0.038	0.054	0.018	0.047	0.069	0.010	0.053	0.011	0.000			
14- <i>Diaphorobacter oryzae</i>	1.129	0.051	0.039	0.048	0.051	0.044	0.044	0.064	0.045	0.061	0.044	0.039	0.039		
15- <i>Comamonas kerstersii</i>	1.185	0.036	0.030	0.043	0.050	0.045	0.059	0.044	0.041	0.026	0.040	0.045	0.045	0.051	

16S rRNA bölgelerine göre sıralanan dizilerin Mega 5.2 programında uzaklık matrisine dayalı olarak neighbour-joining tree oluşturulmuştur (Şekil 3.4). Oluşturulan soy ağacının doğruluğunu (ağacın güvenilirliğini) istatistiksel olarak belirlemek amacıyla 1000 tekrarlı bootstrap (seç-bağla) analizi yapılmıştır. Suşların soy ağacında birbirlerine olan uzaklığı evrimsel akrabalıklarını göstermektedir. Buna göre Ni11 kodlu suş evrimsel açıdan *Comamonas testosteroni* ile yakın akraba olduğu görülmüştür.



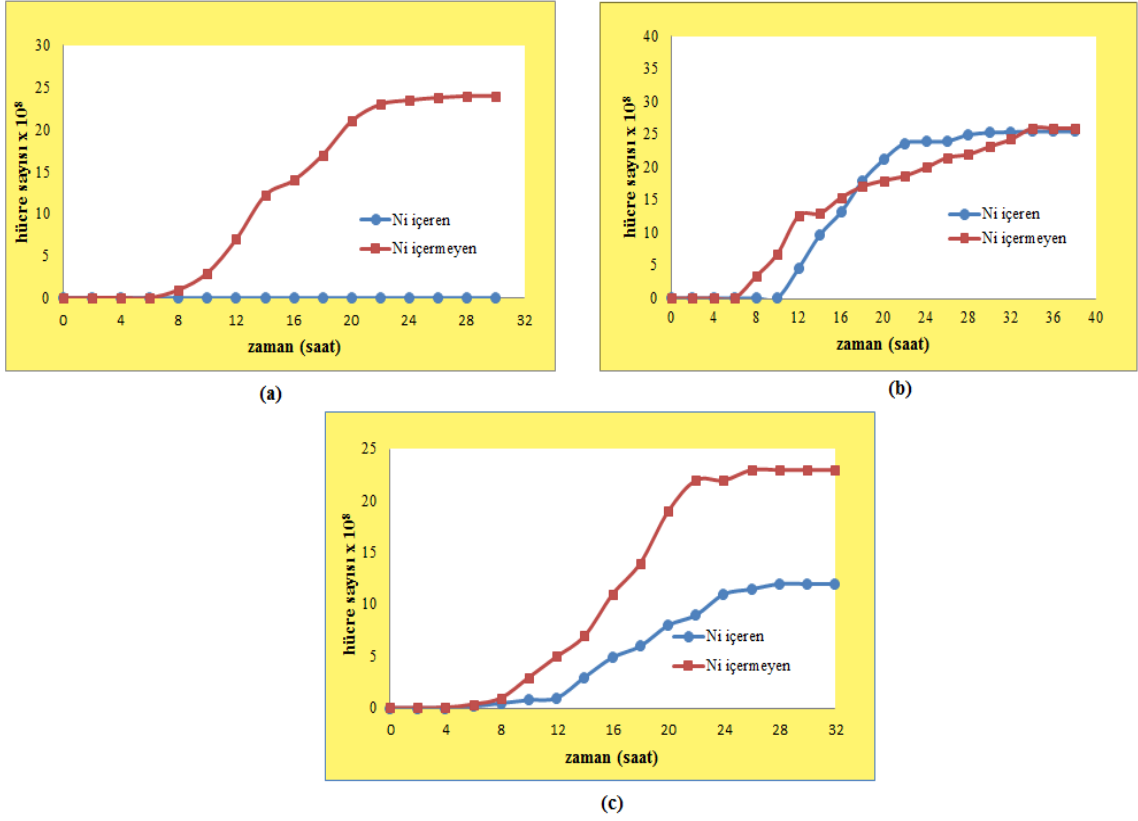
Şekil 3.4. Ni11 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.1; nükleotidler arasındaki farkı göstermektedir.)

3.2.5. *Comamonas testosteroni*'nin Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi

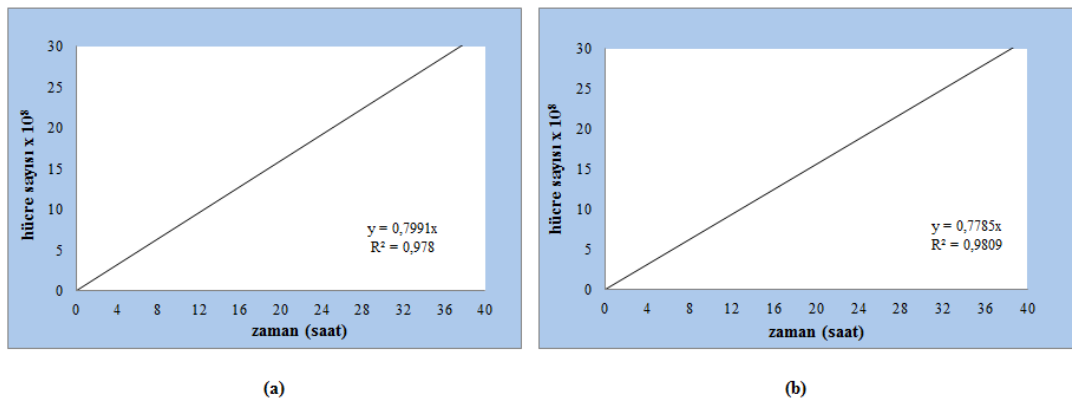
İzole edilen bakterilerin uygun kültür şartlarını belirleme amacıyla MTK değerleri belirlendikten sonra farklı pH'larda üreme eğrileri çıkarılmıştır.

C. testosteroni'nin optimum üreme koşulların belirlenmesi büyüme eğrileri oluşturulmuş ve *C. testosteroni* için optimum pH'nın 7 olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.5). *C. testosteroni* pH 7'de 38 saatlik bir inkübasyon sonrasında nikel içeren ortamda 25.5×10^8 , nikel içermeyen ortamda ise 26×10^8 hücre sayısına ulaştığı

gözlemlenmiştir. pH 7’de nikel varlığında, hücre sayısı metallsiz ortama göre %2.5 oranında azalma gözlenmiştir (Şekil 3.5). pH 7’deki hücre sayısına bağlı standart eğrileri Şekil 3.6’da verilmiştir.



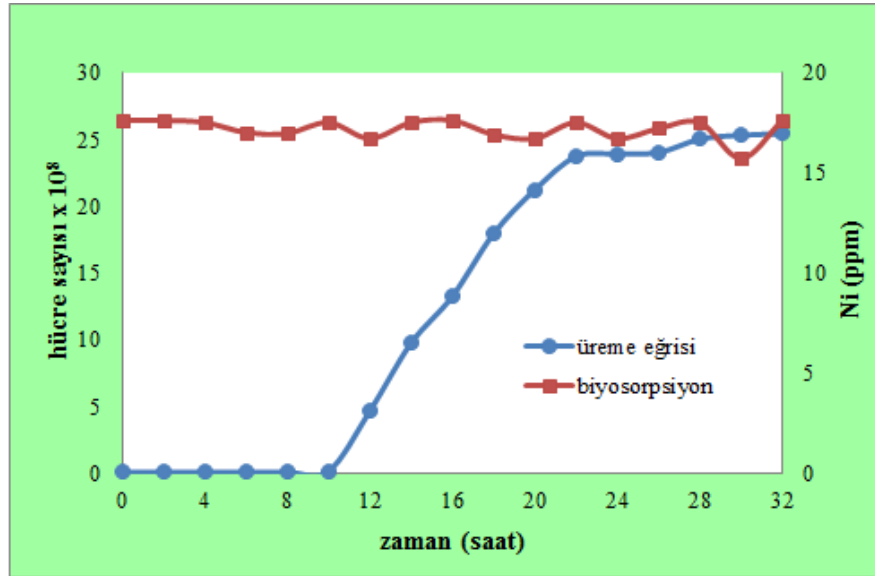
Şekil 3.5. *C. testosteroni*’nin pH 6 (a), pH 7 (b), pH 9’deki (c) üreme eğrileri



Şekil 3.6. *C. testosteroni*’nin metal içeren (a) ve içermeyen (b) ortamlarda hücre sayısına bağlı standart eğrileri

3.2.6. *C. testosteroni*'nin Biyosorpsiyon Yeteneğinin Belirlenmesi

C. testosteroni'nin tanımlanması yapıldıktan sonra biyosorpsiyon değerleri atomik adsorbsiyon spektrofotometresi ile incelenmiştir. *C. testosteroni*, 17.6 ppm nikel varlığında 32 saatlik inkübasyon sonrası ortamdaki nikel konsantrasyonunda herhangi bir değişiklik olmamış ve biyosorpsiyon göstermediği belirlenmiştir.



Şekil 3.7. *C. testosteroni*'nin nikel biyosorpsiyonu

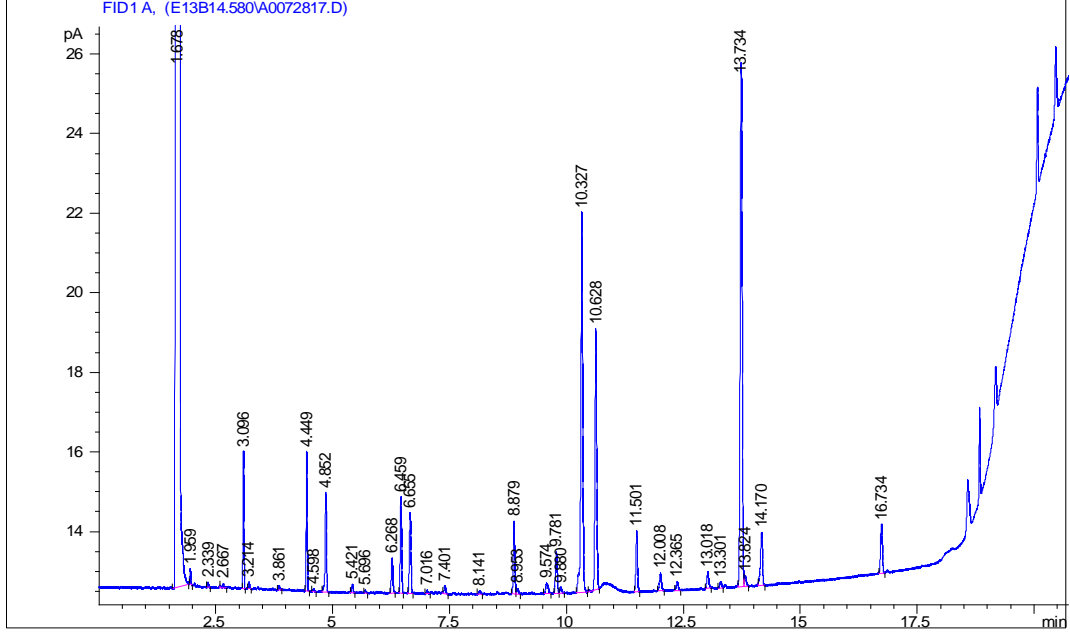
3.3. Co11 Kodlu Suş

3.3.1. Co11 Kodlu Suşun FAME Analizi ile İdentifikasyonu

Co11 kodlu suşun içerdiği yağ asitleri yüzde oranları ile Çizelge 3.3'de ve GC kromatogramı Şekil 3.8'de verilmiştir. Co11 kodlu suşun yağ asidi profilinin %34.69 oranında C_{18:1} w9c, %15.59 oranında C_{16:0} ve %5.18 oranında C_{12:0} içerdiği belirlenmiştir. %23.95 oranında yağ asidi ise tanımlanamamıştır. Yağ asidi profili temel alınarak yapılan veri tabanı analizi sonucunda Co11 suşu cins düzeyinde dahi tespit edilememiştir.

Çizelge 3.3. Co11 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	3.788E+8	0.026	----	7.009	SOLVENT	----	< min rt	
1.959	1064	0.022	----	7.555		----	< min rt	
2.339	353	0.024	----	8.295		----	< min rt	
2.667	462	0.034	----	8.934		----	< min rt	
3.096	9079	0.020	----	9.770		----		
3.214	546	0.027	1.232	10.000	10:0	0.33	ECL deviates 0.000	Reference 0.001
3.861	436	0.031	1.134	10.916	Sum In Feature 2	0.24	ECL deviates 0.002	12:0 ALDE ?
4.449	11486	0.026	----	11.567		----		
4.598	251	0.030	----	11.727		----		
4.852	10108	0.032	1.045	12.000	12:0	5.18	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
5.421	895	0.033	1.014	12.489	unknown 12.484	0.45	ECL deviates 0.005	
5.696	327	0.031	----	12.725		----		
6.268	3965	0.035	0.978	13.182	12:0 2OH	1.90	ECL deviates 0.005	
6.459	9465	0.031	----	13.319		----		
6.655	9128	0.035	0.966	13.461	12:0 3OH	4.33	ECL deviates 0.007	
7.016	280	0.024	----	13.722		----		
7.401	946	0.040	0.947	14.000	14:0	0.44	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
8.141	397	0.033	0.934	14.477	Sum In Feature 1	0.18	ECL deviates -0.001	15:1 ISO I/13:0 3OH
8.879	8484	0.037	0.924	14.954	unknown 14.959	3.85	ECL deviates -0.005	
8.953	657	0.035	0.923	15.001	15:0	----	ECL deviates 0.001	
9.574	1877	0.054	----	15.372		----		
9.781	5466	0.041	0.916	15.495	Sum In Feature 2	2.46	ECL deviates 0.007	14:0 3OH/16:1 ISO I
9.880	775	0.038	0.915	15.554	16:0 N alcohol	0.35	ECL deviates 0.004	
10.327	53483	0.043	0.913	15.820	Sum In Feature 3	23.95	ECL deviates -0.002	16:1 w7c/15 iso 2OH
10.628	34870	0.041	0.912	16.000	16:0	15.59	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
11.501	7376	0.037	0.909	16.503	15:0 3OH	3.29	ECL deviates 0.000	
12.008	2670	0.046	0.909	16.794	17:1 w8c	1.19	ECL deviates 0.002	
12.365	1208	0.043	0.909	17.000	17:0	0.54	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
13.018	2401	0.044	----	17.369		----		
13.301	891	0.037	0.910	17.529	16:0 3OH	0.40	ECL deviates 0.010	
13.734	77638	0.044	0.911	17.774	18:1 w9c	34.69	ECL deviates 0.005	
13.824	1449	0.041	0.911	17.825	18:1 w7c	0.65	ECL deviates 0.002	
14.170	7990	0.045	----	18.020		----		
16.734	6841	0.043	----	19.487		----		
	397	---	----	----	Summed Feature	0.18	15:1 ISO H/13:0	13:0 3OH/15:1 i I/H
	----	----	----	----		----	15:1 ISO I/13:0	
	5902	---	----	----	Summed Feature	2.70	12:0 ALDE ?	unknown 10.928
	----	----	----	----		----	16:1 ISO I/14:0	14:0 3OH/16:1 ISO I
	53483	---	----	----	Summed Feature	23.95	16:1 w7c/15 iso	15:0 ISO



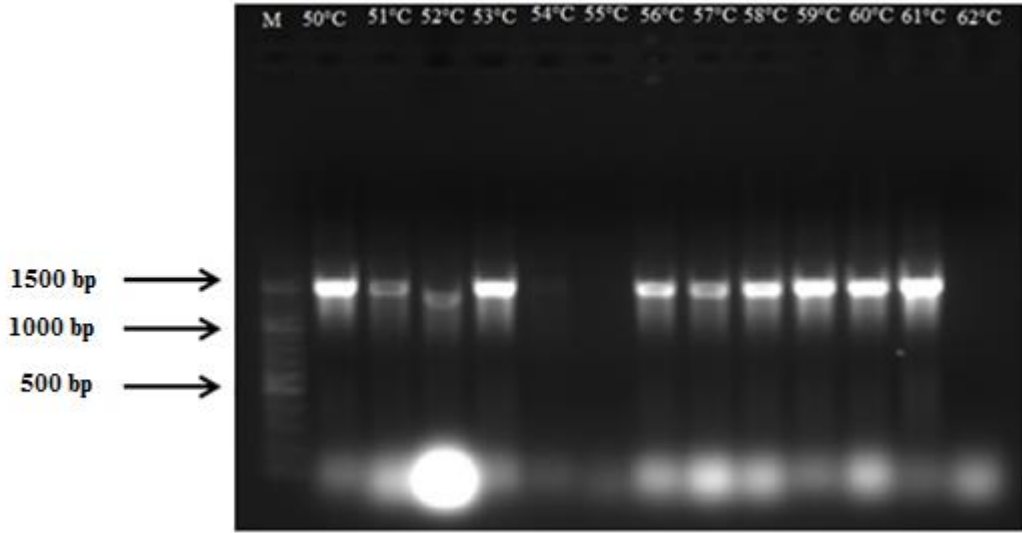
Şekil 3.8. Co11 kodlu suş a ait GC kromotogramı (Agilent 6890N GC, USA cihazı çıktısı)

3.3.2. Co11 Kodlu Suşun DNA İzolasyonu

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

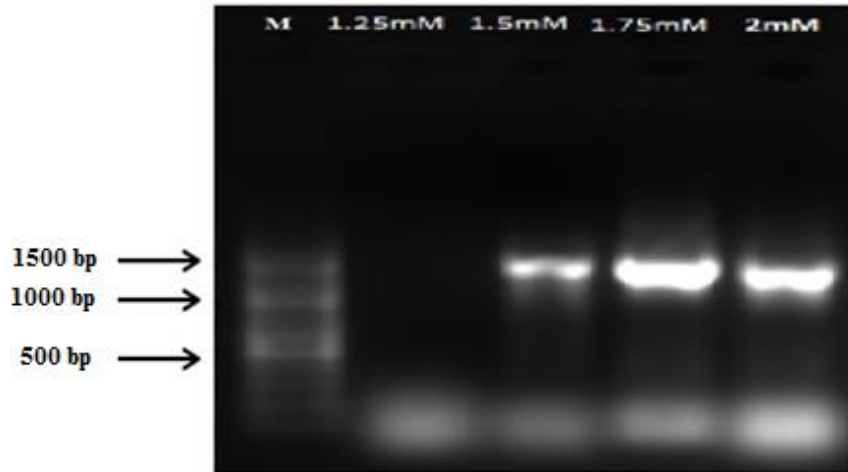
3.3.3. Co11 Kodlu Suşun PZR Optimizasyonu

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 3.9'da Co11 kodlu suş a ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 50°C olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.9. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında Co11 kodlu suşa ait PZR ürünleri; Marker (M)

Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik bağlanmanın giderilmesi için farklı $MgCl_2$ konsantrasyonları denenmiştir. Bu sırada diğer PZR şartları sabit tutulmuştur. Şekil 3.10'da Co11 suşuna ait farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarındaki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu $MgCl_2$ konsantrasyonu 1.75mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.10. Farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında Co11 suşuna ait PZR ürünleri; Marker (M)

3.3.4. Co11 Kodlu Suşun 16S rRNA Sekans Analizi ile İdentifikasyonu

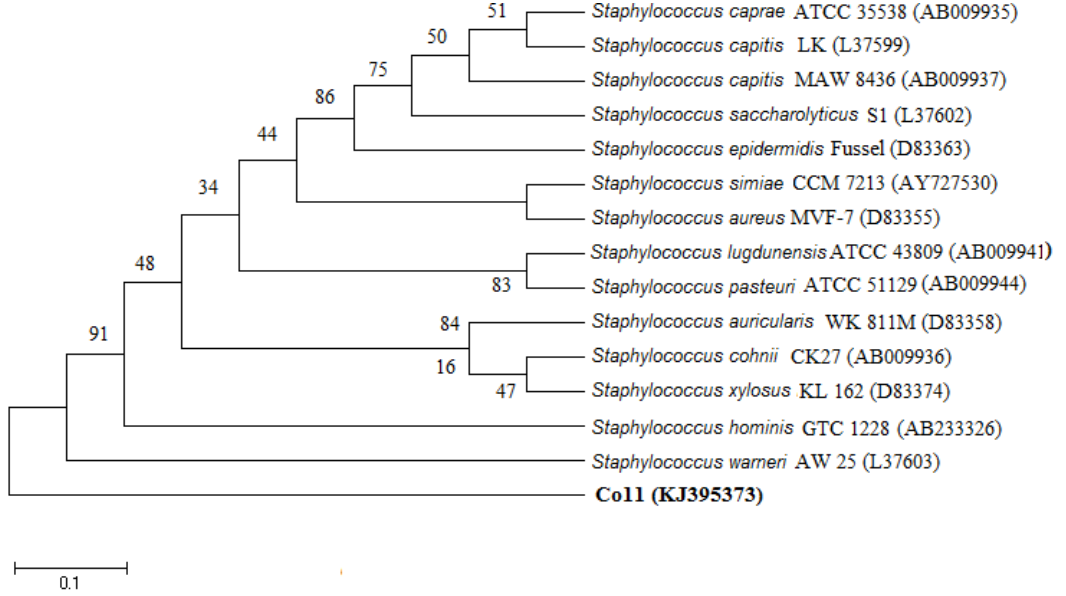
Co11 kodlu suşun 16S rRNA sekans analiziyle elde edilen nükleotid dizileri BLAST programı doğrultusunda yayımlanan sekanslarla kıyaslanmıştır. Gen bankasında yapılan BLAST analizlerinde Co11 suşunun %99 oranında *Staphylococcus warneri* ile homoloji gösterdiği saptanmıştır. *S. warneri* olarak tanımlanan Co11 kodlu suşa ait 16S rRNA bölgesi ile gen bankasından alınan 15 bakteriye ait 16S rRNA nükleotid dizileri MEGA 5.2 programında yer alan Clustal W seçeneği kullanılarak hizalama yapılmıştır. Hizalama sonucu filogenetik analizler gerçekleştirilmiştir.

Filogeniyi oluştururken uzaklık matrisi (Distance Matrix) metodu kullanılmış ve bu veriler ışığında ağaç oluşturulmuştur. Bu çalışmada veriler MEGA 5.2 programına veri olarak yüklenerek Co11 kodlu suşlara en yakın homoloji gösteren türler arasındaki genetik varyasyon ve filogenetik ilişki belirlenmiştir. Nümerik analizlerin gerçekleştirilebilmesi için türler arası uzaklık/yakınlık matrisinin hesaplanması gerekmektedir. Bu amaçla türler arası uzaklık matrisi 16S rRNA bölgelerine göre hesaplanmıştır. (Çizelge 3.4)

Çizelge 3.4. Co11 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. Co11 KJ395371															
2. <i>Staphylococcus warneri</i>	1.011														
3. <i>Staphylococcus pasteurii</i>	1.028	0.005													
4. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.023	0.013	0.013												
5. <i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1.031	0.013	0.012	0.016											
6. <i>Staphylococcus capitis MAW</i>	1.019	0.016	0.014	0.005	0.018										
7. <i>Staphylococcus caprae</i>	1.025	0.016	0.014	0.005	0.018	0.001									
8. <i>Staphylococcus simiae</i>	1.018	0.017	0.019	0.015	0.018	0.016	0.016								
9. <i>Staphylococcus capitis LK</i>	1.018	0.017	0.016	0.007	0.019	0.001	0.001	0.017							
10. <i>Staphylococcus auricularis</i>	1.042	0.016	0.019	0.024	0.016	0.022	0.022	0.028	0.023						
11. <i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	1.032	0.017	0.016	0.005	0.019	0.003	0.003	0.017	0.004	0.023					
12. <i>Staphylococcus hominis</i>	1.015	0.019	0.016	0.017	0.014	0.020	0.020	0.022	0.022	0.025	0.022				
13. <i>Staphylococcus cohnii</i>	1.038	0.018	0.019	0.023	0.016	0.024	0.024	0.022	0.025	0.018	0.025	0.020			
14. <i>Staphylococcus aureus</i>	1.020	0.019	0.019	0.016	0.022	0.015	0.015	0.005	0.015	0.029	0.016	0.025	0.024		
15. <i>Staphylococcus xylosus</i>	1.026	0.018	0.020	0.025	0.018	0.025	0.025	0.021	0.026	0.025	0.027	0.022	0.009	0.023	

16S rRNA bölgelerine göre sıralanan dizilerin Mega 5.2 programında uzaklık matrisine dayalı olarak neighbour-joining tree oluşturulmuştur (Şekil 3.11). oluşturulan soy ağacının doğruluğunu (ağacın güvenilirliğini) istatistiksel olarak belirlemek amacıyla 1000 tekrarlı bootstrap (seç-bağla) analizi yapılmıştır. Suşların soy ağacında birbirlerine olan uzaklığı evrimsel akrabalıklarını göstermektedir. Buna göre Co11 kodlu suş evrimsel açıdan *Staphylococcus warneri* ile yakın akraba olduğu görülmüştür.



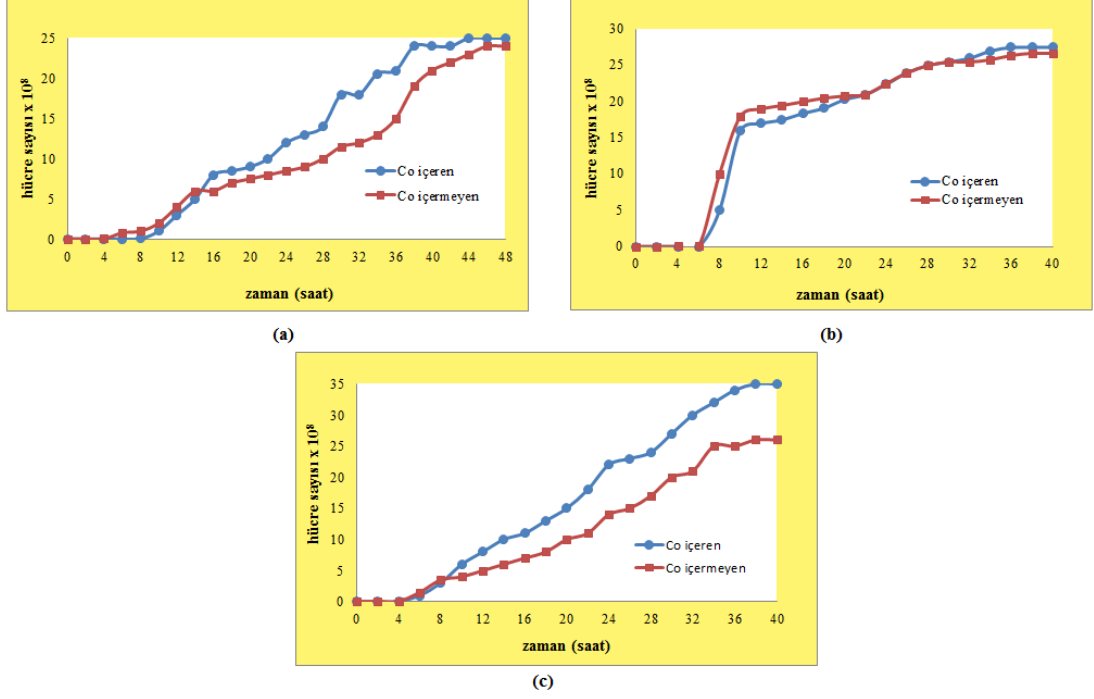
Şekil 3.11. Co11 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram (0.1; nükleotidler arasında ki farkı göstermektedir.)

3.3.5. *Staphylococcus warneri*'nin Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi

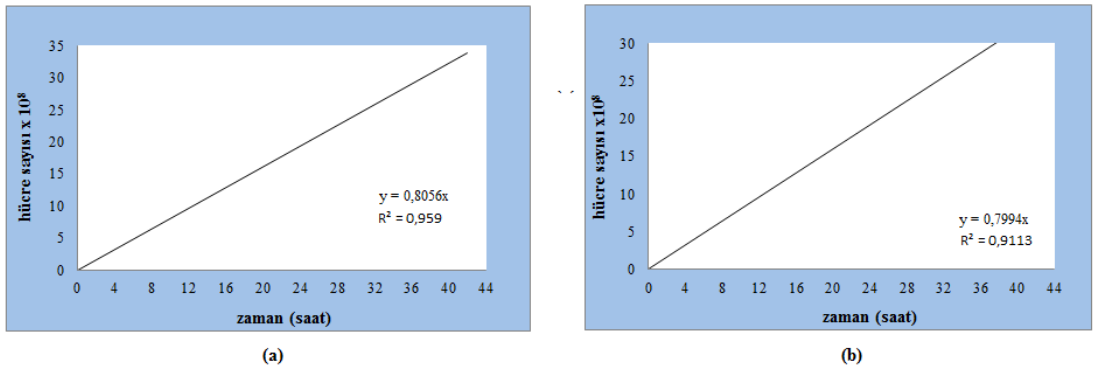
İzole edilen bakterilerin uygun kültür şartlarını belirleme amacıyla MTK değerleri belirlendikten sonra farklı pH'larda üreme eğrileri çıkarılmıştır.

Staphylococcus warneri optimum üreme koşulların belirlenmesi büyüme eğrileri oluşturulmuş ve *S. warneri* için optimum pH'nın 9 olduğu belirlenmiştir (3.12). *S. warneri* pH 9'da 40 saatlik bir inkübasyon sonrasında kobalt içeren ortamda 20×10^8 , kalay içermeyen ortamda ise 35×10^8 hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. pH 9'da

kobalt varlığında, hücre sayısı metallsiz ortama göre %28 oranında artma gözlenmiştir. (Şekil 3.12). pH 7'deki hücre sayısına bağlı standart eğrileri Şekil 3.13'de verilmiştir.



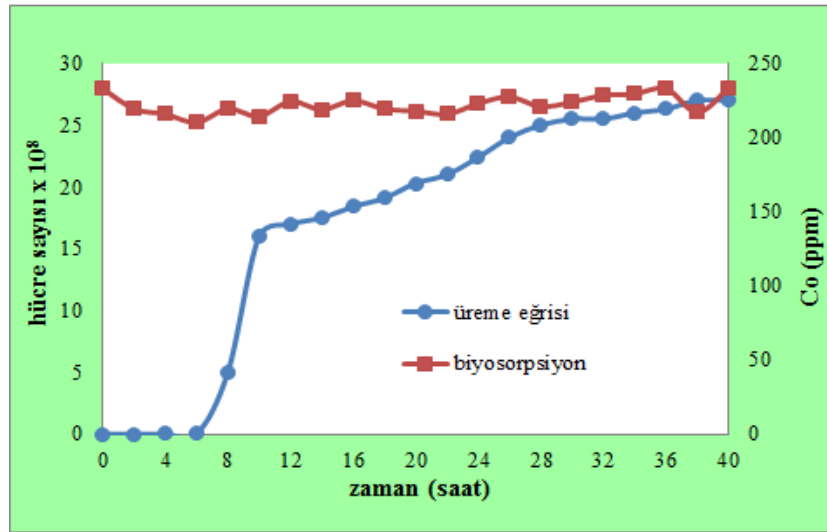
Şekil 3.12. *S. warneri*'nin pH 6 (a), pH 7 (b), pH 9'daki (c) üreme eğrileri



Şekil 3.13. *S. warneri*'ye ait kobalt içeren (a) ve içermeyen (b) ortamlardaki koloni oluşturan birim değerine bağlı standart eğrileri

3.3.6. *S. warneri*'nin Biyosorpsiyon Yeteneğinin Belirlenmesi

S. warneri'nin tanımlanması yapıldıktan sonra kobalt biyosorpsiyonu atomik adsorbsiyon spektrofotometresi ile incelenmiştir. *S. warneri*'nin 233 ppm kobalt varlığında 40 saatlik bir inkübasyon sonrası ortamdaki kobalt konsantrasyonunda herhangi bir değişikliğe neden olmadığı ve biyosorpsiyon göstermediği belirlenmiştir.



Şekil 3.14. *S. warneri*'nin kobalt biyosorpsiyonu

3.4. Sn11 Kodlu Suş

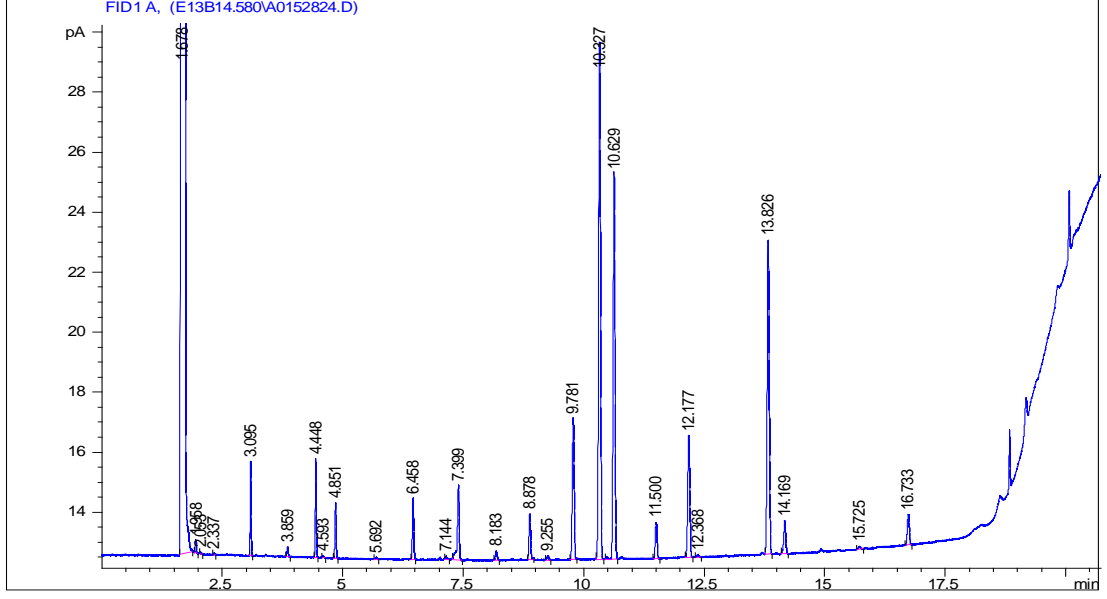
3.4.1. Sn11 Kodlu Suşun FAME Analizi ile İdentifikasyonu

Sn11 kodlu suşun içerdiği yağ asitleri yüzde oranları ile Çizelge 3.5'de ve GC kromotogramı Şekil 3.15'de verilmiştir. Sn11 kodlu suşun yağ asidi profilinin %21.85 oranında C_{16:1}, %19.64 C_{18:1} w7c ve %7.43 C_{17:0} cyclo içerdiği belirlenmiştir. %28.82 oranında yağ asidi ise tanımlanamamıştır. Yağ asidi profili temel alınarak yapılan veri tabanı analizi sonucu Sn11 kodlu suş 0.322 SI değeri ile *Pantoea agglomerans* olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 3.5. Sn11 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	3.802E+8	0.026	----	7.022	SOLVENT	----	< min rt	
1.958	1287	0.025	----	7.567		----	< min rt	
2.053	150	0.021	----	7.751		----	< min rt	
2.337	135	0.020	----	8.303		----	< min rt	
3.095	8353	0.021	----	9.777		----		
3.859	1054	0.025	1.145	10.915	Sum In Feature 2	0.42	ECL deviates	12:0 ALDE ?
4.448	10733	0.026	----	11.568		----		
4.593	291	0.029	----	11.724		----		
4.851	7123	0.030	1.045	12.001	12:0	2.57	ECL deviates	Reference -0.003
5.692	263	0.029	----	12.722		----		
6.458	8291	0.033	----	13.320		----		
7.144	529	0.037	----	13.815		----		
7.399	13934	0.043	0.940	13.999	14:0	4.52	ECL deviates -	Reference -0.004
8.183	1534	0.040	0.926	14.504	unknown 14.502	0.49	ECL deviates	
8.878	7062	0.037	0.917	14.952	unknown 14.959	2.23	ECL deviates -	
9.255	744	0.039	----	15.180		----		
9.781	25101	0.041	0.910	15.493	Sum In Feature 2	7.88	ECL deviates	14:0 3OH/16:1 ISO I
10.327	92118	0.043	0.907	15.819	Sum In Feature 3	28.82	ECL deviates -	16:1 w7c/15 iso 2OH
10.629	69917	0.043	0.906	15.998	16:0	21.85	ECL deviates -	Reference -0.003
11.500	6201	0.041	0.905	16.499	15:0 3OH	1.93	ECL deviates -	
12.177	23800	0.046	0.905	16.888	17:0 CYCLO	7.43	ECL deviates	Reference 0.000
12.368	507	0.045	0.905	16.997	17:0	0.16	ECL deviates -	Reference -0.002
13.826	62747	0.046	0.908	17.818	18:1 w7c	19.64	ECL deviates -	
14.169	6146	0.042	0.908	18.011	18:0	1.93	ECL deviates	Reference 0.015
15.725	453	0.035	0.912	18.896	19:0 CYCLO	0.14	ECL deviates -	Reference 0.000
16.733	5789	0.045	----	19.473		----		
----	26155	---	----	----	Summed Feature	8.29	12:0 ALDE ?	unknown 10.928
----	----	---	----	----		----	16:1 ISO I/14:0	14:0 3OH/16:1 ISO I
----	92118	---	----	----	Summed Feature	28.82	16:1 w7c/15 iso	15:0 ISO

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA50 5.00	0.509	<i>Enterobacter-intermedius</i>
	0.498	<i>Enterobacter-hormaechei</i>
	0.359	<i>Enterobacter-cloacae</i>
	0.338	<i>Raoultella-terrigena (Klebsiella)</i>
	0.322	<i>Pantoea-agglomerans-GC subgroup C (Enterobacter)</i>



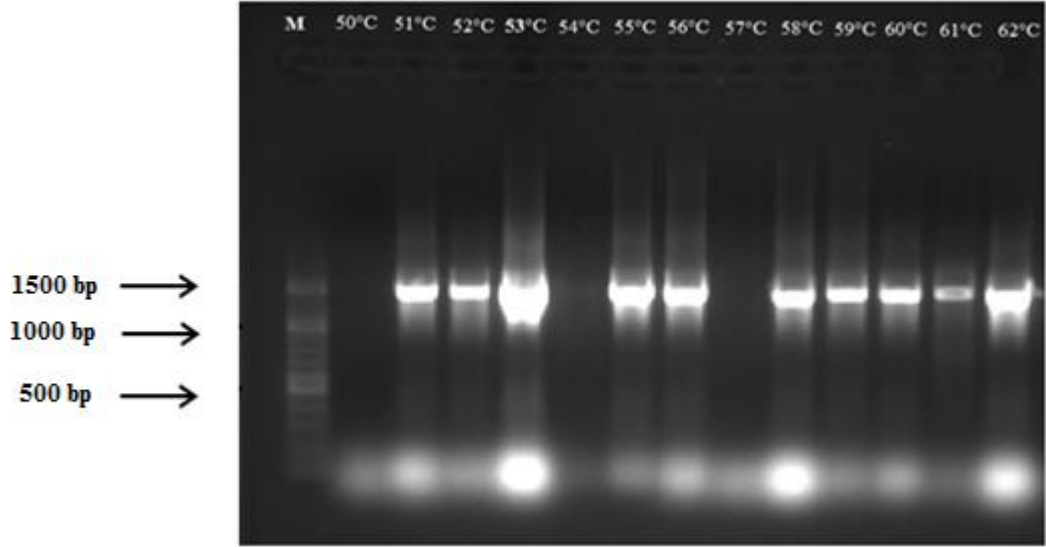
Şekil 3.15. Sn11 kodlu suşa ait GC kromotogramı (Agilent 6890N GC, USA cihazı çıktısı)

3.4.2. Sn11 Kodlu Suşun DNA İzolasyonu

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

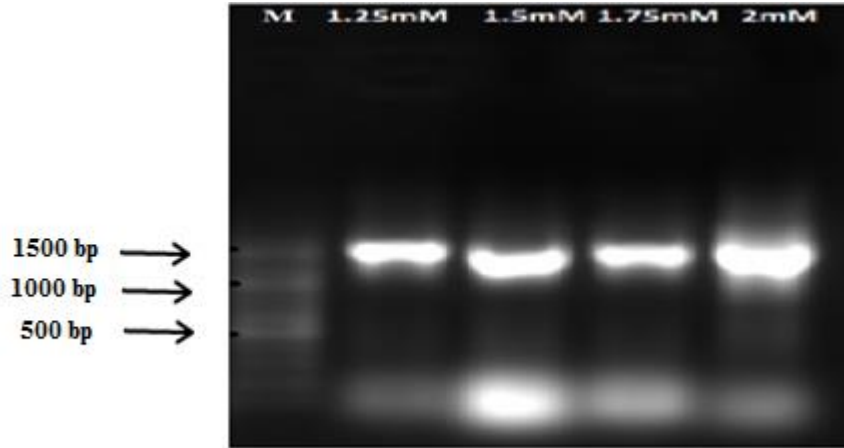
3.4.3. Sn11 Kodlu Suşun PZR Optimizasyonu

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 3.16'de Sn11 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 59°C olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.16. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında Sn11 kodlu suşa ait PZR ürünleri;
Marker (M)

Optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik bağlanmanın giderilmesi için farklı $MgCl_2$ konsantrasyonları denenmiştir. Bu sırada diğer PZR şartları sabit tutulmuştur. Şekil 3.17’de Sn11 suşuna ait farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarındaki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu $MgCl_2$ konsantrasyonu 1.25 mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.17. Farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında Sn11 suşuna ait PZR ürünleri;
Marker (M)

3.4.4. Sn11 Kodlu Suşun 16S rRNA Sekans Analizi ile İdentifikasyon

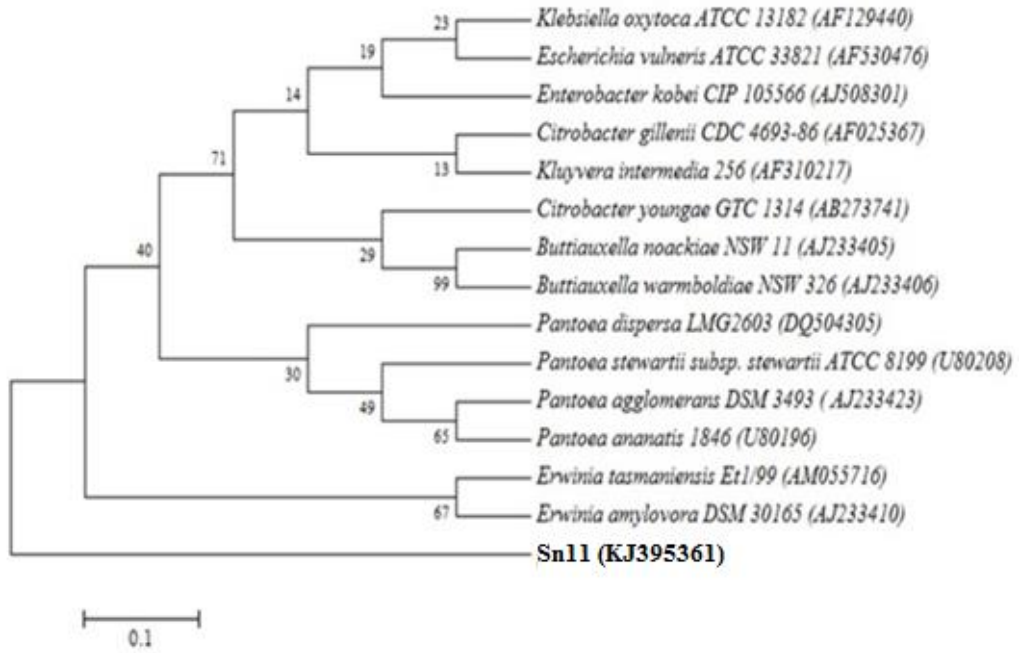
Yağ asidi analizi sonuçlarına desteklemek için izole edilen bakterilerin 16S rRNA sekans analizleri yapılmıştır. Bu amaçla PZR optimizasyonu çalışmaları yapılmış ve saflaştırılmış PZR ürünleri, DNA sekans analizi için Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne (Ankara, Türkiye) gönderilmiştir. 16S rRNA sekans analizi sonucunda elde edilen nükleotid dizileri, Naitonal Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki BLAST programı doğrultusunda yayımlanan sekanslarla kıyaslanmıştır. Gen bankasında yapılan BLAST analizlerine göre Ni11 kodlu suş %99 homoloji ile *Comamonas testosteroni*, Co11 kodlu suş %99 homoloji ile *Staphylococcus warneri* ve Sn11 kodlu suş %98 homoloji ile *Pantoea agglomerans* olarak tanımlanmıştır. *P. agglomerans* olarak tanımlanan Sn11 kodlu suşa ait 16S rRNA bölgesi ile gen bankasından alınan 15 bakteriye ait 16S rRNA nükleotit diziler MEGA 5.2 programında yer alan Clustal W seçeneği kullanılarak hizalama yapılmıştır. Hizalama sonucu filogenetik analizler gerçekleştirilmiştir.

Filogeniyi oluştururken uzaklık matrisi (Distance Matrix) metodu kullanılmış ve bu veriler ışığında ağaç oluşturulmuştur. Bu çalışmada veriler MEGA 5.2 programına veri olarak yüklenerek Sn11 kodlu suşlara en yakın homoloji gösteren türler arasındaki genetik varyasyon ve filogenetik ilişki belirlenmiştir. Nümerik analizlerin gerçekleştirilebilmesi için türler arası uzaklık/yakınlık matrisinin hesaplanması gerekmektedir. Bu amaçla türler arası uzaklık matrisi 16S rRNA bölgelerine göre hesaplanmıştır (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. Sn11 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. Sn11 KJ395361															
2. <i>Pantoea agglomerans</i> DSM 3493	1.107														
3. <i>Pantoea ananatis</i> 1846	1.127	0.012													
4. <i>Pantoea stewartii</i> ATCC 8199	1.121	0.021	0.018												
5. <i>Erwinia tasmaniensis</i> Et1/99	1.107	0.026	0.037	0.030											
6. <i>Citrobacter gillenii</i> CDC 4693-86	1.121	0.031	0.033	0.034	0.027										
7. <i>Enterobacter kobei</i> CIP 105566	1.121	0.029	0.033	0.027	0.029	0.014									
8. <i>Buttiauxella noackiae</i> NSW 11	1.124	0.030	0.036	0.034	0.020	0.025	0.017								
9. <i>Erwinia amylovora</i> DSM 30165	1.114	0.033	0.037	0.029	0.011	0.030	0.035	0.029							
10. <i>Pantoea dispersa</i> LMG2603	1.121	0.030	0.024	0.020	0.023	0.032	0.032	0.034	0.023						
11. <i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 13182	1.135	0.034	0.028	0.027	0.034	0.026	0.017	0.025	0.036	0.029					
12. <i>Buttiauxella warmboldiae</i> NSW326	1.121	0.032	0.037	0.036	0.022	0.017	0.018	0.002	0.030	0.036	0.027				
13. <i>Kluyvera intermedia</i> 256	1.117	0.036	0.029	0.029	0.030	0.014	0.016	0.018	0.035	0.022	0.017	0.020			
14. <i>Escherichia vulneris</i> ATCC 33821	1.127	0.029	0.026	0.029	0.030	0.023	0.017	0.024	0.037	0.025	0.019	0.025	0.020		
15. <i>Citrobacter youngae</i> GTC 1314	1.135	0.036	0.037	0.035	0.029	0.022	0.020	0.021	0.027	0.029	0.025	0.023	0.027	0.028	

16S rRNA bölgelerine göre sıralanan dizilerin Mega 5.2 programında uzaklık matrisine dayalı olarak neighbour-joining tree oluşturulmuştur (Şekil 3.18). oluşturulan soy ağacının doğruluğunu (ağacın güvenilirliğini) istatistiksel olarak belirlemek amacıyla 1000 tekrarlı bootstrap (seç-bağla) analizi yapılmıştır. Suşların soy ağacında birbirlerine olan uzaklığı evrimsel akrabalıklarını göstermektedir. Buna göre Sn11 kodlu suş evrimsel açıdan *Pantoea agglomerans* ile yakın akraba olduğu görülmüştür.

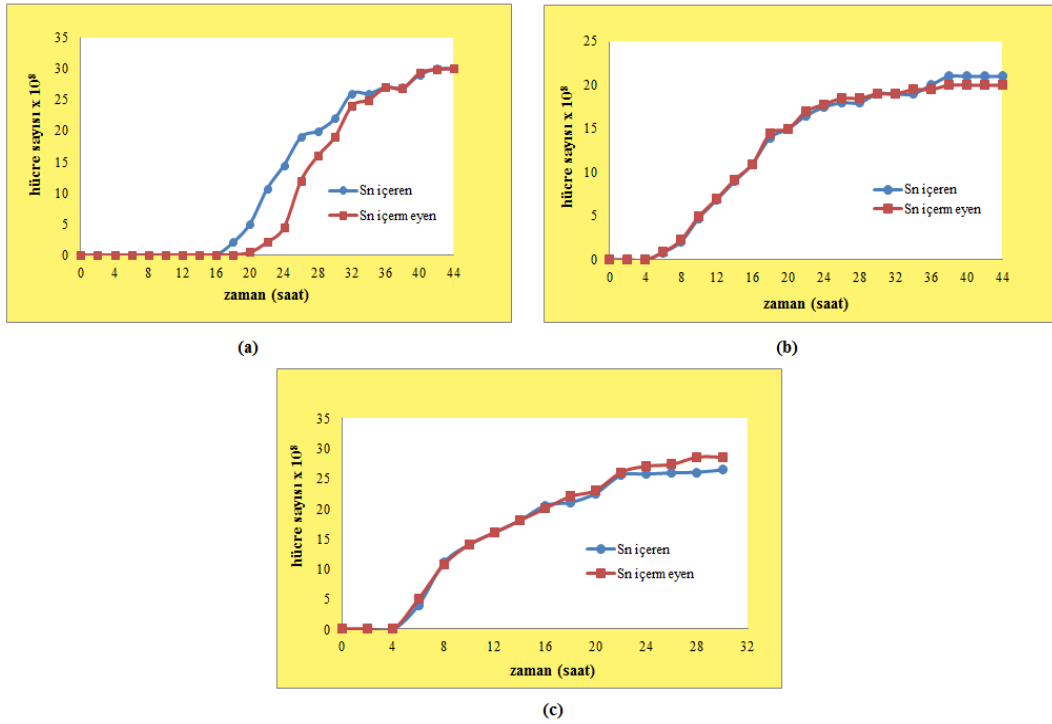


Şekil 3.18. Sn11 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.1; nükleotidler arasında ki farkı göstermektedir.)

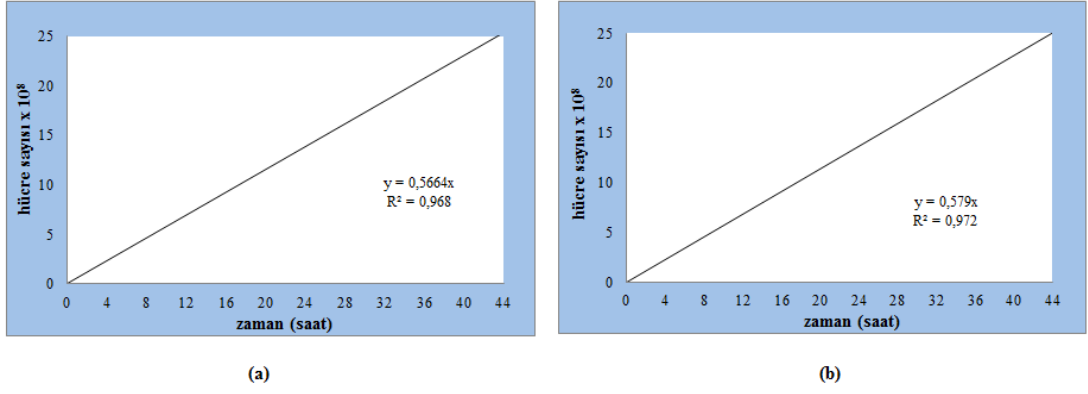
3.4.5. *Pantoea agglomerans*'ın Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi

İzole edilen bakterilerin uygun kültür şartlarını belirleme amacıyla MTK değerleri belirlendikten sonra farklı pH'larda üreme eğrileri çıkarılmıştır.

P. agglomerans optimum üreme koşulların belirlenmesi büyüme eğrileri oluşturulmuş ve *P. agglomerans* 'ın optimum pH'nın 7 olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.19). *P. agglomerans* pH 7'de 44 saatlik bir inkübasyon sonrasında kalay içeren ortamda 21×10^8 , kalay içermeyen ortamda ise 20×10^8 hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. pH 7'de kalay varlığında, hücre sayısı metallsiz ortama göre %5 oranında artma gözlenmiştir. (Şekil 3.19). pH 7'deki hücre sayısına bağlı standart eğrileri Şekil 3.20'da verilmiştir.



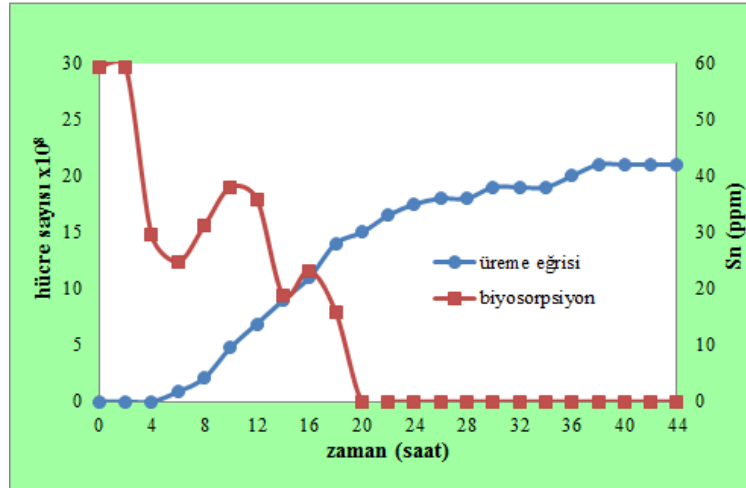
Şekil 3.19. *P. agglomerans* 'ın pH 5 (a), pH 7 (b), pH 9'daki (c) üreme eğrileri



Şekil 3.20. *P. agglomerans*'a ait kalay içeren (a) ve içermeyen (b) ortamlarda ki koloni oluşturan birim değerine bağlı standart eğrileri

3.4.6. *P. agglomerans*'ın Biyosorpsiyon Yeteneğinin Belirlenmesi

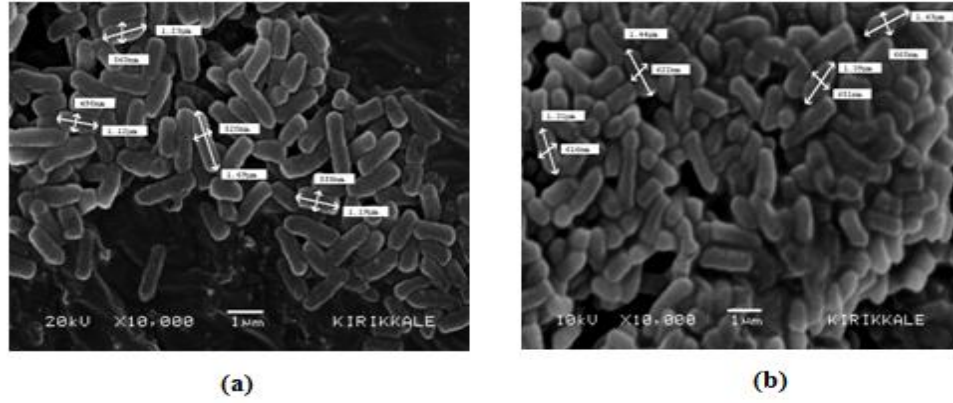
Suşların tanımlamaları yapıldıktan sonra kalay biyosorpsiyonu atomik adsorbsiyon spektrofotometresi ile incelenmiştir. *P. agglomerans* 59.35 ppm kalay varlığında 20 saatlik inkübasyon sonucu ortamdaki kalayın tamamını biyosorbe etmiştir. (Şekil 3.21).



Şekil 3.21. *P. agglomerans*'ın kalay biyosorpsiyonu

3.4.7. *P. agglomerans*'ın SEM Görüntüleri

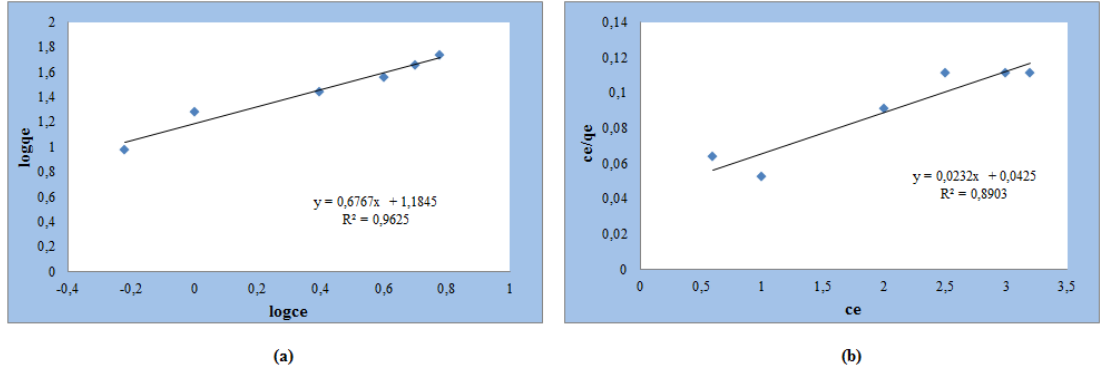
Ağır metallerin bakteri morfoloji üzerine etkisini gözlemek amacıyla dirençli suşlar taramalı elektron mikroskopunda incelenmiştir. *P. agglomerans*'ın metal içeren ortamda boyutları 521 nm x 1.45µm iken metal içermeyen ortamda boyutları 605 nm x 1.38 µm olduğu gözlemlenmiştir. (Şekil 3.22).



Şekil 3.22. *P. agglomerans*'a ait kalay içeren (a) ve içermeyen (b) ortamlarda ki SEM görüntüleri (X 10.000)

3.4.8. *P. agglomerans*'a ait Kesikli İzoterm Eğrilerinin Değerlendirilmesi

Biyosorpsiyon yeteneği belirlenen *P. agglomerans*'ın izoterm eğrilerinin belirlenmesi için atomik adsorbsiyon spektrofotometresinde incelenmiştir.



Şekil 3.23. *P. agglomerans* suşuna ait Freundlich (a) ve Langmuir izoterm (b) grafikleri

Elde edilen izoterm sabitleri Çizelge 3.7’de verilmiştir. *P.agglomerans*’ın kalay üzerinde Langmuir ve Freundlich izotermine uygunluk durumu korelasyon katsayısı (R^2) ile bulunmuştur.

Çizelge 3.7. İzoterm sabitleri

<i>P. agglomerans</i>	Langmuir izotermi			Freundlich izotermi		
	a	b	R^2	n	Kf	R^2
	43,1	0,5	0.8903	1,47	15,29	0.9625

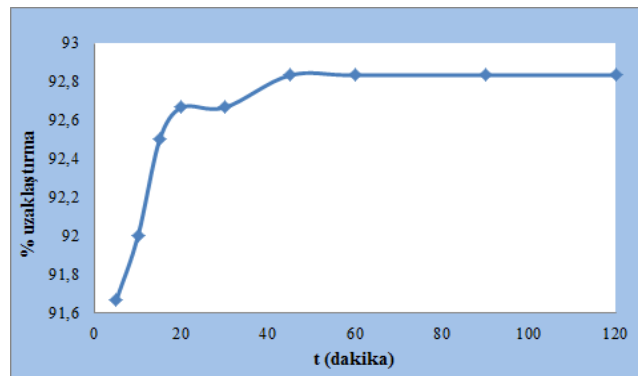
Elde edilen izoterm sabitleri dikkate alındığında Freundlich izotermi daha büyük R^2 değerine sahiptir. Langmuir izoterminin R^2 değeri 0.8903 olduğundan Freundlich izotermine uygun olduğu tespit edilmiştir. Freundlich izotermine göre hücre yüzeyinde bağlanmaların her noktada aynı olmadığı, heterojen olarak dağılım gösterdiği belirlenmiştir.

3.4.9. *P. agglomerans*'a ait Kesikli Kinetik Çalışması

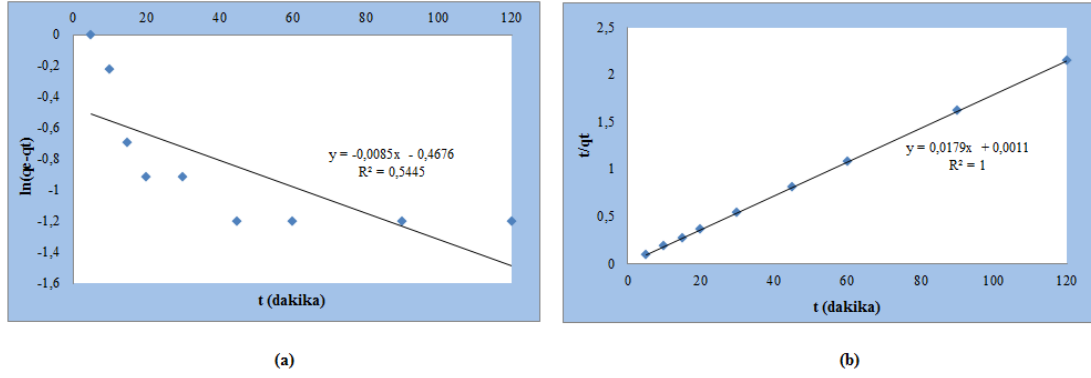
Kalay için Şekil 3.24'teki biyosorpsiyon kapasitesinin zaman ile değişim grafiğine bakıldığında biyosorpsiyonunu 45 dakikada tamamlanmış, bu zaman içerisinde biyosorpsiyon kapasitesinin %93'ü gerçekleşmiştir. Deneysel olarak elde edilen özgül tutulma (qe) 56 mg kalay/g biyomas olarak elde edilmiştir.

Biyosorpsiyon kinetiğini belirlemek için çizilen pseudo 1. derece ve pseudo 2. derece reaksiyon kinetiği grafikleri Şekil 3.25'de verilmiştir. Bu şekillerdeki grafiğin regresyon katsayısına bakıldığında pseudo birinci derece için R^2 değeri 0.54, pseudo ikinci derece için R^2 değeri 1 olarak elde edilmiştir. Biyosorpsiyon kinetiğini pseudo 2. derece reaksiyon kinetiği 1. derece kinetiğe göre korelasyon katsayılarına bakıldığında daha yüksek güvenilirlikte açıklayabilmektedir.

Şekil 3.25'de da görüldüğü gibi her iki adsorban için elde edilen denklemlerin R^2 değeri birbirinden oldukça farklı olmakla birlikte pseudo birinci derece kinetik denklem kullanılarak hesaplanan birim adsorban başına uzaklaştırılan kalay iyonu miktarı deneysel yoldan bulunan kalay iyonu miktarıyla uyum içinde de değildir. Adsorpsiyon kinetiğini aydınlatabilmek için kinetik veriler pseudo ikinci derece kinetik modele uygulanmıştır. Pseudo ikinci derece kinetik modelinde R^2 değeri yüksek çıktığından dolayı ve deneysel olarak elde edilen özgül tutulmayada oldukça yakın bir qh sabiti çıktığı için pseudo ikinci derece kinetik modeline uygun olduğu tespit edilmiştir. Bu durumda hücre ile kalay arasında kimyasal bir etkileşim söz konusu olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3.24. Kalay metalinin biyosorpsiyon kapasitesinin zaman ile değişimi



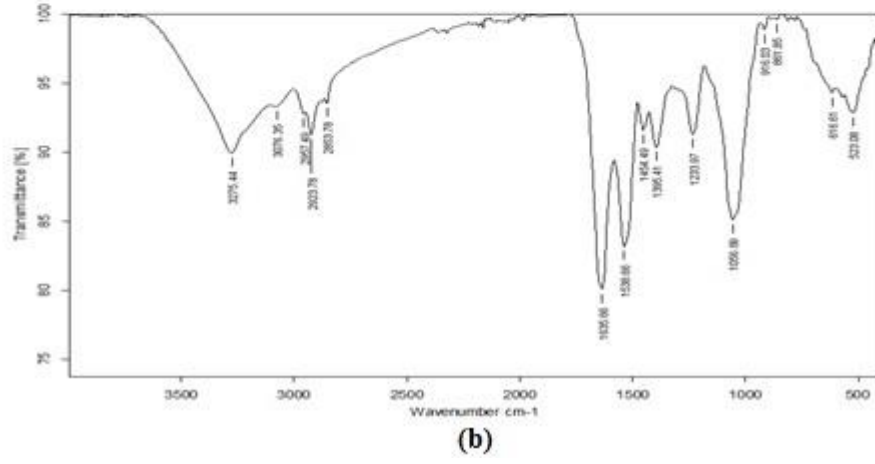
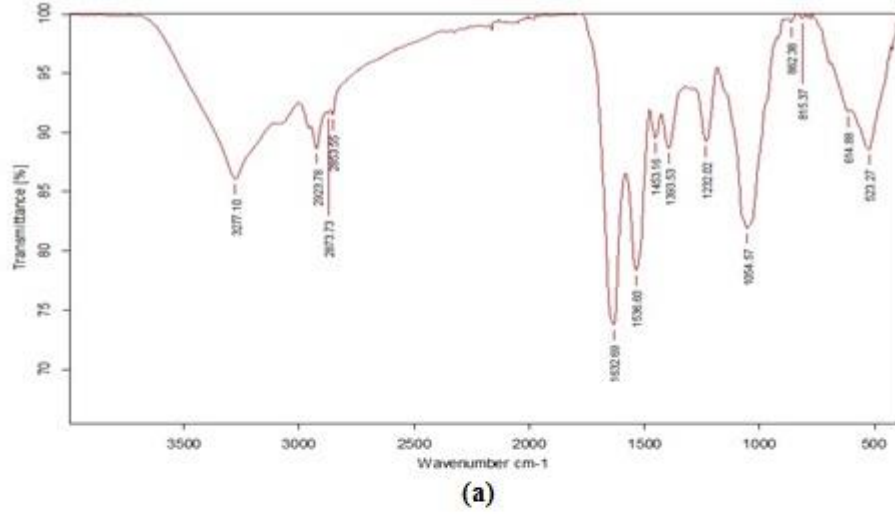
Şekil 3.25. *P. agglomerans* yüzeyinde kalay adsorpsiyonunun pseudo birinci (a) ve pseudo ikinci derece (b) reaksiyon kinetiği

Çizelge 3.8. *P. agglomerans* için pseudo birinci ve ikinci derece kinetik model sabitleri

<i>P. agglomerans</i>	Pseudo birinci derece				Pseudo ikinci derece			
	q_{den}	q_h	k_1	R^2	q_{den}	q_h	k_2	R^2
	56	24	0.0085	0.5445	56	55.86	0.29	1

3.4.10. *P. agglomerans*'ın FTIR Analizi Değerlendirilmesi

P. agglomerans'ın kalay biyosorpsiyonu yeteneği belirlendikten sonra hücre yüzeyindeki kalayı bağlayan fonksiyonel grupları belirlemek için FTIR analizi yapılmıştır. Şekil 3.26'ya bakıldığında bakterinin hücre yüzeyinde bulunan ve kalayı bağlayan fonksiyonel gruplar FTIR spektrumundaki değişimler belirlenmiştir.



Şekil 3.26. *P. agglomerans* suşunun kalay içeren (a) ve içermeyen (b) ortamda FTIR analizi sonuçları

Çizelge 3.9. *P. agglomerans*'a ait FTIR sonuçları

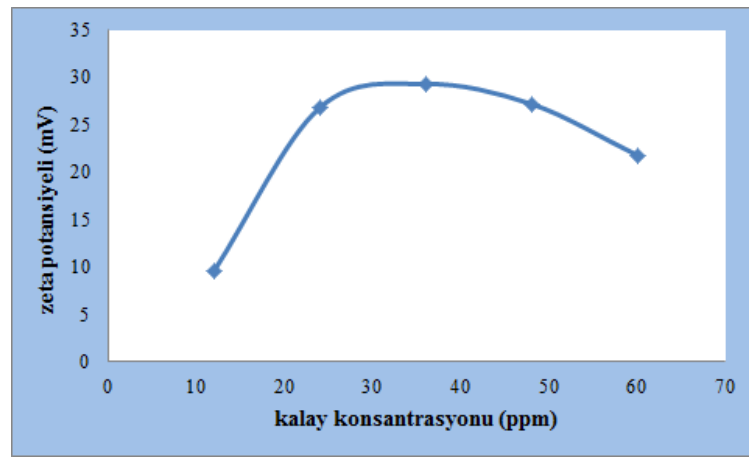
Frekans (cm ⁻¹)	Frekans (cm ⁻¹)	Fonksiyonel Grup
Yüksüz bakteri	Sn yüklü bakteri	
3275	3277	O-H (alkol, fenol) Gerilme
2957	2924	C-H (alkil) Gerilme
2924	2874	C-H (alkil) Gerilme
1636	1633	O-H (alkol, fenol) Gerilme
1539	1537	C=C (alkinil) Gerilme
1454	1466	C=C (alkinil) Gerilme
1395	1394	C(CH ₃) ₃ (tert-Butyl) Eğilme
1232	1230	C-O-C Gerilme
1057	1055	C-O-C Gerilme
916	862	R ₂ C=CH ₂ Eğilme

2957 cm⁻¹ ve 2924 cm⁻¹ de alkil gruplarından ortaya çıkan sinyaller biyosorpsiyondan sonra sırasıyla 2924 cm⁻¹ ve 2874 cm⁻¹'a kaymıştır. Biyosorpsiyondan önce 1454 cm⁻¹'de gözükten karboksilat (-COO-) bandı ise biyosorpsiyondan sonra 1466 cm⁻¹ civarına kaymıştır. 916 cm⁻¹ deki R₂C=CH₂ eğilme bandı ise 862 cm⁻¹'e kaymıştır. Bu gruplar metal bağlamada en etkin gruplar olarak belirlenmiştir.

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 [82].

3.4.11. *P. agglomerans*'ın Zeta Potansiyelinin Değerlendirilmesi

P. agglomerans'ın farklı konsantrasyonlarda kalay içeren ortamlarda hücre yüzeyinde meydana gelen değişimler zeta potansiyometre ile incelenmiştir (Şekil 3.27). 20 ppm konsantrasyona kadar stabilitesini koruyamadığı fakat daha yüksek konsantrasyonlarda stabilitesini 50 ppm'e kadar koruduğu daha sonra azaldığı belirlenmiştir. 25 mV üstündeki yüzey yükünde etraftaki partiküller dağınık halde, 25 mV altında kalan konsantrasyonlar ise partiküllerin topak oluşturduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.27. *P. agglomerans*'ın kalay konsantrasyonuna bağlı zeta potansiyeli değişim grafiği

4. TARTIŞMA SONUÇ

Kızılırmak üzerinden 12 bölgeden toplanan su örneklerinden Ni, Co ve Sn dirençli bakteriler moleküler metodlar kullanılarak tanımlanmış ve biyosorpsiyon özellikleri araştırılmıştır. Daha önceden yapılan çalışmalarda Ni, Co ve Sn dirençli bakteriler biyokimyasal testler kullanılarak tanımlanmıştır [74,75]. Orman [75] çalışmasında Sn11 kodlu suşun tanımlanmasını biyokimyasal yöntemler yardımıyla yapmıştır. Sn11 kodlu suş gram negatif basil olduğunu tanımlamıştır. Koçhan [74] ise Ni11 kodlu suşun gram negatif kok, Co11 kodlu suşu ise gram pozitif kok olarak tanımlamıştır. Orman [75] yapmış olduğu çalışmada Sn11 kodlu suşun MTK değerini 59.35 ppm olarak bulmuş, Koçhan [74] ise Ni11 ve Co11 kodlu suşların sırasıyla MTK değerlerini 233 ppm ve 17.6 ppm olarak belirlemişlerdir.

Önceki çalışmalarda yapılan biyokimyasal testler tür düzeyinde bir tanımlama için yeterli olmadığından [74,75], moleküler yöntemler tercih edilmektedir. Bu çalışmada biyokimyasal testlere ek olarak 16S rRNA sekans analizi ve yağ asidi metil ester (FAME) analizi gibi moleküler yöntemlerle ağır metal dirençli bakterilerin karakterizasyonu yapılmıştır. Bu tez kapsamında yapılan FAME analizleri sonucunda Ni11 kodlu suşun C_{15:0} iso, C_{15:0} anteiso, C_{16:0} yağ asitlerini sırasıyla %16.26, %16.22, %5.42 oranlarında içerdiği belirlenmiştir. Bu profil kapsamında Ni11 suşuna cins düzeyinde dahi karşılık gelen bakteri tespit edilememiştir. Co11 kodlu suşun C_{18:1} w_{9c}, C_{16:0}, ve C_{12:0} yağ asitlerini sırasıyla %34.69, %15.59 ve %5.18 oranlarında içerdiği belirlenmiştir. Bu profil kapsamında Co11 suşuna cins düzeyinde dahi karşılık gelen bakteri tespit edilememiştir. Sn11 kodlu suşun C_{16:1}, C_{18:1} w_{7c}, ve C_{17:0} cyclo yağ asitlerini sırasıyla %21.85, %19.64 ve %7.43 oranlarında içerdiği belirlenmiştir. Bu profil kapsamında Sn11 kodlu suş 0.322 SI değeri ile *Pantoea agglomerans* olarak tanımlanmıştır. Vreelad ve arkadaşlarının [85], yaptıkları çalışmada, çok eski tuz kristalinden izole edilen bir “Permian” bakterisi ile bu izolatların modern akrabaları arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Yağ asit profillerine göre bu organizmaları karşılaştırdıklarında bu yaklaşımın tür düzeyinde ayırım yapamadığı, ancak cins düzeyinde farklılıkları ortaya koyabildiği sonucuna varmışlardır. Bakterilerin içerdikleri yağ asidi kompozisyonu buldukları ortama ve

sıcaklığa göre değişebilmektedir. Bu sebeple tanımlamalar 16S rRNA sekans analizi ile tamamlanmıştır. 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 [86]. 16S rRNA sekans analizi için izolatların genomik DNA'ları izole edilmiştir. İzole edilen genomik DNA'lar üniversal primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılmıştır. PZR ürünlerinde spesifik olmayan bağlanmaların en aza indirgenmesi amacıyla annealing sıcaklığı ve tuz konsantrasyonu optimizasyonu yapılmıştır. Optimizasyon çalışmaları sonucunda Ni11 kodlu suş için annealing sıcaklığı 62°C, tuz konsantrasyonu 1.5 mM, Co11 kodlu suş için annealing sıcaklığı 50°C, tuz konsantrasyonu 1.75 mM ve Sn11 kodlu suş için annealing sıcaklığı 59°C tuz konsantrasyonu 1.25 mM olarak belirlenmiştir. Optimum koşullarda PZR uygulanarak elde edilen PZR ürünlerinin sekans analizi gerçekleştirilmiştir. Yapılan 16S rRNA sekans analizleri sonucu Ni11 kodlu suş %99 homoloji ile *Comamonas testosteroni*, Co11 kodlu suş %99 homoloji ile *Staphylococcus warneri*, Sn11 kodlu suş ise %99 homoloji ile *Pantoea agglomerans* 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 Ni11 kodlu suş *Comamonas testosteroni*, , Co11 kodlu suş *Staphylococcus warneri*, , Sn11 kodlu suş *Pantoea agglomerans*, 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 Sn11 kodlu suşun sekans analizi ile bire bir uyum gösterdiği belirlenmiştir. Mırık ve arkadaşlarının [87] yapmış olduğu çalışmada Doğu Akdeniz bölgesinden bakteri izolasyonu yapmış ve bakterilerin tanımlanması için geleneksel ve yağ asidi analizi yöntemini kullanmıştır. Geleneksel yöntemle 170 bakteri suşu tespit edilmiştir. Seçilen 19 bakterilerin yağ asidi analizi yöntemi ile tanımlanmasında %37 ve %76 arasında değişen bir benzerlik indeksi tespit edilmiştir. Suşların yağ asidi analizi ile

cins düzeyinde tanımlamanın yararlı olacağını ancak tür belirlenmesinde bu yöntemin bir yarar sağlamayacağını belirtmişlerdir. Ovcharenko ve arkadaşlarının [88] yapmış olduğu filogenetik çalışmalar ise *Serratia nematodiphila* ve *Serratia marcescens*'i yakın tür olarak tespit etmiştir ve yapmış olduğumuz filogenetik çalışmalarla uyumluluk göstermektedir.

Tez çalışmasında moleküler yöntemlerle belirlenen bakterilerin farklı pH'larda optimum üreme koşulları belirlenmiştir. Ni11 kodlu suş için pH 6'da yapılan 30 saatlik inkübasyon sonunda nikel içeren ortamda üreme olmadığı, nikel içermeyen ortamda ise 24×10^8 hücre sayısına ulaştığı belirlenmiştir. Ni11 kodlu suş için pH 7'de yapılan 38 saatlik inkübasyon sonunda nikel içeren ortamda 25.5×10^8 nikel içermeyen ortamda ise 26×10^8 hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. Ni11 kodlu suşun koloni oluşturan birim sayısının nikel varlığında %2 oranında düşük olduğu belirlenmiştir. Ni11 kodlu suş için pH 9'da yapılan 32 saatlik inkübasyon sonunda nikel içeren ortamda 12×10^8 , nikel içermeyen ortamda ise 23×10^8 hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. Ni11 kodlu suşun koloni oluşturan birim sayısının nikel varlığında %47.8 oranda düşük olduğu belirlenmiştir.

Co11 kodlu suş için pH 6'da yapılan 48 saatlik inkübasyon sonunda kobalt içeren ortamda 25×10^8 kobalt içermeyen ortamda ise 24×10^8 hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. Co11 kodlu suşun koloni oluşturan birim sayısının kobalt varlığında %4 oranında artış olduğu belirlenmiştir. Co11 kodlu suş için pH 7'de yapılan 42 saatlik inkübasyon sonunda kobalt içeren ortamda 27×10^8 , kobalt içermeyen ortamda ise 26×10^8 hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. Co11 kodlu suşun koloni oluşturan birim sayısının kobalt varlığında %3.7 oranında artış olduğu belirlenmiştir. Co11 kodlu suş için pH 9'da yapılan 40 saatlik inkübasyon sonunda kobalt içeren ortamda 35×10^8 kobalt içermeyen ortamda ise 26×10^8 hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. Co11 kodlu suşun koloni oluşturan birim sayısının kobalt varlığında %25.7 oranda artış olduğu belirlenmiştir.

Sn11 kodlu suş için pH 5'de yapılan 44 saatlik inkübasyon sonunda kalay içeren ve içermeyen ortamda 30×10^8 hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. Koloni oluşturan birim sayısında değişiklik belirlenmemiştir. Sn11 kodlu suş için pH 7'de yapılan 44

saatlik inkübasyon sonunda kalay içeren ortamda 21×10^8 kalay içermeyen ortamda ise 20×10^8 hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. Sn11 kodlu suşun koloni oluşturan birim sayısında kalay varlığında %4.7 oranda artış olduğu belirlenmiştir. Sn11 kodlu suş için pH 9'da yapılan 30 saatlik inkübasyon sonunda kalay içeren ortamda 26.4×10^8 , kalay içermeyen ortamda ise 28.5×10^8 hücre sayısına ulaştığı gözlemlenmiştir. Sn11 kodlu suşun koloni oluşturan birim sayısının kalay varlığında %8 oranında düşük olduğu belirlenmiştir.

Jackson ve arkadaşlarının [83] yaptığı bir çalışmada Plankenburg nehrindeki metal konsantrasyonlarını Al için 11.56 ppm, Ni için 0.17 ppm, Fe için 12.2 ppm olduğunu tespit etmişlerdir. Olası metal dayanıklılığına sahip mikroorganizmalar *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Delftia tsuruhatensis* A90, *Kocuria kristinae* 6J-5b, *Comamonas testosteroni* WDL7, *Stenotrophomonas maltophilia* 776, *Staphylococcus* sp. MOLA:313, *Micrococcus* sp. TPR14, *Sphingomonas* sp. 8b-1 ve *Microbacterium* sp. PAO-12. olarak tanımlamışlardır. Bu çalışmada izole edilen Ni dirençli *C. testosteroni* suşu için belirlenen 395 ppm olan MTK değerinin diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında yüksek olduğu dikkat çekicidir. Xia-Fang [84] ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Cd dirençli bakterilerinin MTK değeri 2000 ppm olarak belirlemişlerdir.

Tanımlanan suşların biyosorpsiyon yetenekleri incelendiğinde *S. warneri* ve *C. testosteroni* suşlarının biyosorpsiyon yetenekleri olmadıkları belirlenmiştir. *P. agglomerans* 59.35 ppm kalay içeren ortamda 20 saatlik bir inkübasyon sonucunda %100 oranında kalayı biyosorbe ettiği belirlenmiştir. *P. agglomerans* suşunun metal içeren ortamdaki inkübasyonları sonrasında SEM görüntü analizleri sonucu boyutları incelenmiş ve *P. agglomerans*'ın kalay varlığında hücre boyutlarının ortalama 1.38×605 nm'den 1.45×521 nm'ye yükseldiği gözlemlenmiştir. Hücre boyutlarındaki gözlemlendiğimiz bu artışlar elde edilen biyosorpsiyon verilerini desteklemektedir. Özdemir ve arkadaşlarının [89] Cd, Cu, Mn, Ni ve Zn biyosorpsiyonunda *Pantoea* türlerinin etkisini göstermiştir. Suriya ve arkadaşları [90] *Enterobacter cloacae*'nın Hg^{+2} , Cr^{+4} , Cd^{+2} , Pb^{+2} ve Cu^{+2} için metal giderim kapasitesinin sırasıyla %46, %54, %57, %66 ve %74 oranlarında olduğu belirlenmiştir. Hosain ve arkadaşlarının [91] yaptığı çalışmada *Bacillus subtilis*'in kurşun üzerinde %87'ye kadar biyosorpsiyon

kapasitesi olduğu belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmalarda Ni, Sn ve Co biyosorpsiyonunda *Staphylococcus*, *Comamonas* ve *Pantoea* türlerinin de etkili olabileceğini göstermiştir.

P. agglomerans suşunun Langmuir ve Freundlich çalışmaları yapılmıştır. Freundlich izoterminin R^2 değeri Langmuir izoterminden daha büyük olduğu için Freundlich izotermine uygun olduğu tespit edilmiştir. Freundlich izotermine adsorpsiyon yoğunluğunun (n) 1-10 aralığında olması biyosorpsiyonun verimli olduğunu ifade etmektedir. Deneysel sonuçlarında da adsorpsiyon yoğunluğu (n) 1.47 olarak tespit edilmiştir. Cirik ve arkadaşları [92] *Spirulina platensis* ile yaptıkları izoterm çalışmasını Langmuir ve Freundlich izotermine uygulamışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre Co^{+2} iyonu adsorpsiyonu, Freundlich izotermine uygun olduğunu belirlemişlerdir. Peter [93] Zn giderim çalışmasında elde ettiği verilere göre en uygun izoterm Freundlich izotermi olduğunu göstermiştir.

Kesikli kinetik çalışmasında *P. agglomerans* suşunun pseudo birinci ve ikinci derece uygunluk durumu incelenmiştir ve R^2 değerleri karşılaştırıldığında pseudo ikinci derece reaksiyon kinetiği ile daha iyi ifade edildiği tespit edilmiştir. Kalay ile hücre arasında kimyasal etkileşim olduğu görülmüştür. Şençam [48] aktif çamurlar ile yaptığı kinetik çalışmasında pseudo ikinci derece reaksiyon kinetiğini daha uygun olduğu tespit etmiştir. Kılıç [46] yine aktif çamurlar yaptığı çalışmada pseudo ikinci derece reaksiyon kinetiğini uygun olduğunu tespit etmiştir.

Yapılan biyosorpsiyon çalışması sonucu *P. agglomerans*'ın kalayı ortamdaki tamamen uzaklaştırması üzerine FTIR analizi yapılmış ve bakterinin hücre yüzeyinde bulunan fonksiyonel gruplardaki farklılıklar belirlenmiştir. 2957 cm^{-1} ve 2924 cm^{-1} de alkil gruplarından ortaya çıkan sinyaller biyosorpsiyondan sonra sırasıyla 2924 cm^{-1} ve 2874 cm^{-1} 'a kaymıştır. Amid I bandı ise biyosorpsiyondan sonra 1636 cm^{-1} 'den 1633 cm^{-1} 'a kaymıştır. Amid II bandı ise saf haldeki biyosorbentte 1539 cm^{-1} 'de görülürken ağır metallerin biyosorpsiyonundan sonra ise bu bant 1537 cm^{-1} bandına kaymıştır. Biyosorpsiyondan önce 1454 cm^{-1} 'de gözükten karboksilat ($-COO^-$) bandı ise biyosorpsiyondan sonra 1453 cm^{-1} civarına kaymıştır. 1057 cm^{-1} deki sülfoksit bandı ise 1055 cm^{-1} 'e kaymıştır. Metal iyonlarının biyosorpsiyonu

çözeltinin fizikokimyasal koşulları ile mikrobiyal kütlede büyük ölçüde mevcut olan aktif bölgelerindeki fonksiyonel grupları üzerindeki değişimler biribiri ile ilişkilidir Xing Wei ve arkadaşları [94] *Bacillus subtilis* ile yaptıkları Cd biyosorpsiyonu çalışmasında 1395 cm^{-1} 'de görülen karboksilat bantlarının Cd biyosorpsiyonundan sonra 1388 cm^{-1} e, 1075 cm^{-1} 'deki sülfoksit bandlarında 1070 cm^{-1} 'e kaydığı gözlenmiştir. Dhankhar ve arkadaşları [95] *S. cerevisiae* ile yaptıkları uranyum giderim çalışmasında 1405.9 cm^{-1} bandının uranyum biyosorpsiyonundan sonra 1377 cm^{-1} e kaydığını tespit etmişlerdir.

P. agglomerans suşunun belli bir konsantrasyon değerinden sonra elektriksel çift tabakanın bastırılmasıyla, bakterinin zeta potansiyeli mutlak değerce azalmaktadır. 20 ppm konsantrasyona kadar stabilitesini koruyamadığı fakat daha yüksek konsantrasyonlarda stabilitesini koruduğu, 60 ppm konsantrasyonda ise stabilitesini tekrar kaybettiği belirlenmiştir. Bu veriler biyosorpsiyon grafiği ile karşılaştırıldığında, grafikte adsorpsiyon ve desorpsiyon olayları ile zeta potansiyometre sonuçları tutarlılık göstermektedir. Marsalek [96] yapmış olduğu çalışmada zeta potansiyelinin adsorpsiyon izotermi ile ilgili olduğunu sonucuna ulaşmıştır. Jittawuttipoka ve arkadaşları [97] *Synechocystis* ile yaptıkları çalışmada zeta potansiyeli incelemişlerdir ve aldıkları sonuçları zeta potansiyeli ile desteklemişlerdir. Klodzinska ve arkadaşları [98] *Staphylococcus aureus* ve *E. coli* ile yaptıkları çalışmada bakteri kültürünün kümelenme yapması sonucu zeta potansiyeli değişimlerini incelemişler ve zeta potansiyelinin daha düşük olduğunu gözlemlemişlerdir.

Bu tez çalışmasında nikel, kobalt ve kalay dirençli suşların değişik pH'lardaki optimum üreme koşulları belirlenmiş, moleküler teknikler kullanılarak tanımlamaları yapılmış ve biyosorpsiyon yetenekleri belirlenmiştir. Mikrobiyal tanımlamada elde edilen veriler sonucunda FAME analizi sonuçlarının düşük SI değerlerinden dolayı güvenilirliğinin düşük olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle 16S rRNA sekans analizleri yapılmıştır. Analizler sonucunda sonucu Sn11 kodlu suş *P. agglomerans*, Ni11 kodlu suş *C. testosteroni*, Co11 kodlu suş ise *S. warneri* olarak tanımlanmıştır. Biyosorpsiyon yeteneklerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalar sonucu *P. agglomerans*'ın 60 ppm'lik kalayı 20 saat sonunda %100 oranında kalay

biyosorpsiyonu yaptığı, diğer suşların ise biyosorpsiyon yeteneğinin olmadığı gözlenmiştir. Tüm bu veriler ışığında *P. agglomerans* yüksek konsantrasyonda kalayı tolere edebilmiş ve kalay biyosorpsiyon yeteneği dikkate alındığında adsorpsiyon kinetiği ve biyoremediasyon çalışmaları için potansiyel olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Akkan, E., İskenderun Körfezi'ndeki Gr (-) Bakterilerin Antibiyotik ve Ağır Metal Dirençlilik Düzeyleri ve Plazmid Profillerinin Saptanması. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Adana, 2009.
- [2] Taylan, Z. S., Özkoç Böke, H., Potansiyel Ağır Metal Kirliliğinin Belirlenmesinde Akuatik Organizmaların Biokullanılabilirliği. BAÜ FBE Dergisi, 9(2): 17-33, 2007.
- [3] Karaboyacı, M., Modifiye Edilmiş Lignoselülozikler ile Ağır Metal Adsorpsiyonu. Doktora Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 2010.
- [4] Cihangir, N., Ağır Metallerin Biyolojik Süreçlerle Biyosorpsiyonu Çalışmaları. Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi, 11(1): 157-161, 1995.
- [5] <http://www.turkcebilgi.com> (Erişim tarihi: 30.09.2013)
- [6] Şener, Ş., Ağır Metallerin Çevresel Etkileri. SDUGEO e-dergi, 1: 33-35, 2006.
- [7] Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S., Metallerin Çevresel Etkileri- I. Metalurji Dergisi, 136: 47-53, 2003.
- [8] Tamilselvan, N., Saurav, K. and Kannabiran, K., Aqueous Solutions by *Sargassum wightii* and *Caulerpa racemosa* Algal Biomass. Journal Ocean Univ. China, 11(1): 52-58, 2012.
- [9] Appenroth, K. J., Definition of Heavy Metals and Their Role in Biological Systems. Soil Biology, 19: 19-28, 2010.
- [10] Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S., Metallerin Çevresel Etkileri-II. Metalurji Dergisi, 137: 46-51, 2004.

- [11] <http://www.food-info.net/tr/metal/tin.htm> (Erişim tarihi: 01.12.2013).
- [12] Wallace, A., Romney, E., Alexander, G. and Kinnear, J., Phytotoxicity and Some İnteractions of the Essential Trace Metal İron, Manganese, Molybdenum, Zince, Copper and Boron. *Soil Science and Plant Analysis*, 8: 741-750, 1977.
- [13] Pearson, T. A., Mensah, G. A., Alexander, R. W., Anderson, J. L., Cannon, R. O., Criqui, M., Fadl, Y. Y., Fortmann, S. P., Hong, Y., Myers, G. L., Rifai, N., Smith, S. C. Jr., Taubert, K., Tracy, R. P., Vinicor, F., Centers for Disease Control and Prevention; American Heart Association. Markers of İnflammation and Cardiovascular Disease: Application to Clinical and Public Health Practice: a Statement for Healthcare Professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*, 107: 499–11, 2003.
- [14] <http://www.inchem.org> (Erişim tarihi: 08.10.2013).
- [15] Howe, P. and Watts, P., Tin and Inorganic Tin Compounds, in *Concise International Chemical Assessment*. World Healt Organisation, Geneva, 2005.
- [16] Koçberber Kılıç, N. ve Dönmez, G., Mikroorganizmalarda Ağır Metal Stresine Yanıtın Proteom Analizi ile Araştırılması. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 6(2): 27-33, 2008.
- [17]. Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği, Çevre ve Orman Bakanlığı, 2004.
- [18] Habashi, F., *Alloys: Preparation, Properties, Applications*, New York: Wiley-VCH, 1998.
- [19] M, Emre, Nikelli ve Nikelsiz Altın Alaşımlarının Geniş Bir Bileşim Aralığında Fiziksel, Kimyasal, Mekanik ve Alerjen Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, 2000.

- [20] Kim, B. Shedd, Cobalt Recycling in the United States in 1998. Geological Survey, 1-16, 1998.
- [21] <http://www.biltek.tubitak.gov.tr/bilgipaket/periodydik/kullanim3.html> (Erişim Tarihi (02.12.2013)).
- [22] Filiz, E., Doğal Kaynaklardan Elde Edilen Adsorbanlarla Sulardan Ağır Metal Giderimi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, 2007.
- [23] Kinoshita, H., Sohma, Y., Ohtake, F., Ishida, M., Kawai, Y., Kitazawa, H., Saito, T. and Kimura, K., Biosorption of Heavy Metals by Lactic Acid Bacteria and Identification of Mercury Binding Protein. *Research in Microbiology*, 164: 701-709, 2013.
- [24] Baik, W. Y., Bae, J. H.J., Cho, K. M. and Hartmeier, W., Biosorption of Heavy Metals Using Whole Mold Mycelia and Parts Thereof. *Bioresource Technology*, 81: 167-170, 2002.
- [25] Ronda, A., Martí'n-Lara, M. A., Dionisio, E., Blazquez, G. and Calero, M., Effect of Lead in Biosorption of Copper by Almond Shell. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44: 466-473, 2013.
- [26] Yılmaz, P., Sulu Ortamlardan Ağır Metallerin Mikroorganizmalar Yoluyla Giderimi. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Ankara, 2006.
- [27] Tekin Balık, O., Tavuk Dişkularından İzole Edilen *Escherichia coli* Suşlarında Ağır Metal Dirençliliğinin Belirlenmesi. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Ankara, 2013.
- [28] Nies, D. H. and Silver, S., Ion Efflux Systems Involved in Bacterial Metal Resistances. *Journal of Industrial Microbiology*, 14: 186-199, 1995.

- [29] Hall, J. L., Cellular Mechanism for Heavy Metal Detoxification and Tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 54(366): 1-11, 2002.
- [30] Koçberber Kılıç, N., Proteomik Yaklaşımla Atıksu Kaynaklı Mikroorganizmalarda Cr(VI) Direnç Yollarının Araştırılması. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Ankara, 2008.
- [31] Nies, D.H., Microbial Heavy Metal Resistance. *Applied Microbiol Biotechnology*, 51: 730-750, 1999.
- [32] Stafford, S. J., Humphreys, D. P. and Lund, P. A., Mutations in *dsbA* and *dsbB*, but not *dsbC*, Lead to an Enhanced Sensitivity of *Escherichia coli* to Hg^{+2} . and Cd^{+2} . *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 174: 179-184, 1999.
- [33] Al-Mathkhury, H. J. F., Afaj, A. H. and Kasid, W. E., Bioremoval of Aquatic Environment Lead by Immobilized Cells of *Enterobacter* spp. *Journal of Life Sciences*, 5: 967-973, 2011.
- [34] Copper and Copper Alloys” <http://www.cda.org.uk/megab2/general/pub121/section7.htm#Product%20Forms> (Erişim tarihi: 11.02.2014)
- [35] Volesky, B. and Holant, Z. R., Biosorption of Heavy Metals. *Biotechnology Progress*, (11): 235-250, 1995.
- [36] Talos, K., Pernyeszi, T., Majdik, C., Hegedúsova, A. and Pager, C., Cadmium Biosorption by Baker’s Yeast in Aqueous Suspensions. *Journal of Serbian Chemical Society*, 77(4): 549-561, 2012.
- [37] Neberal, V.P., Solozhenkin, P.M., Biosorption and Flotation Biomass, Loaded by Precious or Toxic Metals. *The European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection*, 2(3): 151-157, 2002.

- [38] Şahan, T., Atık Sularda Bulunan Bazı Ağır Metallerin Biyosorpsiyon ile Uzaklaştırılması ve Biyosorpsiyon Koşullarının Optimizasyonu. Doktora Tezi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van, 2008.
- [39] <http://blogs.rsc.org/en/2014/03/> (Erişim tarihi 20.04.2014)
- [40] Aslan, S., Bozkurt, Z. And Tekeli, A. N., Removal of Cu (II), Ni (II), Cd (II) and Cr (VI) Ions from Aqueous Solutions by Biosorption Processes. Journal of Engineering and Natural Sciences, 25(2): 209-222, 2006.
- [41] Veglio, F. and Beolchini, F., Removal of Metals by Biosorption: a Review. Hydrometallurgy, 44: 301-316, 1997.
- [42] Gaur N., Flora G., Yadav M. and Tiwari A., A Review with Recent on Bioremediation-Based Abolition of Heavy Metals. Environmental Science, 16(2): 93-180, 2014.
- [43] Davis, T. A., Volesky, B. and Vieira, R., *Sargassum* Seaweed as Biosorbent for Heavy Metals. Water Research, 34(17): 4270-4278, 2000.
- [44] Matheickal, J.T. and Yu, Q., Biosorption of Lead (II) from Aqueous Solutions by *Phellinus Badius*. Minerals Engineering, 10(9): 947-957, 1997.
- [45] Alemdar, S., Biyosorpsiyon Yöntemi ile Kadmiyum Giderimi. Doktora Tezi. Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Zonguldak, 2011.
- [46] Kılıç, M., Kurşun (II) Ve Cıva (II) İyonlarının Biyokütle Üzerine Adsorpsiyonunun İncelenmesi. Doktora Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 2004.
- [47] Boysan, F., Poliüre-Poliamin Reçinesi Kullanılarak Atıksulardaki Ağır Metal Kirliliğinin Adsorpsiyonla Gideriminin İncelenmesi. Doktora Tezi. Sakarya Üniversitesi, Sakarya, 2008.

- [48] Şencan, A., Sulu Çözelti ve Deri Endüstrisi Atıksuyundan Cr⁺⁶ İyonunun Aktif Çamur Biyokütlesi ile Biyosorpsiyonu. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 2006.
- [49] Turan, Z., Atıksulardan Cr⁺⁶ İyonunun Biyosorpsiyon Yöntemi İle Giderimi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, 2012.
- [50] Jeppua, G. P. and Clement, T. P., A Modified Langmuir-Freundlich Isotherm Model for Simulating pH-Dependent Adsorption Effects. Journal of Contaminant Hydrology, 129: 46-53, 2012.
- [51] Başıyigit Kılıç, G. ve Karahan, A. G., Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi ve Laktik Asit Bakterilerinin Tanısında Kullanılması. Gıda, 35(6): 445-452, 2010.
- [52] Önal, S., Yapay Sinir Ağları Metodu ile Kızılırmak Nehri'nin Akım Tahmini. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 2009.
- [53] Bhardwaj, N. K., Duong, T. D. and Nguyen, L. K., Pulp Charge Determination by Different Methods: Effect of Beating, Colloids and Surfaces: Physicochemistry. Engineering, 1: 39-44, 2003.
- [54] Korkmaz, E., Eskişehir Yöresi Sepiyoliti'nin Zeta Potansiyellerinin Tayini. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, 2008.
- [55] Demirel, S., Molecular Techniques for Determining Microbial Diversity in Treatment Systems. Journal of Engineering and Natural Sciences, 30: 179-192, 2012.
- [56] Amann, R. I., Ludwig, W. and Schleifer, K., Phylogenetic Identification and *in situ* Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. Microbiological reviews March, 143-169, 1995.

- [57] Sanz, J. L., Kochling, T., Molecular Biology Techniques Used in Wastewater Treatment. *Process Biochemistry*, 42: 119-133, 2007.
- [58] Faulwetter, J. L., Gagnonb, V., Sundbergc, C., Chazarencd, F., Burra, M.D., Brissonb, J., Campera, A.K. and Stein, O. R., Microbial Processes Influencing Performance of Treatment Wetlands. *Ecological Engineering*, 35: 987-1004, 2009.
- [59] Calli, B., Mertoglu, B., Roest, K., Inanc, B., Comparison of Long-Term Performances and Final Microbial Compositions of Anaerobic Reactors Treating Landfill Leachate. *Bioresource Technology*, 97: 641-647, 2006.
- [60] Kotan, R. and Karagöz, K., *Erwinia amylovora* Strainlerinin Streptomisin Sülfata Karşı Duyarlılıkları ve Strainlerin Yağ Asidi Metil Esterleri ile Antibiyotiğe Duyarlılıkları Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 40(1): 1-7, 2009.
- [61] Sherlock Microbial Identification System MIDI, Inc., Newark, DE. 2001
- [62] Aygün, F., *Vicia Canescens* Populasyonları Arasındaki Varyasyonun RAPD Ve FAME İle Analizi. Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi, Van, 2006.
- [63] Yiğit, N., Esin, A. and Uslu, H., *Candida* Suşlarının İdentifikasyonunda Farklı Yöntemlerin Karşılaştırılması. *Türk Mikrobiyoloji Dergisi*, 38(2): 83-86, 2008.
- [64] Welch, D. F., Applications of Cellular Fatty Acid Analysis. *Clinical Microbiology*, 1: 422-438, 1991.
- [65] Tozoğlu, S., Uslu, H., Ertaş, Ü. ve Kaya, Ö., Orofasiyal Enfeksiyonlardan İzole Edilen Mikroorganizmaların Antibiyotik Duyarlılıkları. *Düzce Tıp Dergisi*, 12(1): 48-53, 2010.

- [66] Beyhan, Y. E., Samsun Yöresi Mandalarda Kistik Ekinokokozisin Yayınllığı Suşların PZR ve DNA Dizi Analizi ile Tesbiti. Doktora Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, 2011.
- [67] 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.
- [68] Brown, T.A., Gen klonlama ve DNA Analizi. Nobel Yayın Dağıtımı, Ankara, 2009.
- [69] Madigan, M.T. and Martinko, J.M., Pearson education. Brock of Microorganism. USA, 1: 309-328, 2010.
- [70]. Yelboğa, E., Biyofilmde 16S rDNA Yöntemi Kullanılarak Mikroorganizma Tayini. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, 2008.
- [71] Monis, P.T., Andrews, R. H. and Saint, C. P., Molecular Biology Techniques in Parasite Ecology. International Journal for Parasitology, 32: 551-562, 2002.
- [72] Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R., DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences, 74(12): 5463-5467, 1977.
- [73] Maxam, A. M. and Gilbert, W., A New Method for Sequencing DNA. Process National , 74(2): 560-564, 1977.
- [74] Kochan, C., Nikel ve Kobalt Dirençliliği Olan Bakterilerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale, 2007.

- [75] Orman, N., Lityum ve Kalay Dirençliliği Olan Bakterilerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale, 2007.
- [76] Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A., and Olsen, G. J., Critical Evaluation of Two Primers Commonly Used for Amplification of Bacterial 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8): 2461-2470, 2008.
- [77] S. Önal, Yapay Sinir Ağları Metodu ile Kızılırmak Nehri'nin Akım Tahmini. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 2009
- [78] <http://earth.google.com> (Erişim tarihi: 18.03.2014)
- [79] Sherlock Microbial Identification System MIDI, Inc., Newark, DE. 2001.
- [80] Harwood, C.R. and Cutting, S.M.; Wiley J., *Molecular Biological Methods for Bacillus*. *FEBS Letters*, 287(2), 1991.
- [81] Aktan, Y., Tan, S., Içgen, B., Characterization of Lead-Resistant River Isolate *Enterococcus faecalis* and Assessment of Its Multiple Metal and Antibiotic Resistance. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185: 5285-5293, 2013.
- [82] Gupta, V.K., Rastogi, A., Equilibrium and Kinetic Modelling of Cadmium(II) Biosorption by Nonliving Algal Biomass *Oedogonium* sp. from Aqueous Phase. *Journal of Hazardous Materials*, 153: 759-766, 2008.
- [83] Jackson, V. A. Paulse, A.N. , Odendaal, J. P. and Khan, W., Investigation into the Metal Contamination of the Plankenburg and Diep Rivers, Western Cape, South Africa. *Water SA*, 35(3): 289-300, 2009.

- [84] Xia-Fang, S. and Juan-Juan, X., Improvement of Rape (*Brassica napus*) Plant Growth and Cadmium Uptake by Cadmium-Resistant Bacteria. *Chemosphere*, 64(6): 1036-1042, 2006.
- [85] Vreeland, R.H., Rosenzweig, W. H., Lowenstein, T., Satterfield, C. and Ventosa, A., Fatty Acid and DNA Analyses of Permian Bacteria Isolated from Ancient Salt Crystals Reveal Differences with Their Modern Relatives. *Extremophiles*, 10(1): 71-78, 2006.
- [86] Demirel, S., Molecular Techniques for Determining Microbial Diversity in Treatment Systems. *Journal of Engineering and Natural Sciences*, 179-192, 2012.
- [87] Mrik, M., Aysan, Y. and Şahin, F., Whole Cell Fatty Acid Composition of *Xanthomonas Axonopodis. Vesicatoria* Strains, Isolated from Pepper. *Journal of Turkish Phytopathology*, 34(1-3): 17-25, 2005.
- [88] Ovcharenko, L. P., Voznyuk, T. M., Zaetz, I. E., Potopalsky, A. I., Reva, O. and Kozyrovska, N. O., a Mobile Genetic Element in *Serratia Marcescens*, a Causative Agent of Onion Disease. *Biopolymers and Cell*. 26(4), 2010.
- [89] Ozdemir, G., Ceyhan, N., Ozturk, T., Akirmak, F., Cosar, T., Biosorption of Chromium(VI), Cadmium(II) and Copper(II) by *Pantoea* sp. *Chemical Engineering Journal*, 102: 249–253, 2004.
- [90] Suriya, J., Bharathiraja, S. and Rajasekaran, R., Biosorption of Heavy Metals by Biomass of *Enterobacter cloacae* Isolated from Metal-Polluted Soils. *International Journal of ChemTech Research*, 5(3): 1329-1338, 2013.
- [91] Hossain, M. and Anantharaman, N., Studies on Bacterial Growth and Lead(IV) Biosorption Using *Bacillus Subtilis*. *Indian Journal of Chemical Technology*, 13: 591-596, 2006.

- [92] Cirik, Y., Büyükkateş, Y., Merdivan, M., Ak, İ. ve Göksan, T., Cu (II) ve Co (II) İyonlarının *Spirulina Platensis* (Cyanophyceae) ile Biyosorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 5(1): 7-12, 2012.
- [93] Nelson, P.O., Chung, A. K. and Hudson, M. C., Factors Affecting the Fate of Heavy Metal in the Activated Sludge Process. *Journal Water Pollution Control Federation*, 53(8): 1323-1325, 1981.
- [94] Wei, X., Fang, L., Cai, P., Huang, Q., Chen, H., Liang, W. and Rong, X., Influence of Extracellular Polymeric Substances (EPS) on Cd Adsorption by Bacteria, *Environmental Pollution*, 159:1369-1374, 2011.
- [95] Dhankhar, R., Hooda, A., Solanki, R. and Sainger, P. A., *Saccharomyces cerevisiae*: a Potential Biosorbent for Biosorption of Uranium. *International Journal of Engineering Science and Technology*, 3(6): 5397-5407, 2011.
- [96] Marsalek, R., The Adsorption of Pb^{+2} , Cu^{+2} And Cr^{+3} on Ferro-Precipitate. *International Conference on Environment and Industrial Innovation*, 12, 2011.
- [97] Jittawuttipoka, T., Planchon, M., Spalla, O., Benzerara, K., Guyot, F., Cassier-Chauvat, C. and Chauvat, F., Multidisciplinary Evidences that Synechocystis PCC6803 Exopolysaccharides Operate in Cell Sedimentation and Protection against Salt and Metal Stresses. *Plos One*, 8(2), 2013.
- [98] Klodzinska, E., Szumski, M., Dziubakiewicz, E., Hryniewicz, K., Skwarek, E. Janusz, W. and Buszewski, B., Effect of Zeta Potential Value on Bacterial Behavior During Electrophoretic Separation. *Electrophoresis*, 31: 1590-1596, 2010.