

**ÇEŞİTLİ TATLI SULARDAN İZOLE EDİLEN BAZI *Synechocystis* sp.
İZOLATLARINA Cr(VI) VE Cd(II) AĞIR METALLERİNİN ETKİSİ
VE GİDERİMİ: METAL GİDERİMİNİN PROTEİN VE TİYOLLER
AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Şahlan ÖZTÜRK

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ARALIK 2008
ANKARA**

Şahlan Öztürk tarafından hazırlanan ÇEŞİTLİ TATLI SULARDAN İZOLE EDİLEN BAZI *Synechocystis* sp. İZOLATLARINA Cr(VI) VE Cd(II) AĞIR METALLERİNİN ETKİSİ VE GİDERİMİ: METAL GİDERİMİNİN PROTEİN VE TİYOLLER AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ adlı bu tezin Doktora tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

(Prof. Dr. Belma ASLIM)

.....

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

(Prof. Dr. Emir CANSUNAR)

.....

(Biyoloji, Hacettepe Üniversitesi)

(Prof. Dr. Belma ASLIM)

.....

(Biyoloji, Gazi Üniversitesi)

(Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ)

.....

(Biyoloji, Ankara Üniversitesi)

(Prof. Dr. Yavuz BEYATLI)

.....

(Biyoloji, Gazi Üniversitesi)

(Prof. Dr. A. Rehber TÜRKER)

.....

(Kimya, Gazi Üniversitesi)

Tarih: 22.12.2008

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Doktora derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Nail ÜNSAL

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Şahlan ÖZTÜRK

**ÇEŞİTLİ TATLI SULARDAN İZOLE EDİLEN BAZI *Synechocystis* sp.
İZOLATLARINA Cr(VI) VE Cd(II) AĞIR METALLERİNİN ETKİSİ VE
GİDERİMİ: METAL GİDERİMİNİN PROTEİN VE TİYOLLER AÇISINDAN
DEĞERLENDİRİLMESİ
(Doktora Tezi)**

Şahlan ÖZTÜRK

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Aralık, 2008

ÖZET

Bu çalışmada Mogan Gölü, Kurtboğazi Barajı, Uncalı Deresi, Bafa Gölü, Hatim Çayı, Harikalar Diyarı Göleti ve Kızılırmak Nehri gibi tatlı su kaynaklarından alınan örneklerden toplam 15 adet siyanobakter izole edilmiştir. İzolatlar morfolojileri, bölünme fizyolojilerine ve 16S rRNA'larına göre *Synechocystis* sp. olarak tanımlanmışlardır. Tanımlanan izolatlar 5-50 ppm Cr(VI) ve Cd(II) konsantrasyonlarına maruz bırakılarak klorofil-a analizi ve EC₅₀ değerleri ile bu metallere karşı canlılıkları tespit edilmiştir. Cr(VI) ve Cd(II) metalllerinde canlılığını en çok koruyabilen izolat *Synechocystis* sp. BASO670 olarak belirlenmiş ve bütün deneylerde bu izolat kullanılmıştır. Biyosorpsiyon deneyinde *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının cansız, tutuklanmış canlı ve cansız hücreleri kullanılarak pH, biyokütle, sıcaklık, metal konsantrasyonları ve zaman gibi değişkenlerin etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının her üç biyokütlesinin Cr(VI) biyosorpsiyonu için en uygun koşulların; pH 2, 0,05 g biyokütle (cansız), 30 küre (tutuklanmış), 25 °C, 100 ppm metal konsantrasyonu ve 60 dak olduğu, Cd(II) biyosorpsiyonu için en uygun koşulların da; pH 7, 0,05 g biyokütle (cansız), 30 küre (tutuklanmış), 25 °C, 100 ppm metal konsantrasyonu ve 60 dak zaman olduğu tespit edilmiştir. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının

tutuklanmış kuru hücreleri her iki metali de yüksek oranda biyosorbe ettiği tespit edilmiştir. Biyobirikim denemelerinde *Synechocystis* sp. BASO670 izolatu 10 ppm Cr(VI), 10 ppm Cd(II) ve 10 ppm Cr(VI) ve 10 ppm Cd(II) metal karışımlarına maruz bırakılmış ve denemeler sonucunda bu izolatın Cd(II)'yi Cr(VI)'ya göre daha yüksek oranda tuttuğu tespit edilmiştir. Biyobirikim denemelerinde kullanılan kontrol ve metallere maruz kalan izolatın taramalı elektron mikroskop görüntüleri çekilerek elemental analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre Cr(VI) ve Cd(II)'ye maruz kalan hücrelerde eksopolisakkarit (EPS) yapısının daha çok sentezlendiği ve metal karışımına maruz kalan hücrelerde morfolojik bozukluklar meydana geldiği tespit edilmiştir. Biyobirikim deneyleri ile aynı şartlarda metallere maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının proteinleri çıkarılarak SDS-PAGE'de yürütülmüştür. Metale maruz kalan hücrelerin kontrole göre protein miktarlarında değişiklikler olduğu, özellikle Cr(VI)'ya maruz kalan hücrelerde farklı bir proteinin sentezlendiği ve metal karışımlarına maruz kalan hücrelerin bazı proteinlerinin kaybolduğu saptanmıştır. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatu biyobirikim deneyi ile aynı şartlarda metallere maruz bırakılarak toplam tiyol, proteine bağlı olmayan tiyol ve proteine bağlı tiyol miktarları hesaplanmış, özellikle proteine bağlı tiyol miktarlarında metale bağlı artış olduğu tespit edilmiştir.

Bilim Kodu : 203.1.023

Anahtar Kelimeler : Ağır metal, krom(VI), kadmiyum(II), tolerans, siyanobakter, biyosorpsiyon, biyobirikim, 16S rRNA, SDS-Page, toplam protein profili, tiyol

Sayfa Adedi : 183

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Belma ASLIM

**EFFECT AND REMOVAL OF Cr(VI) AND Cd(II) HEAVY METALS ON
SOME *Synechocystis* sp. STRAINS ISOLATED FROM DIFFERENT
FRESHWATERS: ESTIMATION OF METAL REMOVAL IN TERMS OF
PROTEINS AND THIOLS**

(Ph. D. Thesis)

Şahlan Öztürk

**GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
December, 2008**

ABSTRACT

In the present study 15 cyanobacterial isolates were isolated from freshwaters such as Mogan Lake, Kurtboğazı Damm, Uncalı Stream, Bafa Lake, Hatim Stream, Harikalar Diyarı Pond and Kızılırmak River. Isolates were identified according to their morphologies, cell division physiology and 16S rRNA as *Synechocystis* sp. Identified isolates were exposed to 5-50 ppm Cr(VI) and Cd(II) concentrations and the aliveness of the isolates were determined by chlorophyll-a analysis and EC₅₀ values. *Synechocystis* sp. BASO670 was selected as the most protected its aliveness to Cr(VI) and Cd(II) and this strain was used at each experiments. Dead, immobilized dead and immobilized alive biomass of the *Synechocystis* sp. BASO670 were used for biosorption of Cr(VI) and Cd(II) and the effect of parameters such as pH, biomass, temperature, metal concentrations and time on biosorption was investigated. As a result optimum conditions for Cr(VI) biosorption of different biomasses of *Synechocystis* sp. BASO670 were; pH 2, 0,05 g (dead biomass)- 30 bead (immobilized biomass), 25 °C, 100 ppm metal concentrations and 60 min, optimum conditions for Cd(II) were; pH 7, 0,05 g (dead biomass) - 30 beads (immobilized biomass), 25 °C, 100 ppm metal concentrations and 60 min. Maximum biosorption for both metals

were determined at immobilized dead biomass of *Synechocystis* sp. BASO670. *Synechocystis* sp. BASO670 was exposed to 10 ppm Cr(VI), 10 ppm Cd(II) and 10 ppm Cr(VI) and 10 ppm Cd(II) metal mixture for bioaccumulation and as a result, this isolate was accumulate high percentage of Cd(II) than Cr(VI). Isolate wich was exposed to metals at the same conditions of bioaccumulation was also analysed by scanning electrom microscope (SEM) and elemental analysis were determined. As a result cells exposed to Cr(VI) and Cd(II), produced more exopolysaccharides and morphological defects were determined at cells exposed to metal mixture whwn compared with control. Also, protein profiles by SDS-PAGE of *Synechocystis* sp. BASO670 isolate which was exposed to metals at the same conditions of bioaccumulation, were determined by SDS-PAGE. When compared with control, some differences at protein values, a different protein synthesis at the cells exposed to Cr(VI) and some missing proteins at the cells exposed to metal mixture were detected. Also *Synechocystis* sp. BASO670 was evaluated with metals at the same conditions of bioaccumulation and total thiol, non-protein thiol and protein binded thiol values were determined. It was determined an increase especially at the protein binded thiols levels of the isolate exposed to metals.

Science Code : 203.1.023

Key Words : Heavy metal, chromium(VI), cadmium(II), tolerance, cyanobacteria, biosorption, bioaccumulation, 16S rRNA, SDS-Page, total protein profile, thiol

Page Number: 183

Adviser : Prof. Dr. Belma ASLIM

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında beni her konuda destekleyen, tecrübesi, bilgileri ve önerileri ile yönlendiren, saygıdeğer hocam sayın Prof. Dr. Belma ASLİM'a; tez izleme komitesinde yer alan sayın hocalarım Prof. Dr. Yavuz BEYATLI ve Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ'e tezime yaptıkları katkılardan dolayı ayrıca teşekkür ediyorum. Çalışmalarım sırasında metal tayinlerine yardımcı olan Doç. Dr. Adalet TUNCELİ'ye, Araş. Gör. Orhan Murat KALFA'ya, Araş. Gör. Özcan YALÇINKAYA'ya, bilgi ve görüşlerinden her zaman yararlandığım değerli hocam Prof. Dr. Rehber TÜRKER'e, taramalı elektron mikroskop çalışmalarında bilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın Prof. Dr. Zekiye SULUDERE'ye, Marmara Üniversitesinde EDS analizlerimi yapan Yüksek Mühendis Mustafa İLHAN'a teşekkür ederim. Çalışmalarım boyunca bilgi ve görüşlerinden her zaman yararlandığım, değerli hocam Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ'a ve laboratuarda çalışan tüm arkadaşlara saygı ve sevgilerimle teşekkür ederim. Ayrıca doktora çalışmam boyunca maddi, manevi destekleri ile her zaman yanımda olan sevgili eşim Aysu ÖZTÜRK'e, oğlum Doruk Yiğit ÖZTÜRK'e, anneme ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xv
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xxi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. Atık Sular	5
2.2. Ağır Metaller.....	7
2.2.1. Krom, kadmiyum kirlenmesi ve etkileri.....	8
2.2.2 Atık sulardan ağır metallerin giderimi.....	10
2.3. Mikroorganizma-Metal İlişkisi	11
2.3.1. Mikroorganizmalarda metal alınımı.....	12
2.3.2. Mikroorganizmalarda hücre duvar yapısı ve metal alınımı arasındaki ilişki	16
2.3.3. Biyosorpsiyon.....	19
2.3.4. Biyobirikim.....	20
2.3.5. Biyosorpsiyonda kullanılan mikroorganizmalar	22
2.3.6. Biyosorpsiyonda tutuklanmış mikroorganizmaların kullanımı	23
2.3.7 Tutuklama mekanizmaları.....	24

Sayfa

2.4. Siyanobakteriler	26
2.4.1. Siyanobakterilerin tarihçesi ve sınıflandırılması.....	27
2.4.2. Siyanobakterilerin teşhisi ve teşhisinde kullanılan yöntemler	29
2.5. Siyanobakterilerin Genel Özellikleri.....	31
2.5.1. Habitat	31
2.5.2. Morfolojisi	32
2.5.3. Sitoplazma.....	33
2.5.4. Hücre duvarı.....	34
2.5.5. Siyanobakter ekzopolisakkaritlerinin yapısı	35
2.5.6. Hareket	36
2.5.7. Siyanobakterilerde fotosentez ve azot fiksasyonu	37
2.5.8. Üreme	38
2.6. Siyanobakteriler ile İlgili Moleküler Çalışmalar.....	40
2.7. Siyanobakterilerin Ürettiği Metabolitler ve Biyoteknolojide Kullanım Alanları.....	41
2.8. Siyanobakteriler ile Ağır Metal Giderimi	43
3. MATERYAL VE METOT	47
3.1. Materyal.....	47
3.1.1. Siyanobakterilerin izolasyon ve tanımlanmaları	47
3.1.2. Kültürlerin gelişim ortamları.....	49
3.1.3. Araştırmada kullanılan besiortamları	51
3.2. Metot	52
3.2.1. İzolatların muhafazası	52

Sayfa

3.2.2. Biyokütlenin ölçülmesi	52
3.2.3. Siyanobakter izolatlarının ışık mikroskobu görüntüleri.....	53
3.2.4. Metal iyon çözeltilerinin hazırlanması.....	53
3.2.5. Toksidite ve toleranslarının tespiti	54
3.2.6. Tutuklanmış materyalin hazırlanması	54
3.2.7. Biyosorpsiyon deneyleri	55
3.2.8. Desorpsiyon deneyleri.....	56
3.2.9. Biyobirikim deneyleri	57
3.2.10. Taramalı elektron mikroskop (SEM) için hücrelerin hazırlanması	58
3.2.11. Metalli ve kontrol ortamlarında geliştirilmiş siyanobakterilerin protein çalışması	60
3.2.12. SDS-PAGE jellerinin hazırlanması.....	60
3.2.13. Metalli ve kontrol ortamlarında geliştirilmiş siyanobakterilerin tiyol miktarlarının belirlenmesi.....	62
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	64
4.1. İzolatların Tanımlama Sonuçları	64
4.2. İzolatların Canlılığına ve Gelişimine Cr(VI) ve Cd(II)'nin Etkisi.....	68
4.2.1. İzolatların canlılığına Cr(VI)'nin etkisi	68
4.2.2. İzolatların canlılığına Cd(II)'nin etkisi	77
4.2.3. Probit analizi ile Cr(VI) ve Cd(II)'nin EC ₅₀ (% 50'sini öldüren tahmini metal konsantrasyonu) değerleri.....	86
4.3. Biyosorpsiyon Sonuçları	88
4.3.1. Cr(VI) biyosorpsiyonu	88
4.3.2. Cd(II) biyosorpsiyonu	95

Sayfa

4.4. Biyosorpsiyon-Desorpsiyon Döngüsü ve Biyokütlelerin Tekrar Kullanımı.....	103
4.4.1. Cr(VI) desorpsiyonu ve biyokütlelerin tekrar kullanılabilirliği.....	103
4.4.2. Cd(II) desorpsiyonu ve biyokütlelerin tekrar kullanılabilirliği.....	107
4.5. Biyobirikim.....	112
4.5.1. Cr(VI) biyobirikimi.....	112
4.5.2. Cd(II) biyobirikimi.....	114
4.5.3. Cr(VI) ve Cd(II) metal karışımının biyobirikimi.....	115
4.6. SEM Analizi İle Cr(VI), Cd(II) Ve Cr(VI)+Cd(II)'nin <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 İzolatına Etkilerinin İncelenmesi.....	118
4.6.1. Kontrol hücrelerinin elektron mikroskop görüntüleri.....	118
4.6.2. SEM ile Cr(VI)'nin <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatına etkisinin belirlenmesi ve EDS analiz sonuçları.....	119
4.6.3. SEM ile Cd(II)'nin <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatına etkisinin belirlenmesi ve EDS analiz sonuçları.....	121
4.6.4. SEM ile Cr(VI) ve Cd(II) ağır metal karışımının <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatına etkisinin belirlenmesi ve EDS analiz sonuçları.....	122
4.7. Cr(VI), Cd(II) Ve Cr(VI)+Cd(II) Ağır Metallerine Maruz Kalan <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 İzolatının Ve Kontrol Hücrelerinin Protein Profillerine Etkisi.....	125
4.8. Metalli Ve Kontrol Ortamlarında Geliştirilmiş <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 İzolatının TiyoL Miktarlarının Belirlenmesi.....	127
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	131
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	156
KAYNAKLAR.....	159
ÖZGEÇMİŞ.....	181

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Türkiye’de ve dünyada kabul edilen içme suyu standartları	6
Çizelge 2.2. Prokaryotlarda metal düzenleyici protein grupları	14
Çizelge 2.3. Siyanobakter filumuna ait takımlar ve başlıca cinsler	31
Çizelge 2.4. Bazı mikroalglerin Cr(VI) ve Cd(II) alma kapasiteleri.....	45
Çizelge 3.1. Primer sekansları, optimal annealing sıcaklıkları ve hedeflenen bölgeler.....	49
Çizelge 3.2. Çalışılan elementler için aletsel parametreler	56
Çizelge 4.1. İzolatların izole edildiği tatlı su kaynakları ve cins adları	65
Çizelge 4.2. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının her iki primerin birleşmesi ile oluşan gen bölgesinin dizi analizi (1262 bp)	67
Çizelge 4.3. BASO670 izolatının 16S rDNA sekansının NCBI Gen Bankası sonuçlarına göre % benzerlikleri.....	67
Çizelge 4.4. Siyanobakter izolatlarının EC ₅₀ değerleri	87
Çizelge 4.5. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının kontrol hücrelerinin, hücre yüzeyinin olduğu A bölgesinin EDS analizi	119
Çizelge 4.6. Cr(VI)’ya maruz kalan <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının hücrelerinin EPS’ nin yoğun olduğu A bölgesinin EDS analizi	121
Çizelge 4.7. Cr(VI)’ya maruz kalan <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının pürüzlü hücre yüzeyine sahip B bölgesinin EDS analizi.....	121
Çizelge 4.8. Cd(II)’ye maruz kalan <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının hücrelerinin EPS’ nin yoğun olduğu A bölgesinin EDS analizi	122
Çizelge 4.9. Cd(II)’ye maruz kalan <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının pürüzlü hücre yüzeyine sahip B bölgesinin EDS analizi.....	122

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.10. A bölgesindeki morfolojik anormalliğe sahip hücrenin Cr(VI) ve Cd(II) metal karışımı bakımından EDS analiz sonuçları.....	124
Çizelge 4.11. EPS'nin yoğun olduğu B bölgesinde Cr(VI) ve Cd(II) metal karışımı bakımından EDS analiz sonuçları.....	124

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Biyosorpsiyon mekanizmaları. (A) Hücre metabolizmasına göre sınıflandırma. (B) Metal gideriminin meydana geldiği yere göre sınıflandırma	11
Şekil 2.2. Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarının şematik diyagramı	18
Şekil 2.3. Siyanobakterilerin evrimsel soy ağacındaki yeri.....	28
Şekil 2.4. İpliksi siyanobakterilerde hormogonyum oluşumu.....	39
Şekil 2.5. İpliksi siyanobakterilerde hormogonyum oluşumu.....	39
Şekil 3.1. Şematik olarak siyanobakter izolasyonu	47
Şekil 4.1. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670'in 12 gün boyunca canlılığına Cr(VI)'nın etkisi.....	69
Şekil 4.2. <i>Synechocystis</i> sp. BASO444'ün 12 gün boyunca canlılığına Cr(VI)'nın etkisi.....	70
Şekil 4.3. <i>Synechocystis</i> sp. BASO500'ün 12 gün boyunca canlılığına Cr(VI)'nın etkisi.....	70
Şekil 4.4. <i>Synechocystis</i> sp. BASO501'in 12 gün boyunca canlılığına Cr(VI)'nın etkisi.....	71
Şekil 4.5. <i>Synechocystis</i> sp. BASO502'nin 12 gün boyunca canlılığına Cr(VI)'nın etkisi.....	71
Şekil 4.6. <i>Synechocystis</i> sp. BASO503'ün 12 gün boyunca canlılığına Cr(VI)'nın etkisi.....	72
Şekil 4.7. <i>Synechocystis</i> sp. BASO504'ün 12 gün boyunca canlılığına Cr(VI)'nın etkisi.....	72
Şekil 4.8. <i>Synechocystis</i> sp. BASO506'nın 12 gün boyunca canlılığına Cr(VI)'nın etkisi.....	73
Şekil 4.9. <i>Synechocystis</i> sp. BASO507'nin 12 gün boyunca canlılığına Cr(VI)'nın etkisi.....	73

Şekil	Sayfa
Şekil 4.10. <i>Synechocystis</i> sp. BASO508'in 12 gün boyunca canlılığına Cr(VI)'nin etkisi.....	74
Şekil 4.11. <i>Synechocystis</i> sp. BASO509'un 12 gün boyunca canlılığına Cr(VI)'nin etkisi.....	74
Şekil 4.12. <i>Synechocystis</i> sp. BASO510'un 12 gün boyunca canlılığına Cr(VI)'nin etkisi.....	75
Şekil 4.13. <i>Synechocystis</i> sp. BASO511 in 12 gün boyunca canlılığına Cr(VI)'nin etkisi.....	75
Şekil 4.14. <i>Synechocystis</i> sp. BASO671'in 12 gün boyunca canlılığına Cr(VI)'nin etkisi.....	76
Şekil 4.15. <i>Synechocystis</i> sp. BASO672'nin 12 gün boyunca canlılığına Cr(VI)'nin etkisi.....	76
Şekil 4.16. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670'in 12 gün boyunca canlılığına Cd(II)'nin etkisi.....	78
Şekil 4.17. <i>Synechocystis</i> sp. BASO444'ün 12 gün boyunca canlılığına Cd(II)'nin etkisi.....	79
Şekil 4.18. <i>Synechocystis</i> sp. BASO500'ün 12 gün boyunca canlılığına Cd(II)'nin etkisi.....	79
Şekil 4.19. <i>Synechocystis</i> sp. BASO501'in 12 gün boyunca canlılığına Cd(II)'nin etkisi.....	80
Şekil 4.20. <i>Synechocystis</i> sp. BASO502'nin 12 gün boyunca canlılığına Cd(II)'nin etkisi.....	80
Şekil 4.21. <i>Synechocystis</i> sp. BASO503'ün 12 gün boyunca canlılığına Cd(II)'nin etkisi.....	81
Şekil 4.22. <i>Synechocystis</i> sp. BASO504'ün 12 gün boyunca canlılığına Cd(II)'nin etkisi.....	81
Şekil 4.23. <i>Synechocystis</i> sp. BASO506'nın 12 gün boyunca canlılığına Cd(II)'nin etkisi.....	82
Şekil 4.24. <i>Synechocystis</i> sp. BASO507'nin 12 gün boyunca canlılığına Cd(II)'nin etkisi.....	82

Şekil	Sayfa
Şekil 4.25. <i>Synechocystis</i> sp. BASO508'in 12 gün boyunca canlılığına Cd(II)'nin etkisi.....	83
Şekil 4.26. <i>Synechocystis</i> sp. BASO509'un 12 gün boyunca canlılığına Cd(II)'nin etkisi.....	83
Şekil 4.27. <i>Synechocystis</i> sp. BASO510'un 12 gün boyunca canlılığına Cd(II)'nin etkisi.....	84
Şekil 4.28. <i>Synechocystis</i> sp. BASO511'in 12 gün boyunca canlılığına Cd(II)'nin etkisi.....	84
Şekil 4.29. <i>Synechocystis</i> sp. BASO671'in 12 gün boyunca canlılığına Cd(II)'nin etkisi.....	85
Şekil 4.30. <i>Synechocystis</i> sp. BASO672'nin 12 gün boyunca canlılığına Cd(II)'nin etkisi.....	85
Şekil 4.31. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının cansız örneklerinin pH'ya bağlı Cr(VI) biyosorpsiyonu (0,05 g biyokütle; 25 °C; 100 ppm Cr(VI); 60 dak)	89
Şekil 4.32. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının cansız örneklerinin biyokütle miktarına bağlı Cr(VI) biyosorpsiyonu (pH 2; 25 °C; 100 ppm Cr(VI); 60 dak)	89
Şekil 4.33. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının cansız örneklerinin sıcaklığa bağlı Cr(VI) biyosorpsiyonu (pH 2; 0,05 g biyokütle; 100 ppm Cr(VI); 60 dak).....	90
Şekil 4.34. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının cansız örneklerinin Cr(VI) konsantrasyonlarına bağlı Cr(VI) biyosorpsiyonu (pH 2; 0,05 g biyokütle; 25 °C; 60 dak)	90
Şekil 4.35. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının cansız örneklerinin zamana bağlı Cr(VI) biyosorpsiyonu (pH 2; 0,05 g biyokütle; 25 °C; 100 ppm Cr(VI))	91
Şekil 4.36. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının tutuklanmış canlı ve cansız örneklerinin pH'ya bağlı Cr(VI) biyosorpsiyonu (30' ar küre; 25 °C; 100 ppm Cr(VI); 60 dak)	92
Şekil 4.37. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının tutuklanmış canlı ve cansız örneklerinin biyokütle miktarlarına bağlı Cr(VI) biyosorpsiyonu (pH 2; 25 °C; 100 ppm Cr(VI); 60 dak)	93

Şekil	Sayfa
Şekil 4.38. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının tutuklanmış canlı ve cansız örneklerinin sıcaklığa bağlı Cr(VI) biyosorpsiyonu (pH 2; 30' ar küre; 100 ppm Cr(VI); 60 dak).....	93
Şekil 4.39. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının tutuklanmış canlı ve cansız hücrelerinin Cr(VI) konsantrasyonlarına bağlı Cr(VI) biyosorpsiyonu (pH 2; 30' ar küre; 25 °C; 60 dak).....	94
Şekil 4.40. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının tutuklanmış canlı ve cansız örneklerinin zamana bağlı Cr(VI) biyosorpsiyonu (pH 2; 30' ar küre; 25 °C; 100 ppm Cr(VI))	95
Şekil 4.41. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının cansız örneklerinin pH'ya bağlı Cd(II) biyosorpsiyonu (0,05 g biyokütle; 25 °C; 100 ppm Cd(II); 60 dak)	96
Şekil 4.42. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının cansız örneklerinin biyokütle miktarına bağlı Cd(II) biyosorpsiyonu (pH 7; 25 °C; 100 ppm Cd(II); 60 dak)	97
Şekil 4.43. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının cansız örneklerinin sıcaklığa bağlı Cd(II) biyosorpsiyonu (pH 7; 0,05 g biyokütle; 100 ppm Cd(II); 60 dak)	97
Şekil 4.44. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının cansız örneklerinin Cd(II) konsantrasyonlarına bağlı Cd(II) biyosorpsiyonu (pH 7; 0,05 g biyokütle; 25 °C; 60 dak).....	98
Şekil 4.45. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının cansız örneklerinin zamana bağlı Cd(II) biyosorpsiyonu (pH 7; 0,05 g biyokütle; 25 °C; 100 ppm Cd(II))	99
Şekil 4.46. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının tutuklanmış canlı ve cansız örneklerinin pH'ya bağlı Cd(II) biyosorpsiyonu (30' ar küre; 25 °C; 100 ppm Cd(II); 60 dak)	100
Şekil 4.47. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının tutuklanmış canlı ve cansız örneklerinin biyokütle miktarına bağlı Cd(II) biyosorpsiyonu (pH 7; 25 °C; 100 ppm Cd(II); 60 dak)	100
Şekil 4.48. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının tutuklanmış canlı ve cansız örneklerinin sıcaklığa bağlı Cd(II) biyosorpsiyonu (pH 7; 30' ar küre; 100 ppm Cd(II); 60 dak)	101

Şekil	Sayfa
Şekil 4.49. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının tutuklanmış canlı ve cansız örneklerinin Cd(II) konsantrasyonlarına bağlı Cd(II) biyosorpsiyonu (pH 7; 30' ar küre; 100 ppm Cd(II); 60 dak).....	102
Şekil 4.50. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının tutuklanmış canlı ve cansız örneklerinin zamana bağlı Cd(II) biyosorpsiyonu (pH 7; 30' ar küre; 25 °C; 100 ppm Cd(II))	102
Şekil 4.51. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının cansız hücrelerinin Cr(VI) biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüleri (pH 2; 0,05 g biyokütle; 25 °C; 100 ppm Cr(VI), 60 dak.)	104
Şekil 4.52. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının tutuklanmış cansız hücrelerinin Cr(VI) biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüleri (pH 2; 30 küre; 25 °C; 100 ppm Cr(VI), 60 dak.)	105
Şekil 4.53. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının tutuklanmış canlı hücrelerinin Cr(VI) biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüleri (pH 2; 30 küre; 25 °C; 100 ppm Cr(VI), 60 dak.)	106
Şekil 4.54. Boş kürelerin Cr(VI) biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüleri (pH 2; 30 küre; 25 °C; 100 ppm Cr(VI), 60 dak.)	107
Şekil 4.55. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının cansız hücrelerinin Cd(II) biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüleri (pH 7; 0,05 g biyokütle; 25 °C; 100 ppm Cd(II), 60 dak.)	108
Şekil 4.56. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının tutuklanmış cansız hücrelerinin Cd(II) biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüleri (pH 7; 30 küre; 25 °C; 100 ppm Cd(II), 60 dak.)	109
Şekil 4.57. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının tutuklanmış canlı hücrelerinin Cd(II) biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüleri (pH 7; 30 küre; 25 °C; 100 ppm Cd(II), 60 dak.)	110
Şekil 4.58. Boş kürelerin Cd(II) biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüleri (pH 7; 30 küre; 25 °C; 100 ppm Cd(II), 60 dak.)	111
Şekil 4.59. Biyobirikim ile suda kalan % Cr(VI) miktarı	112
Şekil 4.60. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının hücre yüzeyinde toplanan % Cr(VI) miktarı	113
Şekil 4.61. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının hücre içine alınan % Cr(VI) miktarı	113

Şekil	Sayfa
Şekil 4.62. Biyobirikim ile suda kalan % Cd(II) miktarı	114
Şekil 4.63. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının hücre yüzeyine toplanan % Cd(II) miktarı.....	115
Şekil 4.64. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının hücre içine alınan % Cd(II) miktarı.....	115
Şekil 4.65. Biyobirikim ile suda kalan % Cr(VI) ve Cd(II) miktarı	116
Şekil 4.66. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının hücre yüzeyinde toplanan % Cr(VI) ve Cd(II) miktarı	117
Şekil 4.67. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının hücre içine alınan % Cr(VI) ve Cd(II) miktarı	117
Şekil 4.68. Cr(VI), Cd(II) ve Cr(VI)+Cd(II) karışımına maruz kalan <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının ve kontrol hücrelerin klorofil-a miktarları.....	127
Şekil 4.69. Cr(VI), Cd(II) ve Cr(VI)+Cd(II) karışımına maruz kalan <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının ve kontrol hücrelerin protein miktarları.....	128
Şekil 4.70. Cr(VI), Cd(II) ve Cr(VI)+Cd(II) karışımına maruz kalan <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının ve kontrol hücrelerin toplam tiyol miktarları	128
Şekil 4.71. Cr(VI), Cd(II) ve Cr(VI)+Cd(II) karışımına maruz kalan <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının ve kontrol hücrelerin proteine bağlı olmayan tiyol miktarları.....	129
Şekil 4.72. Cr(VI), Cd(II) ve Cr(VI)+Cd(II) karışımına maruz kalan <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının ve kontrol hücrelerin proteine bağlı tiyol miktarları.....	130

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Cu(II)'ye maruz kalan ADG izolatının EPS miktarındaki artış.....	16
Resim 2.2. Tek hücreli siyanobakter (<i>Chroococcus turgidus</i>).....	32
Resim 2.3. İplikli siyanobakter (<i>Oscillatoria</i> sp.)	32
Resim 2.4. <i>Chroococcus</i> sp.'de bölünerek çoğalma	38
Resim 3.1. Kùltürler için inkübasyonun yapıldığı inkübatör	50
Resim 3.2. Kùltürler için inkübasyonun yapıldığı düzenek	50
Resim 4.1. BASO670 izolatının 100X10X4 büyütmede ışık mikroskobu görüntüsü.....	65
Resim 4.2. Her iki primerle çoğaltılan PCR ürünü DNA'ların % 1'lik agaroz jel görüntüleri..	66
Resim 4.3. Kontrol <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 hücrelerinin SEM görüntüleri (X10 000)	119
Resim 4.4. Cr(VI)'ya maruz kalan <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 hücrelerinin SEM görüntüleri (X10 000)	120
Resim 4.5. Cd(II)'ye maruz kalan <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 hücrelerinin SEM görüntüleri (X10 000)	121
Resim 4.6. Cr(VI) ve Cd(II)'ye maruz kalan <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 hücrelerinin SEM görüntüleri (X10 000).....	123
Resim 4.7. <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının Cr(VI) ve Cd(II)'ye maruz kalan hücrelerinin (sağ), kontrol hücrelere (sol) göre EPS miktarındaki artışa ait SEM görüntüleri (X10,000)	123
Resim 4.8. Cr(VI), Cd(II) ve Cr(VI)+Cd(II)'ye maruz kalan <i>Synechocystis</i> sp. BASO670 izolatının ve kontrol hücrelerin toplam protein profillerinin SDS-PAGE jel görüntüleri	126

1. GİRİŞ

Dünyada ve tatlı su bakımından zengin olan ülkemizde görülen hızlı nüfus artışı, kentleşme ve hızlı sanayileşmenin getirdiği altyapı yetersizlikleri ve yeterli sayıda atık su arıtım tesislerinin bulunmamasından dolayı, çeşitli sanayilere yakın olan sular bu sanayilerin atıkları ile kirletilmektedir. Kirletilmiş sular yeraltı sularına, nehirlere, oradan da denizlere karışarak ekosistemin kirlenmesine neden olduğu gibi, bazı ağır metalleri ihtiva etmesi bakımından da insan sağlığı için risk oluşturmaktadır.

Ağır metal iyonları taşıdıkları teknolojik önem nedeniyle maden drenajları, metal işleme, pil ve mücevher sanayilerinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar [Boswell ve ark., 1998; Megharaj ve ark., 2003; Rehman ve ark., 2006]. Birçok sanayi atık suyu, kullanan ve suda yaşayan canlılar için çok tehlikeli olan kurşun, bakır, nikel, civa, arsenik, demir ve krom gibi ağır metalleri içermektedir. Ağır metallerin zehirleyici özelliklerinden dolayı ekosistemi kirlenme etkileri insan sağlığını da tehlikeye sokmaktadır. Buna rağmen bu elementler sanayide çok sık kullanılmakta ve sanayi atıklardan belli bir miktarı da besin zincirine girmektedir. Bu nedenle kirlilik oluşturan atık suların ağır metal içerikleri, çevreye verilmeden önce arıtılarak çeşitli su standartlarına göre izin verilen değerlerin altına düşürülmesi gerekmektedir.

Ağır metal iyonu içeren atık suların arıtılması genelde işletmenin kapasitesine, atık suyun debisine ve özelliklerine, işletmedeki arıtma tesisi ve kullanılan yöntem ve malzemeye bağlı olarak değişmektedir. Bir çok canlı için toksik olan ağır metallerin giderilmesinde bazı yöntemler bulunmaktadır [Özer ve ark., 1998]. Metal gideriminde çöktürme, buharlaştırma, iyon değişimi ve bir membran yardımı ile ayırma gibi yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler çok pahalı ve zahmetli olduğu için atık sıvıdaki ağır metal yoğunluğu çok fazla olduğu durumlarda kullanılmaktadır [Wilde ve ark., 1993]. Eğer ağır metal yoğunluğu düşük ise bu metodların kullanımı zorlaşmaktadır. Atık sularda yaşayan mikroorganizmalar sularda bulunan metallere direnç kazanmaktadır. Metallere dirençli olan bu mikroorganizmalar daha ucuza daha çabuk üretilmektedir. Bununla birlikte mikroorganizmalar çeşitli ağır metallerin ortamdan giderilmesi için protein, ekzopolisakkarit ve tiyoller gibi farklı metabolik

ürünler üretmektedirler. Çok kısa sürede çok yoğun üretilebilmektedirler. Bu nedenle son yıllarda mikroorganizma kullanılarak ağır metal giderimine ilgi artmaktadır [Volesky, 1994]. Mikroorganizmalar ortamda bulunan ağır metalleri metabolizmaya bağlı (biyobirikim) veya metabolizmadan bağımsız (biyosorpsiyon) olarak gidermektedirler [Srinath ve ark., 2002; Mala ve ark., 2006; Dabbagh ve ark., 2007].

Atık suların mikrobiyal arıtımında şu ana kadar birçok bakteri türü denenmiş ve hala bu konu hakkındaki çalışmalar devam etmektedir. Siyanobakteriler Gram(-) prokaryotlar içersinde ayrı bir grup olup, yüksek organizasyonlu bitkiler gibi fotosentez yapmaktadırlar. Kuraklık, tuzluluk, pH değişimleri, UV ışınlar ve ağır metaller gibi birçok çevresel stres şartlarına dayanıklı olan bu canlılar tatlı su, tuzlu su ve nemli topraklarda yaşayabilmektedirler. Son yıllarda, sucul olmaları, hücre büyüklükleri, hücre duvar yapısının bileşen özellikleri, ayrıca su kaynaklarından kolaylıkla elde edilebilmeleri ve çevresel ortamlara kolay adapte olabilmelerin ve çevreye kolay uygulanabilmeleri dolayı siyanobakterilerin sudaki ağır metallerin gideriminde kullanımı önerilmektedir [Baptista ve Vasconcelos, 2006; Gupta ve Rastogi, 2008].

Her ne kadar ağır metal gideriminde son yıllarda yoğunlukla mikroorganizmalar kullanılsa ve bununla ilgili birçok çalışma olsa da, mikroorganizmaların metal alınımlarını metabolizmaları üzerine çok fazla çalışmanın olmadığı dikkat çekmektedir. Hala daha mikroorganizmaların metal alınımlarını mekanizması ile ilgili birçok sorunun cevap beklediği düşünülecek olursa, metal alınımlarını metabolizmasındaki bilinmezlerin açığa kavuşturulmasına bağlı olarak, mikroorganizmaların ağır metal veya diğer çevre kirleticilerin giderimine yönelik biyoteknolojik uygulamalarda daha verimli kullanımı mümkün olacaktır.

Bu çalışmada,

1. Mogan Gölü, Kurtboğazı Barajı, Uncalı Deresi, Bafa Gölü, Hatim Çayı, Harikalar Diyarı Göleti ve Kızılırmak Nehri gibi farklı su örneklerinden siyanobakterlerin izole edilecektir.
2. Bu çalışmada uygulama kolaylığı nedeni ile tercihen izolasyonlar tek hücreli siyanobakterilerden yapılacak ve ipliksi formlar değerlendirilmeye alınmayacaktır. İzolatlar içinden biyosorpsiyon ve biyobirim çalışmalarında kullanılacak izolatların seçimi çalışmada kullanılacak olan Cr(VI) ve Cd(II) ağır metallerine dirençliliklerine göre yapılacak ve bunun içinden her iki metal için izolatların EC₅₀ değerleri hesaplanacaktır.
3. Her iki metale tolerans gösteren siyanobakter izolatlarının
 - a. Cansız
 - b. Tutuklanmış cansız
 - c. Tutuklanmış canlı
 biyokütlelerinin Cr(VI) ve Cd(II) biyosorpsiyon ve desorpsiyon miktarları hesaplanacaktır.
4. Her iki metale tolerans gösteren siyanobakter izolatların canlı hücrelerinin Cr(VI), Cd(II) ve Cr(VI)+Cd(II) biyobirikim miktarları hesaplanacaktır.
5. Cr(VI), Cd(II) ağır metalleri ve Cr(VI)+Cd(II) metal karışımının izolatların canlı hücreleri üzerine etkisinin ve hücre-metal ilişkisinin belirlenmesi için taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri ile enerji dağıtım X-ışını analizörü ile elementel analizleri yapılacaktır.
6. Cr(VI), Cd(II) ağır metalleri ve Cr(VI)+Cd(II) metal karışımına maruz kalan ve kontrol (metale maruz kalmayan) siyanobakter hücrelerinin proteinleri çıkarılarak, SDS-PAGE jelde protein profillerinin karşılaştırılacak ve metalin protein içeriğine etkisi belirlenecektir.
7. Metalin hücreye tutunmasında önemli rol oynayan, yüksek miktarda sülfidril grubu (SH) içeren toplam (TT), proteine bağlı (PBT) ve proteine bağlı olmayan tiyollerin (PBOT) Cr(VI), Cd(II) ağır metalleri ve Cr(VI)+Cd(II) metal karışımına maruz kalan ve kontrol (metale maruz kalmayan)

siyanobakter hücrelerinde miktarları belirlenecek ve metal giderimi ile bu özelliklerin ilişkisi açığa kavuşturulacaktır.

Günümüzde mikroorganizmaların ne kadar metal giderdiği kadar, nasıl giderdiği de önem kazanmaktadır. Bu çalışma sonunda bulunacak sonuçların endüstriyel olarak ağır metal giderimi uygulamalarında karşılaşılabilecek problemlerin çözümüne ve giderimin arttırılması için uygulanacak yeni metodların geliştirilmesine yardımcı olması hedeflenmektedir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Atık Sular

Endüstride, tarımda ve kentlerde kullanıldıktan sonra akarsu, deniz ve göllere atılan sulara atık su denilmektedir. Su kirliliği ise su ortamının doğal dengesinin bozulması olarak tanımlanmaktadır. Su kirliliği, aynı zamanda alıcı ortam su kaynağının kimyasal, fiziksel, bakteriyolojik, radyoaktif ve ekolojik özelliklerinin olumsuz yönde değişmesi ile biyolojik kaynaklarda, insan sağlığında, su kalitesinde ve suyun diğer amaçlarla kullanılmasında engelleyici bozulmalar yaratacak madde veya enerji atıklarının boşaltılması olarak da açıklanabilmektedir [Patterson, 1977; Atımtay ve Yetis, 1992; Viel ve ark., 2003].

Sular, fiziksel, kimyasal veya biyolojik olarak kirlenebilmektedir. Suyun fiziksel özelliklerinin değişmesi (renk, koku, tat, sıcaklık, saflık vs.) fiziksel kirliliğe neden olmaktadır. Suyun sıcaklığının değişmesi, gazların sudaki çözünürlüğünü değiştirmektedir. Ayrıca, suyun yoğunluğu, viskozitesi, yüzey gerilimi sıcaklıkla değişmektedir. Koku ve tat suyun estetik değerini etkilemektedir. Renk ve bulanıklık ise suya ışık sızmasını ve buna bağlı olarak organizma gelişimini ve suyun estetik özelliklerini değiştirmektedir. Bu özellikler su yaşamına zararlı etki göstermekte ve diğer kirleticilerin varlığının göstergeleri olduğu bilinmektedir [Aksu, 1988; Atımtay ve Yetis, 1992]. Suda bulunan ağır metaller ve inorganik atıklar atık suda kimyasal kirlilikten kaynaklanmaktadır. Azot, fosfor, ağır metaller ve radyoaktif maddeler suyun yoğunluğunu, tadını ve ozmotik basıncını, iletkenliğini değiştirmektedir. Bu maddeler suyun içerdiği çözünmüş oksijen derişimini düşürerek, suda yaşayan canlıları etkilemektedir.

Organik atıkların etkisiyle yoğun olarak üreyen algler, küfler ve bakterilerle de biyolojik olarak suyun kirlenmesine neden olmaktadır. Aynı zamanda patojen bakteriler ve virüsler de su ortamında üreyerek insan sağlığını etkilemektedirler [Sundstrom ve Klei, 1979].

Sulardaki kirlilik sucul ekosistemlerin olumsuz yönde etkilenmesine, doğal dengenin bozulmasına ve suyun kendi kendini temizleme kapasitesinin azalmasına ya da yok olmasına yol açmaktadır. Su kirliliği sadece suları değil diğer ekosistemleri de (hava ve toprak) olumsuz yönde etkileyerek doğal dengenin bozulmasına sebep olmaktadır [Uslu, 1987].

Dünyada ve Türkiye’de su kaynakları potansiyelinin korunması ve doğru kullanımı, su kirliliğinin önlenmesi için gerekli hukuki ve teknik esasları ortaya koyan kriterler bulunmaktadır. Birçok element ve bileşik belirli oranların üzerinde bulunduğu toksik etki göstererek, ortamın doğal dengesinin bozulmasına neden olmaktadır. Türk Standartları (TSE 266), Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA)’na göre su kalitesi kriterleri Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Türkiye’de ve dünyada kabul edilen içme suyu standartları [EPA, 2006; TSE, 2005, WHO, 2006]

	Türk Standartları TSE 266 (2005)	Dünya Sağlık Örgütü WHO (2006)	ABD Çevre Koruma Ajansı EPA (2006)
BERRAKLIK (NTU)			
Bulanıklık	1	5	-
MİKROBİYOLOJİK PARAMETRELER			
Koliform Bakteri	0	0	0
ORGANİK KİMYASAL PARAMETRELER (mg/l)			
Toplam Trihalometanlar	-	460	100
İNORGANİK KİMYASAL MADDELER (mg/l)			
Alüminyum, Al	0,20	0,20	0,20
Arsenik, As	0,01	0,05	0,01
Baryum, Ba	-	0,7	2
Kadmiyum, Cd	0,005	0,005	0,005
Krom (Toplam)	0,05	0,05	0,05
Florür, F	1,5	1,5	2
Kurşun, Pb	0,01	0,05	0,015
Civa, Hg	0,001	0,001	0,002
Nitrat, NO ₃	50	50	45
Selenyum, Se	0,01	0,01	0,05
Gümüş, Ag	-	-	0,1
Antimon, Sb	0,005	0,005	0,006
Berilyum, Be	-	-	0,004
Asbest > 10 µm			7 milyon lif/l

Çizelge 2.1. (Devam) Türkiye’de ve dünyada kabul edilen içme suyu standartları
[EPA, 2006; TSE, 2005, WHO, 2006]

ESTETİK PARAMETRELER (mg/l)			
Klorür, Cl	250	250	250
Renk (Birim)	20	15	15
Bakır, Cu	2	-	1
Deterjanlar	-	-	0,5
Demir, Fe	0,2	-	0,3
Mangan, Mn	0,05	0,5	0,05
Koku Eşik Değeri (Birim)	-	-	-
pH	6,5-9,5	6,5-8,5	6,5-8,5
Sülfat, SO ₄	250	250	250
TDS	-	1000	500
Çinko, Zn	-	-	5
İLAVE PARAMETRELER (mg/l)			
Kalsiyum, Ca	-	-	-
Sertlik, CaCO ₃	-	500	-
Magnezyum, Mg	-		
Potasyum, K	-		
Sodyum, Na	200	200	-
Klor, Cl ₂	-	5	4
Amonyum, NH ₄	0,5	1,5	-

2.2. Ağır Metaller

Yoğunlukları 5 g/cm³’den büyük olan metallere ağır metaller denmektedir. Yoğunlukları suyun yoğunluğundan beş kat daha fazla [Gramion, 2003] olup, doğada 21 metal olmayan, 16 hafif metal, 53 ağır metaller bulunmaktadır.

Yer kabuğunun doğal bileşenlerinden olan metaller, erozyon, maden yataklarının taşınması, rüzgar, volkanik patlamalar ve orman yangınları gibi doğal olaylar ile endüstriyel deşarjlar, çöp depo alanlarındaki sızıntılar gibi çeşitli insan aktiviteleri sonucunda alıcı ortamlara girmektedir [Prego, 2003]. Maden işletmeleri (kursun, çinko, demir, bakır, gümüş, krom, altın ve uranyum), metal (demir-çelik, bakır, çinko, krom v.b), metal kaplama, kursun batarya, seramik, matbaacılık, fotoğrafçılık, deri, tekstil, elektrik-elektronik, kimya, boya ve otomotiv endüstrileri ağır metal içeren atık su üretmektedir [Sağlam, 1995].

Ağır metaller atık sularda biyolojik oksijen ihtiyacı değeri düşürerek, ortamı asidik hale getirmektedirler. Bu metallerle kirletilmiş sularda yaşayan ve bu suyu kullanan canlılar için çok zehirli bir hale gelmektedir. Ayrıca ağır metaller, besin zinciriyle girdikleri canlı bünyesinden doğal fizyolojik mekanizmalarla atılamadıkları için bünyede birirmektedirler [Edwards, 2001]. Bu birikime arsenik, civa, kurşun, krom, kadmiyum, nikel, demir, bakır, çinko gibi ağır metal iyonları ile radyoaktif elementler neden olmaktadır [Nies, 1999; Al-Asheh ve ark., 2003].

2.2.1. Krom, kadmiyum kirlenmesi ve etkileri

Türkiye'deki atık sularda en çok krom(VI) ve kadmiyum(II) ağır metalleri bulunmaktadır. Krom metalik gri renkte olup, kolayca kırılabilen ve sanayide sıkça kullanılmaktadır. Erime noktası 1900 °C, kaynama noktası 2671 °C ve yoğunluğu 7,1 g/cm³ olan krom [Young, 2000], sanayiler ve evsel atıklar su ve toprağa karıştığı zaman çevre açısından çok zararlı bir hal almaktadır. WHO, EPA ve Avrupa standartları doğal sularda maksimum 50 µg/l Cr(VI)'ya izin vermektedirler [Zouboulis ve ark., 2004]. Kirlenmemiş tatlı sularda krom konsantrasyonu 0,1–0,5 ppm arasında iken, bu değer okyanuslarda 0,0016–0,05 ppm arasında olmaktadır [De Filippis ve Pallaghy, 1994; Carlos ve ark., 2001]. Kromun yaygın olarak kullanıldığı; metal kaplama, deri, tekstil kumaş boyası vb. sanayilerinde krom içeren atık sular meydana gelmektedir. Metal kaplama sanayisinde arıtılmamış atık sular yaklaşık 100 ppm Cr(VI) içermektedirler ve bu da izin verilen limit olan 0,05 ppm'den oldukça fazla olduğu için çevre açısından tehlike teşkil etmektedir [Arora ve Pandey, 1984; Thyagarajan, 1992; Sudha ve Emilia, 2001]. Kağıt endüstrisi çıkış sularında ise 80 ppm civarında krom atık olarak ortama bırakılmaktadır [Carlos ve ark., 2001].

Atık sularda krom; Cr(III) ve Cr(VI) olmak üzere iki şekilde bulunmaktadır. Cr(III) çelik, deri ve tekstil sanayinde, Cr(VI) ise genellikle kimya, deri, tekstil sanayilerinin yanı sıra elektro boyama işlemlerinde kullanılmaktadır. Havada bulunan krom iyonları su ve toprağa karışmaktadır. Toprakta bulunan krom toprak partiküllerine sıkıca tutunarak yüzey sularınca dahi temizlenememektedir. Sudaki krom iyonları hareketsiz olup sadece sediment içerisinde bulunmaktadır.

Çok fazla toksik olan Cr(VI)'nın tam tersine, Cr(III) çevre için bir problem teşkil etmemektedir. Çok düşük konsantrasyonlarda Cr(III) memelilerin bazı sistemlerindeki metabolik yolların düzenlenmesinde, özellikle de protein, glukoz ve lipid metabolizmasında önemli roller üstlenmektedir.

Kadmiyum(II) genellikle çinko ile birlikte kombine halde olup, yeryüzünün hemen hemen her yerinde bulunmaktadır. Erime noktası 321 °C, kaynama noktası 767 °C ve yoğunluğu 8,64 g/cm³ olan kadmiyum [Young, 2000], pestisit ve gübrede bol miktarda bulunduğu için en çok toprağa karışmaktadır. Orman yangınları ve volkanlar vasıtası ile de havaya karışmaktadır. Sularda meydana getirdiği kirlilik ise sanayi atıklarından kaynaklanmaktadır. Havada maksimum konsantrasyonu 0,1 mg/m³, suda ise 0,01 ppm maksimum konsantrasyona izin verilmektedir [Förstner ve Wittmann, 1983]. Aktif çamur içersinde bol miktarda bulunan Cd(II) su yüzeyine kadar hareket edebilmektedir.

Her iki metal de yüksek oranda toksik olup, biyolojik sistemlere zarar vermektedir. Cr(VI)'nın metabolizmadaki birikimi kansere yol açmakta ve genetik deformasyonlara sebep olmaktadır [Sudha ve Emilia, 2001]. Ortamın pH'sı düştükçe Cr(VI)'nın oksitleme gücü de o oranda artarak daha zararlı hale gelmektedir. pH arttıkça oksitleme kabiliyeti düşerek ve toksin etkisi azalmaktadır [Arar ve ark., 1991]. Krom insanlar tarafından soluma, yeme, içme ve deri teması ile alınabilmektedir. Cr(VI) deri kızarıklıkları, mide kanseri ve ülser, solunum problemleri, immün sistemde zayıflama, böbrek ve karaciğerlerde tahribat, genetik materyalin değişmesi, akciğer kanseri gibi sağlık problemlerine, daha ileriki safhalarda ise ölüme neden olmaktadır [Dakiky ve ark., 2002].

İnsanlar Cd(II)'u genelde besinler vasıtası ile almakta ve Cd(II) miktarı fazla besinler tüketildiğinde vücutta birikimlere neden olmaktadır. Karaciğer, mantar, midye, ahtapot, kakao ve yosun gibi besinler yüksek miktarda Cd(II) içerebilmektedirler. Cd(II) ishal ve mide bulantısı, kemiklerde erimesi (Itai-itai sendromu), üreme bozuklukları ve kısırlık, merkezi sinir sistemi bozuklukları, bağışıklık sisteminde zayıflama, piskolojik bozukluklar, DNA'da hasar ve kanser, böbrek hastalıkları

(Fanconi sendromu) gibi sağlık problemlerine neden olmaktadır [Dakiky ve ark., 2002].

Çeşitli sanayilerce kirletilen sularda bulunan Cr(VI) ve Cd(II), suda yaşayan omurgalı, omurgasız, bitkiler ve mikroorganizmaları olumsuz yönde etkilemektedir [Sadettin ve Dönmez, 2006]. Cr(VI)'nın çok az miktarı dahi sudaki ekolojik dengeyi bozmaktadır. Cd(II) ise mikroorganizmalar açısından yüksek oranda toksik olup, bazı mikroorganizmaların demir metabolizmasında görev aldığı bilinmektedir. Bununla birlikte, her iki metal miktarı belirli düzeyi aştığında mikroorganizmalar üzerinde toksik etki göstererek, bir süre sonra ölümlere yol açmıştır [Kalantari, 2008]. Yamini ve ark. (2004) Cr(VI)'nın, Simonet ve ark. (1984) Cd(II)'nin patojen bakterilerin patojenitesini azalttığını rapor etmişlerdir [Simonet ve ark., 2004]. Bakteri, fungus ve siyanobakter gibi bazı mikroorganizmalar ağır metallere toleranslı olup yüksek dozlarında dahi yaşayabilmektedirler. Bu organizmalar metalli ortamda canlılığını devam ettirebilmek için adsorpsiyon, metilleme, oksidasyon veya indirgeme gibi mekanizmalar geliştirerek ortamda bulunan metalleri inaktif hale getirmişlerdir [Mortuza ve ark., 2005]. Bakteri, fungus ve siyanobakteriler ağır metallere maruz kaldıklarında, metallothionein adı verilen sistence zengin özel proteinler ve yine sistein aminoasitince zengin proteine bağlı veya proteinden bağımsız tiyollerini sentezleyerek metallerin detoksifikasyonuna neden olmaktadır [Nagalakshmi ve Prasad, 2001]. Özellikle bakteri ve siyanobakteriler metal stresinde ekzopolisakkarit sentezleyerek metallerin toksik etkini inhibe etmektedirler [Cobbett ve Goldsbrough, 2002; De Philippis ve ark., 2003 ve 2007].

2.2.2. Atık sulardan ağır metallerin giderimi

Atık sulardan ağır metallerin giderimi için birçok yöntem kullanılmaktadır. Bu alanda en çok kimyasal çöktürme, kimyasal oksidasyon ve indirgenme, iyon değişimi, filitasyon, elektrokimyasal uygulama ve ters ozmoz kullanılmaktadır. Bu klasik yöntemlerin kullanımı maliyeti artırmakta ve aktif çamurlarda yoğun toksik bileşikler meydana getirerek arıtımı daha da zor hale getirmektedir [Xia ve Liyuan, 2002]. Ayrıca, bu yöntemler maliyetinden dolayı yüksek metal konsantrasyonların

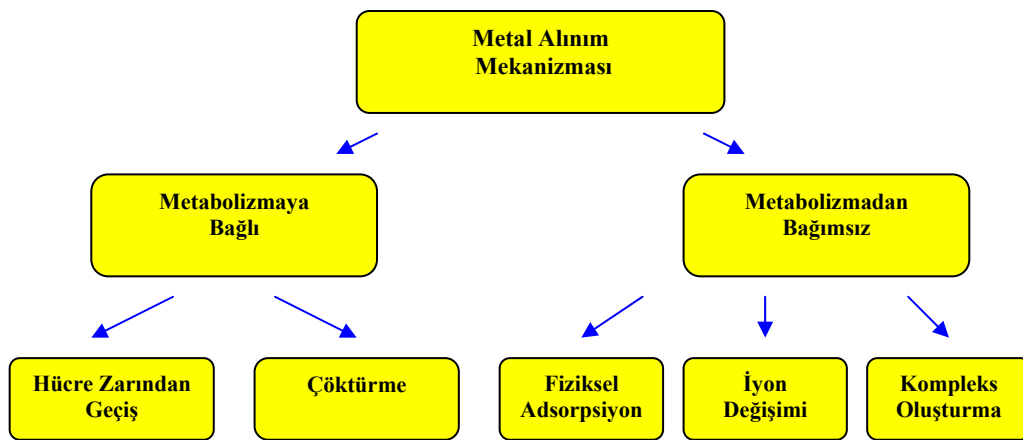
gideriminde kullanılırken, düşük konsantrasyonlu (1-100 ppm) metal kirliliğinde kullanılamamaktadırlar [Cossich ve ark., 2002]. Bu nedenle endüstriyel atık sulardan ağır metal gideriminde biyolojik sistemlerin kullanımına yönelik biyoteknolojik uygulamalar ön plana çıkmaktadır. Son yıllarda ağır metallerin gideriminde birçok mikroorganizmanın ölü, canlı ve tutuklanmış hücreleri denenerek, alınının en yüksek olduğu pH ve sıcaklık gibi çevresel şartlar araştırılmaktadır.

2.3. Mikroorganizma-Metal İlişkisi

Mikroorganizmalar metali tamamen parçalayamazlar, ancak başka bir forma dönüştürerek toksik etkilerini azaltır veya tamamen kaybederler. Biyolojik olarak mikroorganizmalar ile ağır metal giderimi; ağır metalin mikroorganizmanın yüzeyine tutunması (biyosorpsiyon, adsorpsiyon), metal iyonlarının hücre içine alınması (biyobirikim) ve metallerin mikroorganizma tarafından salgılanan biyolojik ajanlarla kimyasal dönüşümü şeklinde tanımlanmaktadır [Rangsayatorm ve ark., 2002].

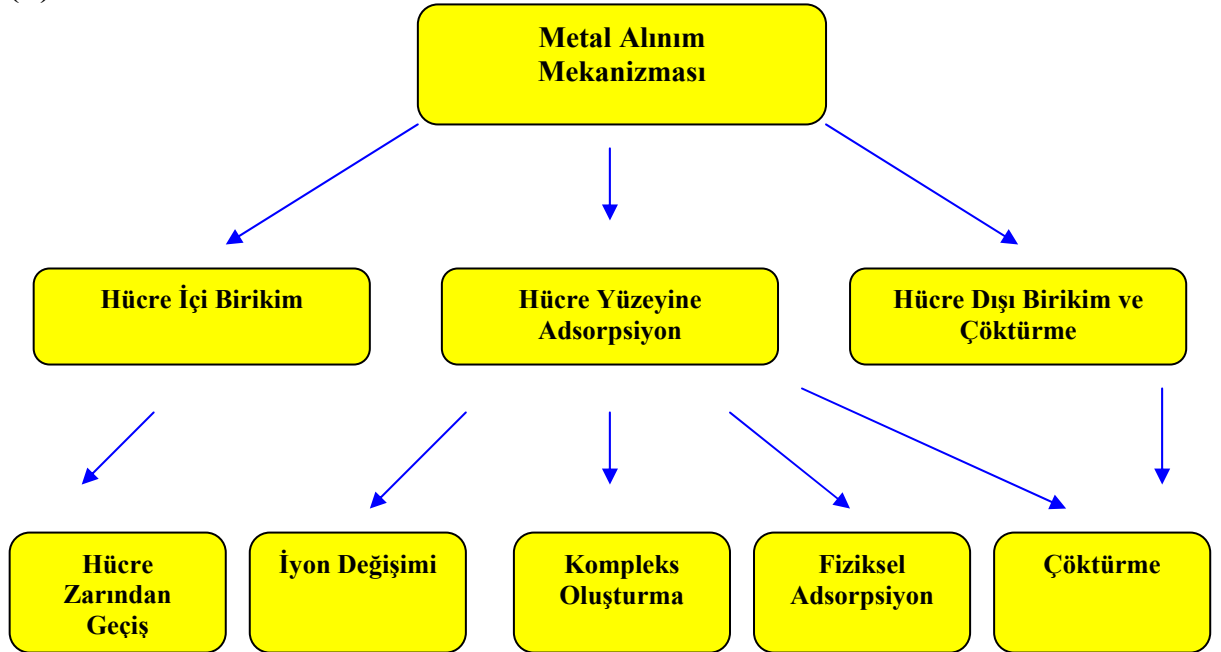
Mikroorganizmalarla ağır metal giderimi metabolik aktiviteden bağımsız olarak ve/veya metabolik faaliyetlerle gerçekleşmektedir (Şekil 2.1) [Rangsayatorm ve ark., 2002; Davis ve ark., 2003].

(A)



Şekil 2.1. Metal alımın mekanizmaları. (A) Hücre metabolizmasına göre sınıflandırma. (B) Metal gideriminin meydana geldiği yere göre sınıflandırma [Malik, 2004]

(B)



Şekil 2.1. (Devam) Metal alımın mekanizmaları. (A) Hücre metabolizmasına göre sınıflandırma. (B) Metal gideriminin meydana geldiği yere göre sınıflandırma [Malik, 2004]

2.3.1. Mikroorganizmalarda metal alınımları

Mikroorganizmalarla ağır metal giderimi birçok araştırmacıya göre genelde iki aşamada gerçekleşmektedir.

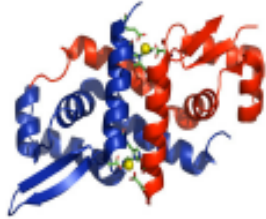
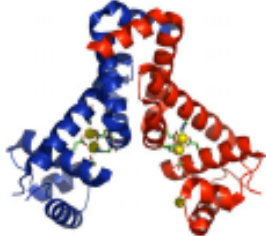
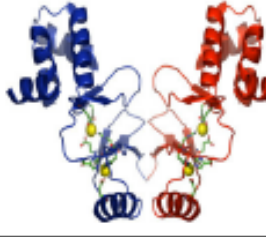
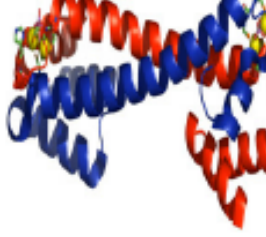
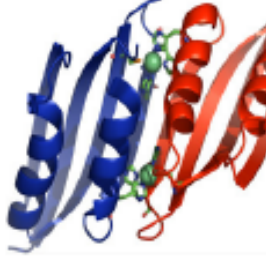
Birinci aşama: Pasif alım (fiziksel adsorpsiyon ya da hücre yüzeyinde iyon değiştirme) olarak tanımlanmaktadır. Hızlı bir reaksiyondur ve mikroorganizma ile metal iyonlarının temasından çok kısa bir süre sonra gerçekleşmektedir. Hücre yüzeyine metallerin bağlanması fizikokimyasal bir reaksiyon olup, hücre yüzeyinin yapısı ile yakından ilişkilidir. Her bir mikroorganizmanın biyosorpsiyondaki etkinliği mikroorganizma türüne ve hücre duvarının kompozisyonuna bağlı olarak büyük farklılıklar göstermektedir. Birçok mikroorganizmanın hücre yüzeyi polisakkarit, protein ve lipid içermektedir. Ayrıca, hücre yüzeyindeki amino, karboksil, hidroksil,

sülfidril, sülfat, fosfat ve tiyol grupları da metal bağlama özellikleri nedeniyle biyosorpsiyonu desteklemektedir [Rangsayatorm ve ark., 2002; Mohamed, 2001].

İkinci aşama: Aktif alınımla, metabolizmaya bağlı ve daha yavaş gerçekleşmektedir. Bu aşamada, metal iyonları hücre zarından sitoplazmaya taşınır [Dursun ve ark., 2003]. Metaller sitoplazmaya taşınırken, birçok mikroorganizmanın metal bağlayıcı proteinler sentezledikleri rapor edilmektedir. Metal bağlayıcı özelliğe sahip düşük moleküler ağırlıklı (6-7 kDa) bu proteinlere metallothiyoninler (MT) adı verilmekte ve ağır metallerin detoksifikasyonunda görev aldıkları düşünülmektedir [Andrade ve ark., 2004; Evangelou ve ark., 2004]. MT'ler yüksek miktarda sistein aminoasiti içeren sülfidril grupları ihtiva ederler [Bremner ve Beattie, 1990]. Yapısal olarak MT zinciri Cys-X-Cys, Cys-X-Cys veya Cys-X-Y-Cys şeklindedir. X ve Y sistein dışındaki amino asitleri temsil etmektedir [Floriańczyk, 2005]. Yapılan çalışmalar, metal derişimlerinin artışına paralel olarak metal bağlayıcı proteinlerin de arttığını göstermektedir [Sağlam, 1995].

Prokaryot hücrelerde, normal hücre metabolizması için gerekli olan kritik seviyelerin altında veya üstündeki metal iyonu konsantrasyonlarını algılayan, metallerin işlevini düzenleyen (metalloregulatory) proteinler görev almaktadır. Pennella (2005)'e göre, prokaryotik metal düzenleyici proteinler beş alt gruba ayrılmıştır (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Prokaryotlarda metal düzenleyici protein grupları [Pennella, 2005]

Örnek Protein ve Proteinin Bağladığı Metal Grupları	Proteinin Yapısı ^a
ArsR (As, Ab) CadC (Cd,Pb) CzrA, SmtB (Zn) NmtR (Ni)	
DtxR (Fe) IdeR (Fe) MntR (Mn)	
Fur (Fe) Zur (Zn)	
CueR (Cu) MerR (Hg) PbrR (Pb) ZntR (Zn)	
NikR (Ni)	

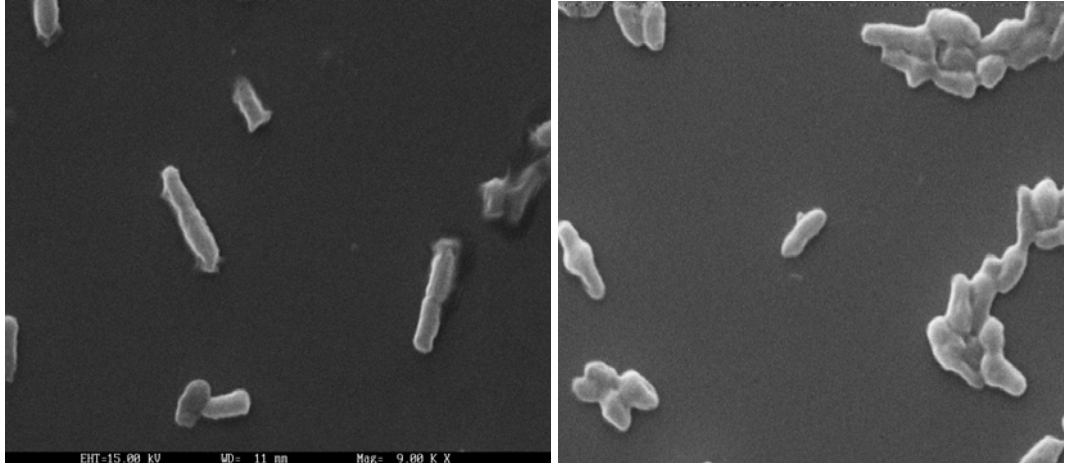
^a Her bir protein grubun kristal yapısını göstermektedir. Sarı, kırmızı ve yeşil renkli küreler protein yapıya bağlı metal iyonlarını ifade etmektedir.

Siyanobakteriler ile sulardaki Zn^{2+} giderimi üzerinde yapılan çalışmalarda, giderimin hücredeki polifosfat rezervleri ve metallothionein proteinleri vasıtası ile yapıldığı belirlenmiştir [Jensen ve ark. 1982; Daniels ve ark. 1998].

Metal bağlama yeteneğine sahip diğer bir spesifik protein de glutatyon olduğu bilinmektedir. Glutatyon tiyol ihtiva eden bir tripeptid olup asidik, ozmotik ve oksitativ streslerde önemli rol oynamaktadır [Riccillo ve ark., 2000]. Ağır metal gideriminde de önemli fonksiyonları olduğu bilinmektedir. Figueira ve ark. (2005) Cd(II)'ye maruz bırakılan *Rhizobium leguminosarum*'un glutatyon miktarlarını incelemişler, kontrole göre Cd(II)'ye maruz kalan hücrelerin glutatyon miktarlarında artış olduğunu saptanmışlardır [Figueira ve ark., 2005].

Ağır metallerin gideriminde önemli ve etkili metabolitlerden bir diğeri de ekzopolisakkaritlerdir. Bazı prokaryot (siyanobakteriler, bakteriler ve arkeler) ve ökaryot (yeşil algler ve funguslar) mikroorganizmalar polisakkarit, glukoprotein, lipopolisakkarit ve peptid yapıda ekzopolisakkaritler üretmektedirler. Ekzopolisakkaritler (EPS) olumsuz çevre koşullarına maruz kaldıklarında bakteriler tarafından üretilen metabolik ürünlerdir [Liu ve ark., 2001; Wang ve Chen, 2006]. EPS genellikle polisakkaritler, proteinler, uronik asit, nükleik asitler ve lipidlerden meydana gelir ve sülfidril karboksil, amin, fosforik ve hidroksil gruplarını ihtiva etmektedir [Wingender ve ark., 1999; Liu ve Fang, 2002; Sponza, 2002]. Mikrobiyal ekzopolisakkaritler simbiyoz ve biyofilim oluşturma, fagositozdan korunma gibi görevlerin yanı sıra stres şartlarına dirençlilik sağlamaktadır [Vanhaverbeke ve ark., 2003]. Yapılan birçok araştırmada ağır metale maruz kalan hücrelerin EPS miktarlarının da arttığı gözlenmiştir [White ve Gadd, 1998; Fang ve ark., 2002; Kazy ve ark., 2002; Priester ve ark., 2006; Adarsh ve ark., 2007].

Adarsh ve ark. (2007), ağır metallerle kirletilmiş bölgelerden alınan su örneklerinden üç tane bakteri izole ederek, Cu(II) ağır metaline karşı toleranslarını tespit etmişlerdir. Metale maruz kalan ve kontrol hücrelerinin SEM analizinde, kontrole göre Cu(II) ağır metaline maruz kalan hücrelerin EPS miktarlarında artış olduğunu tespit etmişlerdir [Adarsh ve ark., 2007] (Resim 2.1).



Resim 2.1. Cu(II)'ye maruz kalan ADG izolatının EPS miktarındaki artış [Adarsh ve ark., 2007]

2.3.2. Mikroorganizmalarda hücre duvar yapısı ve metal alınımı arasındaki ilişki

Mikroorganizmalarda hücre duvar yapısı metal alınımı açısından önemli bir faktör olup, metalin hücre yüzeyine bağlanmasında, hücre içersine alınmasında ve detoksifikasyonunda rol oynamaktadır. Hücre duvar yapısı üzerinde ağır metalleri bağlama yeteneğine sahip hidroksil, karbonil, karboksil, sülfidril, tiyoeter, sülfonat, amin, imin, amid, imidazol, fosfonat ve fosfodiester gibi kimyasal gruplar bulunmaktadır. Metalin bağlanması mikroorganizma üzerindeki bu grupların çeşidi, sayısı, kimyasal yapısı, durumu ve metalin bu gruplara ilgisine bağlı olmaktadır [Vieira ve Volesky, 2000].

Fungus ve mayalar ile yapılan çalışmalarda ortamdaki ağır metallerin giderildiği tespit edilmiştir. Mayaların hücre duvarı bakterilere benzer fakat peptidoglikan tabakası yerine kitin fibrilleri matriks oluşturmaktadır. Ana maddesi glukan olan amorf yapıdaki musilaj tabaka hücre duvarını kaplamaktadır. Bu musilaj tabaka üzerinde bulunan fonksiyonel gruplar metallerin tutunmasını sağlamaktadır [Alluri ve ark., 2007]. Küflerde ise iplikli hif yapısı bulunmaktadır [Vieira ve Volesky, 2000] ve hücre duvarının % 90'nını amino ve amino olmayan polisakkaritler oluşturmaktadır [Yan ve Viraraghavan, 2000]. Yapılan araştırmalara göre her iki

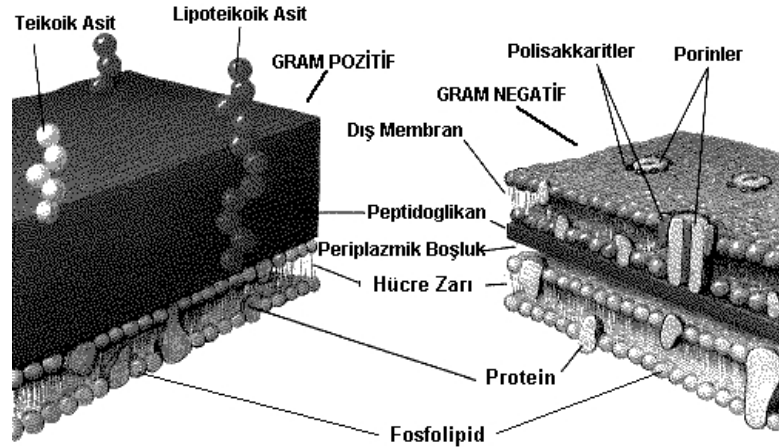
grup için metal alınımında karboksil ve fosforil grupları ön plana çıkmaktadır. *Saccharomyces cerevisiae* ile yapılan bir çalışmada uranyum gideriminin hücre duvarında bulunan polifosfat ve karboksil gruplarının bolluğu ile ilgili olduğu tespit edilmiştir [Strandberg ve ark., 1981].

Bakteriler hücre duvarı bakımından Gram-pozitif ve Gram-negatif olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Her iki grup da peptidoglikan matriks tabakasından oluşmaktadır, fakat Gram-negatif hücre duvarında peptidoglikan tabakası ince ve çok tabakalı olup daha kompleks bir yapıya sahip iken, Gram-pozitif hücre duvarı tek bir peptidoglikan tabakadan meydana gelir ve daha basit bir yapısı bulunmaktadır (Şekil 2.2) [Madigan ve ark., 2008].

Gram-pozitif hücre duvarında peptidoglikan tabakaya bağlı bulunan teikoik ve teikronik asitler, fonksiyonel gruplar ihtiva etmektedirler. Bu gruplar vasıtası ile etkin bir şekilde metal bağlama yeteneği kazanmaktadırlar. Peptidoglikan tabakası üzerinde karboksil, hidroksil ve amin grupları içermektedirler. Teikoik asit gliserol yapısında olup üzerinde fosforil grupları bulunmaktadır. Teikronik asit ise yapısal olarak teikoik asite benzese de üzerinde fosforil grupları yerine karboksil grupları bulundurması ile ayrılmaktadır. Gram-negatif bakterilerin hücre duvarında ise teikoik asit veya teikronik asit bulunmamaktadır. Bu yapıların yerine fosfolipid, lipoprotein, lipopolisakkarit ve çeşitli proteinler bulunmaktadır. Fosfolipidler teikoik asitlerde bulunan fosforil grupları ile aynı yapıda ve koordinasyonda olup yüksek miktarlarda metal tutabilmektedirler [Johnson, 2006].

Hücre yüzeyine tutunan metallerin bir kısmı hücre metabolizmasında kullanılmak üzere veya detoksifiye edilmek için hücre içersine alınmaktadır. Metal iyonları hücrede bulunan birçok enzimin aktivasyonunu sağlayarak homeostaziyi düzenlemektedir. Hücre membranında transporter proteinleri bulunmaktadır. Bu proteinler vasıtası ile ağır metaller enerji harcanarak hücre içersine alınmaktadır [Garcia-Dominguez ve ark., 2000]. Hücre membranından ağır metallerinden geçişini sağlayan çok bileşenli ve tek bileşen içeren transporterler olmak üzere iki tip transporter proteinleri bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalara göre, nikelin

taşınmada görev alan NikABCDE proteininin çok bileşenli transporter, kobaltın taşınmada görev alan NhlF proteininin ise tek bileşenli transporter olduğu bilinmektedir. Bu alanda yeni transporter proteinlerin tanımlanmalarına yönelik araştırmalar devam etmektedir [Lopez-Maury ve ark., 2002].



Şekil 2.2. Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarının şematik diyagramı (http 1)

Bakteri hücre duvarı asidik pH'larda negatif yüklü hale geçerek, fonksiyonel gruplar aktif hale geçmektedir. Bakteri hücre duvarının yeni kimyasal durumu bulunan fonksiyonel gruplara metallerin bağlanma ilgisini arttırmaktadır. *Bacillus subtilis* ile yapılan bir çalışmada Cd, Cu, Pb ve Al gideriminin sadece bakteri üzerindeki fonksiyonel grupların varlığı ile olmadığı, aynı zamanda kullanılan metallerin bu gruplara ilgisinden kaynaklandığı rapor edilmiştir [Collins ve Stotzky, 1992]. Vieira ve Voleksy (2000)'e göre bakteriler, hücre yüzey alanının genişliği açısından ağır metallerin giderimi için mükemmel bir biyosorbenttir [Vieira ve Voleksy, 2000]. Bununla birlikte bakteri hücre duvarında bulunan teikoik asitin fosfodiesterleri ve teikronik asidin karboksil grupları metal bağlamada fonksiyonel gruplar gibi davrandığı tespit edilmiştir [Paknikar ve ark., 2003].

Siyanobakteriler hücre duvar yapısı bakımından Gram(-) özellik göstermektedir. Bakterilerde olduğu gibi siyanobakterilerin hücre duvarı da peptid bağları ile bağlanmış N-asetilglukozamin ve β -1,4-N-asetilmuramik asitin oluşturduğu

peptidoglikan tabakasından meydana gelmektedir. Hücre duvarının dış kısmı yoğun bir ekzopolisakkarit tabaka ile kaplı olup, bu tabaka üzerinde metal bağlamada rol oynayan fonksiyonel grupların birçoğu bulunmaktadır. Siyanobakterilerde diğer fonksiyonel grupların yanı sıra özellikle ekzopolisakkarit yapı üzerinde bulunan uronik asit ve proteinlerle bağlantısı olan sülfidril (tiyol) grupları metal bağlamada ön plana çıkmaktadır [Alluri ve ark., 2007].

2.3.3. Biyosorpsiyon

Metal arıtma yeteneğine sahip olan canlılara biyosorbents adı verilmektedir. Canlı hücreler vasıtası ile aktif olarak meydana gelen metal giderimine biyobirikim, genellikle ölü hücre yüzeyine pasif olarak tutunma yolu ile meydana gelen giderime ise de biyosorpsiyon yada adsorpsiyon adı verilmektedir [Rangsayatorn ve ark., 2002].

Metallerin metabolizmadan bağımsız, pasif olarak alınımı daha hızlı olmakla birlikte, geri kazanımı mümkün ve ayrıca az enerji gerektirmektedir [Klimmek ve ark., 2001; Mack ve ark., 2007]. Biyosorpsiyon için harcanan enerji 21kJ/mol iken, biyobirikim için harcanan enerji 63kJ/mol'dür [Kaduková ve Virčíková, 2005]. Biyosorpsiyonda ölü ve tutuklanmış hücreler kullanılabilir [Klimmek ve ark., 2001].

Biyosorpsiyon mekanizması genellikle metal iyonları ve hücre yüzeyinde bulunan fonksiyonel gruplar arasındaki elektrostatik etkileşim, iyon değişimi, metal iyonunun şelatlanması gibi etkileşimlere bağlıdır [Özer ve ark., 2004]. Biyosorpsiyon çalışmaları, ölü mikroorganizmanın hücre yapısındaki bazı değişikliklerden dolayı olumlu yönde etkilenecek yaşayan hücrelerden daha fazla miktarda metali adsorblayabilmektedir [Kuyucak ve ark., 1987; Rangsayatorn ve ark., 2002]. Ölü hücreler iyon değişimi yapabilmeleri ve tekrar tekrar kullanılabilirlerinden dolayı sentetik adsorbantlara benzedikleri için ekonomik açıdan son yıllarda çok ilgi çekmektedir [Winter ve ark., 1994; Bakkaloğlu ve ark., 1998; Matheickal ve ark., 1999].

Biyosorpsiyonun diğer arıtma metodlarına göre en önemli avantajları [Kratochvil ve ark., 1998]:

- Düşük maliyet
- Yüksek verim
- İlave besin gereksinimi olmaması
- Biyosorbentin yeniden kullanılabilmesi
- Metal geri kazanma olasılığıdır.

2.3.4. Biyobirikim

Eser miktarlardaki demir (Fe), bakır (Cu), kobalt (Co), nikel (Ni), çinko (Zn), kadmiyum (Cd) ve manganez (Mn) gibi metaller mikroorganizmaların solunum, azot fiksasyonu ve fotosentezinde önemli görevi olan metaloenzimlerinde kofaktör veya proteinlerinde yapısal bileşen olarak bulunmaktadır [Leao ve ark., 2007]. Örneğin, demir ve fosfor Siyanobakterilerin gelişmesinde rol oynayan, metabolizma açısından elzem olan minerallerdir. Sulardaki ekolojik dengenin korunmasında görev alan bu ototrofik canlıların metabolizmaları açısından bazı metallere ihtiyaç duymaktadırlar. Siyanobakteriler bakırı plastosiyanin içersinde, çinkoyu karbonik anhidraz, kobaltı kobalamin, magnezyumu klorofillerde, molibdeni nitrogenaz enziminin yapısında ve manganezi ise tilakoid membran içersinde oksijenle birlikte kompleks oluşturmak için kullanmaktadır [Cavet ve ark. 2003]. Diğer taraftan, bu metaller ve Hg, Pb, Cr, gibi diğer ağır metallerin yüksek dozları sucul ekosistemlerde besin zincirinin birinci halkasını teşkil eden fitoplanktonik organizmalardan balıklara kadar dokularda birikim yoluyla tüm canlı gruplarının gelişimini olumsuz yönde etkilemekte ve insanların önemli derecede protein kaynağını teşkil eden balıkların yenilmesiyle de insan sağlığını tehdit etmektedir.

Biyobirikimde mikroorganizma metal veya metalleri seçerek kontrollü bir şekilde bünyesine almaktadır. Mikroorganizmalar birden fazla metale maruz kaldıklarında metabolize edebileceği metalleri tercih etmektedir. Metaller biyobirikimde hücre içersine metabolizmaya bağlı olarak alınmaktadır. Mikrobiyal biyobirikim iki şekilde

olmaktadır. Metaller ilk aşamada iyon değişimi veya fiziksel adsorpsiyon ile hızlı bir şekilde hücre yüzeyinde toplanmaktadır. Daha sonra hücre zarından metabolizmaya bağlı olarak hücre içersine alınmaktadır. Hücre yüzeyinde bulunan tiyollerin metallerin hücre içersine aktif taşınmasında görev aldığı bilinmektedir. Hücre içersine endositoz ile taşınan metaller, hücre içersinde metalloitiyonein proteinleri ile şelatlanarak detoksifiye olmaktadır [Mejare ve Bulow, 2001; Srinath ve ark., 2002; Van Ho ve ark., 2002; Zalups ve Ahmad, 2003].

Hızla gelişen endüstrinin sebep olduğu bu tür bozulmalarda mikroorganizmalar toksik ağır metallere karşı mekanizmalar geliştirir. Mikroorganizmalar kalıtsal dirençliliğinden ziyade bu dirençliliği ya mutasyonla ya da düşük konsantrasyondan büyük konsantrasyona adım adım taşınarak kazanır. Böyle mikroorganizmalar ağır metalle kontamine suların temizlenmesi veya bu sulara müdahale etmek için geliştirilmiş biyotoplayıcı olarak işe hazır hale getirilebilir. Böylece metale dirençli suşların geliştirdiği mekanizma biyoteknolojik kullanımları geliştirmede temel olabilir [Roane ve ark., 2001]. Özellikle biyobirikim çalışmalarında metalle kirlenmiş ortamlardan izole edilen mikroorganizmaların, metale maruz kalmayan ortamlardan izole edilen mikroorganizmalardan hücre içersinde daha çok metal biriktirdiği rapor edilmiştir. Daha önceden edinilmiş olan dirençlilik mekanizması mikroorganizmanın metal alınımlarını artırır [Sprocati ve ark., 2006].

Metal dirençliliğinin ölçülmesinde EC_{50} değeri sıkça kullanılmaktadır. Canlı hücrelerin % 50'sini öldüren metal dozu ne kadar yüksek ise canlının o metale karşı dirençliliği de yüksek olmaktadır.

Srinath ve ark. (2001), Cr(VI)'ya maruz kalan sulardan bakteri izole etmişler ve laboratuvar ortamında bu bakterilerin Cr(VI) giderimini incelemişlerdir. *Bacillus circulens* ve *Bacillus megatarum* olarak tanımladıkları izolatların diğerlerine nazaran Cr(VI)'ya daha çok direnç gösterdikleri ve bu dirençli izolatların Cr(VI) biyobirikimlerinin de yüksek olduğu rapor edilmiştir [Srinath ve ark., 2001].

Ahuja ve ark. (2001), *Oscillatoria angustissima* ile yaptıkları çalışmada canlı hücreler ile çinko tolerans mekanizmasını araştırmışlar. Aynı bakteriyi bir süre çinkolu ortamda tutarak toleranslı hale getirmişler. Bu toleranslı ve çinkolu ortamlarla ilk defa karşılaşan kültürlerin çinko alınımını karşılaştırmışlardır. Buna göre toleranslı kültürün diğerine nazaran daha çok çinko aldığı gözlenmiştir [Ahuja ve ark., 2001]. Sun ve Shao (2007), Pasifik okyanusunun sedimentlerinden izole ettikleri kurşun(II)'a yüksek oranda dirençli olan *Penicillium* sp. Psf-2 izolatının laboratuvar ortamında da Pb(II)'yi yüksek oranda hücre yüzeyine ve hücre içersine aldığı rapor edilerek, ağır metal gideriminde metale toleranslı mikroorganizmaların kullanımının nedenli önemli olduğu vurgulanmıştır [Sun ve Shao, 2007].

Rangsayatorm ve ark. (2002), yaptıkları çalışmada *Spirulina (Arthrospira) platensis*'in Cd(II)'a karşı dirençliliğini belirleyerek 24, 48, 72 ve 96. saatlerde probit analizi ile EC₅₀ değerlerini hesaplamışlardır. Elektron mikroskobu ile Cd(II)'un hücre yapısına etkisi incelenmiş artan Cd(II) konsantrasyonlarda dejenerasyonun da arttığı gözlenmiştir. Çalışmanın sonucu olarak *Spirulina (Arthrospira) platensis*'in birçok canlıdan daha çok Cd(II)'u adsorbe ettiğini tespit edilmiştir [Rangsayatorm ve ark., 2002].

2.3.5. Biyosorpsiyonda kullanılan mikroorganizmalar

Biyosorpsiyon için seçilecek mikroorganizma, doğada yaygın olarak bulunmalı, endüstri atıklarından izole edilmeli, çevresel streslere karşı dirençli olmalı, kolaylıkla üreyebilmeli ve ucuz maliyetle üretilbilmelidir [Vieira ve Volesky, 2000].

Mikroorganizmalar ile ağır metal giderimi hakkında birçok araştırma yapılmış, yeşil algler [Dönmez ve Aksu, 2002; El-Sikaily ve ark., 2007], siyanobakteriler [Anjana ve ark., 2007; Kiran ve ark., 2007], bazı bakteriler [Mabet ve ark., 2002; Şahin ve Öztürk, 2005], mantarlar, küfler [Yan ve Viraraghavan, 2003], mayalar [Krheminska ve ark., 2005] gibi mikroorganizmaların ortamda bulunan ağır metalleri bünyelerinde topladığı rapor edilmiştir. Küf ve mayalarda karboksil, fosforil ve polifasfat gruplarının, bakterilerde EPS, teikoik asit ve teikoik asitin karboksil gruplarının,

yeşil algler ve siyanobakterilerde uronik asit ve tiyollerin yoğun olarak bulunması son yıllarda bu mikroorganizmaların metal gideriminde kullanılmalarında ilgiyi arttırmaktadır. Mikroorganizmaların metal giderim kapasitesini arttırmak için, canlı ve kuru hücreler kimyasal veya doğal bir matriks ile tutuklanmaktadır.

2.3.6. Biyosorpsiyonda tutuklanmış mikroorganizmaların kullanımı

Son 20 yıldır, biyoteknolojik açıdan birçok metabolitin üretiminde tutuklanmış hücre ve komponentlerinin kullanımı hızla gelişen bir önem kazanmıştır. Başlangıçta bu sistem bazı metabolik ürünlerin toplanması ve sentezlenen enzim veya enzim kompleksinin korunması için kullanılırken, artık günümüzde artık hücrelerin tamamı tutuklanarak çok farklı amaçlar için kullanılmaktadır. Tutuklanmış hücreler olumsuz dış etkenlerden korunarak, uygulanacağı biyoproseslerde tekrar tekrar birçok defa kullanımı mümkün olmaktadır. Bunun dışında hücrenin uzun süreli canlı kalmasını sağlar. Bu da teknolojik açıdan avantaj sağlayan bir durumdur [Shin ve ark.,2002; Suhail ve ark., 2005; Wu ve Yu, 2007].

Siyanobakterilerin tutuklanmasında birçok doğal ve sentetik polimerler denenmiş ve özellikle de canlı hücrelerin hayatta kalabilmeleri için ışığı geçiren şeffaf matriksler tercih edilmiştir. En çok kullanılan doğal tutuklanma ajanları aljinat, agar, agaroz, carrageenan ve albumin serumu iken sentetik matriksler poliüretan, polivinil köpükleri ve akrilamittir [Sera ve ark., 2006]. Ağır metal gideriminde ise tutuklanma ajanları hücreyi yüksek dozlardaki toksik metal stresinden koruyarak aynı zamanda metalleri toplamaktadır. Giderimde en önemli faktör doğru matriksi seçmektir. Örneğin aljinatın yapısında bulunan Na iyonları diğer ağır metaller ile yer değiştirerek matrikse tutunmasını sağlamaktadır. *Phormidium laminosum* ile yapılan bir çalışmada, Cu(II), Fe(II), Ni(II) ve Zn(II) ağır metallerin biyosorpsiyonu için tutuklama ajanı olarak, polisülfon ve epoksiresin kullanılmış ve bu yolla tutuklanmış hücrenin en az 10 defa biosorpsiyon-desorbsiyon yapabildiği bildirilmiştir [Blanco ve ark., 1999].

Gardea-Torresdey ve ark. (1998), *Synechococcus* sp. PCC 7942 izolatının tutuklanmış hücrelerinin bakır, kurşun, nikel, kadmiyum ve kromun biyosorpsiyon oranının, kuru hücrelere nazaran daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir.

2.3.7 Tutuklama mekanizmaları

Mikroorganizmalarda tutuklanma mekanizmaları ‘pasif’ ve ‘aktif’ olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır.

Pasif Tutuklanma

Birçok mikroorganizma bir yüzeye tutunma eğilimine sahip olup, tutunduğu yüzeyde gelişmektedir. Bu olaydan yola çıkarak doğal ve sentetik tutunma yüzeyleri kullanılarak mikroorganizmalar tutuklanabilmektedir. Pasif tutuklamada en çok kullanılan doğal tutuklama ajanı *Luffa cylindrica* adlı bir süngerdir. Mikroorganizmalar özellikle de mikroalgler bu süngerin lifleri içersine yerleşerek yaşamını devam ettirmektedir. Bu şekilde hücreler düşük maliyetle tutuklanarak uzun süreli kullanılabilir [Morreno-Garrido, 2008]. Akhtar ve ark. (2004), bu süngeri tutuklama ajanı olarak kullanarak bir mikroalg olan *Chlorella sorokiniana*’nın Ni(II) giderimini incelemişler. Tutuklanmış hücrelerin 20 dak içersinde serbest hücrelerden % 25 daha fazla Ni(II) tutuğu tespit edilmiştir [Akhtar ve ark., 2004].

Pasif tutuklanmada sentetik materyallerde kullanılmaktadır. Urrutia ve ark. (1995), *Scenedesmus obliquus*’un hücrelerini polivinil ve poliüretan yüzeyinde tutuklayarak sudan nitratın giderimini incelemişler ve aktif olarak tutuklanan hücrelerle mukayese etmişlerdir. Sonuç olarak pasif olarak tutuklanan hücrelerinin aktif olarak tutuklanan hücrelerden canlılığını daha uzun süre koruduğu rapor edilmiştir [Urrutia ve ark., 1995].

Aktif Tutuklanma

Aktif tutuklanma birleştirme ajanı, kimyasal bağlanma ve jele hapsedme olmak üzere üç şekilde yapılabilmektedir.

Birleştirme Ajanı ile Tutuklanma

Bu tutuklanma sisteminde bir ortamdan mikroorganizmaların özellikle de mikroalglerin ayrılması veya toplanması isteniyorsa santrifüj gibi pahalı yöntemler yerine çeşitli doğal matriksler kullanılmaktadır. Çitosan lineer yapıda amino-polisakkarit olup β -D-glucosamine içermektedir. Kitinin (krustaselerin dış iskeleti) deasetilasyonu ile elde edilmektedir. Pozitif yüklü amino gruplar içeren bu polisakkarit negatif yüklü partikülleri ve mikroorganizmaları adsorplayabilmektedir [Morreno-Garrido, 2008]. Ancak doygunluğa ulaştıktan sonra bu sistem stabil olmayıp, tutuklanan hücreler uzun süreli canlılıklarını devam ettirememektedirler [Moreira ve ark., 2006].

Kimyasal Bağlanma ile Tutuklanma

Kimyasal bağlanma ile tutuklanma özellikle canlı hücrelerin tutuklanmasında kovalent bağlanmadan dolayı hücre yüzeyinde deformasyonlar meydana getirdiği için çok tercih edilmemektedir. Ayrıca iyon değişimi yüzünden ortamın pH'sı devamlı değişir ve buna bağlı olarak soğurulan yüksek ışık fotosentez yapan mikroorganizmalar zarar vermektedir [Codd, 1987]. Bu nedenle bu tutuklanma sistemi daha çok cansız mikroorganizmalar için uygundur. Seki ve Suzuki (2002), mikroalglerden *Heterosigma akashiwo*'nın cansız hücrelerini bu yöntemle tutuklayarak Pb ve Cd giderimini incelemişlerdir [Seki ve Suzuki, 2002].

Jele Hapsedme ile Tutuklanma

Mikroorganizmaların tutuklanmasında en çok kullanılan yöntem jele hapsedme yöntemidir. Bu tutuklanma yönteminde sentetik polimerler (akrilamit ve poliüretan),

proteinler (jelatin, kollojen ve yumurta akı) ve doğal polisakkaritler (agar ve aljinat) gibi birçok ajan kullanılmaktadır [Morreno-Garrido, 2008]. Birçok araştırmacı sentetik polimerlerin kimyasal yapıları yüzünden canlı hücrelerden çok cansız hücrelerin tutuklanmasında kullanılmalarının daha uygun olduğunu rapor etmişlerdir. Kubal ve D'Souza (2004), protein ile tutuklanmış canlı mikroalglerde çapraz bağlar oluştuğu için canlılığın uzun süreli korunamadığından, cansız hücreler için daha uygun olduğunu bildirmişlerdir [Kubal ve D'Souza, 2004].

Sıkça kullanılan yöntemlerden biri de karraginan, agar ve aljinat gibi doğal polisakkaritler kullanarak tutuklamaktır. Karraginan kırmızı alglerden elde edilen sekonder metabolit olup, 3-linked- β -D-galactopyranose ve 4-linked- α -D-galactopiranosel'den meydana gelmektedir. Özellikle k-karraginan ile tutuklanmış mikroorganizmaların uzun yıllar canlılığını koruduğu bildirilmektedir. Agar ise yine kırmızı alglerden elde edilen sülfatlanmış galaktan yapısında olup, (1-3)-linked- β -D-galactopyranosyl ve 3,6-anhydro- α -D-galactopyranosyl birimlerinden oluşmaktadır. Diğer bir hapsederek tutuklanma ajanı da aljinattır. Aljinat *Laminaria* cinsine ait kahverengi alglerden elde edilmektedir. Aljinat ile tutuklamanın birçok avantajı bulunmaktadır. Hücreler tutuklanma işlemi sırasında oluşan ekstrem fiziksel ve kimyasal şartlardan etkilenmemektedir. Hücre için herhangi bir toksik etki göstermemektedir. Geçirgenliği yüksek olan bu matriks aynı zamanda hücrelerin dış etkenlerden korunmasını sağlamaktadır. Moreno-Garrido ve ark. (2005), 11 deniz mikroalgi ile yaptıkları çalışmada aljinatla tutuklanmış hücrelerin gelişim peryotlarını incelemişler ve serbest hücrelere oranla tutuklanmış hücrelerin klorofil-a miktarlarında artış olduğunu tespit etmişlerdir. Dolayısı ile aljinat hücrelerin korunmasında olduğu kadar gelişmesinde de etkin olmaktadır.

2.4. Siyanobakteriler

Bugüne kadar çeşitli araştırmacılar tarafından, değişik adlarla anılan Siyanobakteriler, *Archaeobacteria* ile birlikte prokaryotları oluşturan *Eubacteria* grubunda sınıflandırılmıştır. Önceleri mavi-yeşil algler, mavi-yeşil bakteriler ve *Cyanophyta*

olarak isimlendirilen bu canlılar için son yıllarda siyanobakter adı önerilmiştir. Şu anda ise *Cyanophyta* ile siyanobakter, bu mikroorganizmalar için eş anlamlı isimler olarak kullanılmaktadır [Van den Hoek, 1997].

Siyanobakter en kapsamlı ve değişken dağılım gösteren fotosentetik prokaryot canlı grubudur. Bu organizmaların birçoğu, organik karbon ve enerji kaynağının bulunduğu karanlık ortamlarda gelişemeyen zorunlu fototrofturlar. Böyle bir ortamda gelişebilse dahi, aydınlıktaki gelişme oranından çok daha düşük bir gelişme gösterir. O da ancak periyodik karanlıkta gerçekleşir [Stanier ve ark.,1976; Stal, 1997].

Siyanobakteriler diğer bakterilerden, fotokimyasal işlemleri yürüten kromatoforların varlığı ile ayrılırlar. Bu canlılarda renk klorofil pigmentini örtecek kadar yoğunluktaki fikosiyenin pigmentinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca bazı siyanobakteriler kırmızı pigment içerdiklerinden dolayı kırmızımtrak veya erguvan da görünebilir. Hücrede depo edilen fotosentetik ürün hayvanlardakine benzer bir polisakkarit olan glikojendir [Ball ve Morell, 2003]. Siyanobakterilerin diğer önemli özelliği de, oksijen üretimiyle sonuçlanan fotosentez işlemini yürütebilme kabiliyetine sahip tek prokaryot fototrof organizma olmalarıdır [Ting ve ark., 2002]. İpliksi siyanobakteriler fonksiyonel olarak değişikliğe uğramış heterosist adında hücreler vasıtası ile havadaki serbest azotu alabilmektedirler. Havada bulunan serbest azotun alınımı ile de siyanobakter hücreleri yüksek miktarlarda H₂ üretmektedirler [Baptista ve Vasconcelos, 2006].

2.4.1. Siyanobakterilerin tarihçesi ve sınıflandırılması

Siyanobakterilerin dünyadaki mevcudiyeti 2 milyar yıldan daha fazla olduğu düşünülmektedir [Riccardi ve ark., 1989]. Bu canlılar yaklaşık olarak 150 yıl kadar bir süre alglerin özel bir grubu olarak mavi-yeşil algler kavramıyla incelenmiştir. Dolayısıyla sınıflandırılmaları da fikologlar tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu grup canlılar gösterdikleri değişik özellikleri gereği günümüze kadar bilim adamları tarafından farklı adlarla anılmıştır. Örneğin:

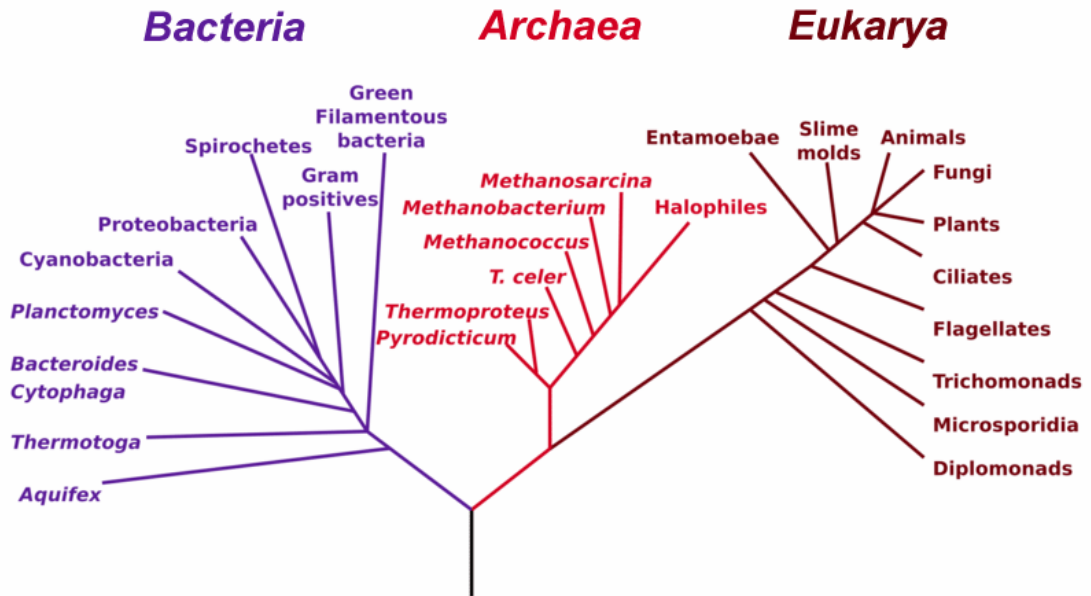
Wallreth tarafından *Myxophyceae*; 1833'te

Robenhorst tarafından *Phycochromophyceae*; 1863'te

Sachs tarafından *Cyanophyceae*; 1874'te

Cohn tarafından *Schizophyceae*; 1879'da

Söz konusu isimler, uzun süre değişik araştırmacılar tarafından birbirinin sinonimi olarak kullanılmıştır. Nitekim *Cyanophyceae*'nin günümüzde dahi botanikçiler tarafından kullanıldığı görülmektedir [Rippka ve ark., 1979]. Ancak yapılan moleküler analizler sonucunda siyanobakterilerin prokaryotlardan Gram(-) bakteri grubu içerisinde olduğu tespit edilmiştir [Madigan ve ark., 2008] (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Siyanobakterilerin evrimsel soy ağacındaki yeri [Madigan ve ark., 2008]

Diğer prokarotların tanımlanmalarında kullanılan biyokimsyasal testler ve fizyolojik özellikler siyanobakterilerin tanımlanmalarında kullanılamamaktadır. Bu nedenle tanımlama çok basit düzeyde morfolojik değişikliklere göre yapılmaktadır. Ancak siyanobakteriler çevre şartlarından etkilenecek morfolojisinde değişiklikler meydana getirebilmektedir. Doğal ortamından alınan siyanobakter hücreleri laboratuvar

ortamında besiyerine inoküle edildiği zaman dahi birçok morfolojik değişikliklere uğramaktadır. Bu nedenle siyanobakterilerin sadece morfolojilerine göre tanımlanmaları sistematik açıdan doğru bulunmamaktadır [Neilan, 2002].

Canlıların, özellikle de prokaryotların tanımlanmalarında kullanılan en önemli yöntem, moleküler olarak 16S rRNA'larının çıkarılarak birbirine yakın grupların gen sekanslarının mukayesesi prensibine dayanmaktadır. Siyanobakterilerin moleküler düzeyde tanımlanmaları istenilen hedef gen bölgelerinin çoğaltılması, hassasiyeti ve daha çabuk sonuç almak açısından birçok avantaj sağlamaktadır [Ouellette ve Wilhelm, 2003].

2.4.2. Siyanobakterilerin teşhisi ve teşhisinde kullanılan yöntemler

Siyanobakterilerin teşhisleri iki şekilde yapılmaktadır. Birincisi morfolojik karakterleri ve bölünme fizyolojilerine göre diğeri ise 16S rRNA'larına göre tanımlamadır [Castenholz, 2001].

Morfolojik tanımlamada Siyanobakter ordoları hücrelerin ipliksi veya tek hücreli olmaları, koloni oluşturmaları, ipliksi türlerin dallanmalarına veya tek düzlemde büyümelerine, çoklu veya ikili bölünmelerine, hücre bölünmesinin tek veya çok düzlemde olmasına göre ayrılmaktadır. Cinslerin tanımlanmasında ise daha kapsamlı ve detaylı karakterler kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları; deniz veya tatlısularda yaşamaları, hücre büyüklükleri, plazma membranında tilakoitlerin bulunması, hücrelerin dairesel veya çubuk şeklinde olması, üreme fizyolojileri (ikiye bölünme, çoklu bölünme, simetrik bölünme asimetrik bölünme, tek düzlemde ve çoklu düzlemde bölünme), musilaj kılıfın bulunması'dır. Örneğin Chroococcales ordosuna ait *Synechocystis* cinsinin teşhisinde kullanılan morfolojik karakterler; tilakoidler üzerinde fikobiliproteinlerin ve fikobilizomların bulunması, hücrelerin iki düzlemde simetrik ve çoğa bölünmesi, hücre şekillerinin dairesel olması, hücre çapının 2-6 µm olması, hücrelerin birbirine yapışık çift veya tekli bulunmaları ve gaz veziküllerinin bulunmaması'dır.

Çok uzun süredir ve halen günümüzde birçok araştırmacı siyanobakterilerin teşhislerinde morfolojik karakterler kullanmaktadırlar [Baker ve ark., 2001]. Ancak, çok sayıda farklı türlerin ortaya çıkması ve sayının giderek artması, morfolojik yapının değişken olması ve ışık, sıcaklık ve pH değişimlerinden çok çabuk etkilenmesi, doğal ortamından laboratuvar ortamına geçerken dahi morfolojisinin değişmesinden dolayı sadece morfolojik tanımlama yeterli değildir. Komarek (1994), morfolojik tanımlama yapan araştırmacıların yaptıkları tanıma tamamıyla güvenmelerinin yanlış olduğunu, hatta birçok kültür koleksiyonunda hatalı tanımlanan örneklerin bulunduğunu bildirmiştir [Komarek, 2001]. Bu nedenle daha doğru sonuçlar elde etmek için moleküler tanımlama yapılması gerekmektedir [Castenholz, 2001; Matsunaga ve ark., 2001].

Siyanobakterilerin tanımlanmalarında 16S rRNA veya DNA çok sık kullanılmaktadır. Ayrıca özel genlerin sekansı ile de tanımlama yapılmaktadır. Hücrede çok bulunması ve mutasyonlara karşı daha korunaklı olmasından dolayı 16S rRNA genleri tanımlama ve filogeninin oluşturulması açısından önem taşımaktadır [Neilan, 2002]. Neilan (2002), sadece siyanobakterler değil bütün prokaryotların moleküler tanımlanmalarının yapılması gerektiğini, aksi taktirde hatalı tanımlanmış mikroorganizmaların patojenite, biyoteknoloji ve birbiri ile bağlantılı bilimin diğer alanlarında tehlike oluşturacağını rapor etmiştir [Neilan, 2002].

Son yıllarda “The biology of blue green algae”, “The biology of *Cyanobacteria*” ve “The blue green algae” gibi kitapların yayınlanmasıyla, siyanobakterilerin birçok özellikleri aydınlığa kavuşmuştur. Moleküler yöntemlere göre tanımlanan siyanobakter filumuna ait 5 takım bulunmaktadır (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Siyanobakter filumuna ait takımlar ve başlıca cinsler [Bone ve Castenholz, 2001].

Chroococcales	Pleurocapsales	Oscillatoriales	Nostocales	Stigonematales
<i>Chamaesiphon</i>	<i>Cyanocystis</i>	<i>Arthrospira</i>	<i>Anabaena</i>	<i>Chlorogloeopsis</i>
<i>Chroococcus</i>	<i>Dermocarpella</i>	<i>Borzia</i>	<i>Anabaenopsis</i>	<i>Fischerella</i>
<i>Cyanobacterium</i>	<i>Stanieria</i>	<i>Crinalium</i>	<i>Aphanizomenon</i>	<i>Geitleria</i>
<i>Cyanobium</i>	<i>Xenococcus</i>	<i>Geitlerinema</i>	<i>Cyanospira</i>	<i>Iyengariella</i>
<i>Cyanothece</i>	<i>Chroococcidiopsis</i>	<i>Leptolyngbya</i>	<i>Cylindrospermopsis</i>	<i>Nostochopsis</i>
<i>Dactylococcopsis</i>	<i>Myxosarcina</i>	<i>Limnothrix</i>	<i>Cylindrospermum</i>	<i>Stigonema</i>
<i>Gloeobacter</i>	<i>Pleurocapsa</i>	<i>Lyngbya</i>	<i>Nodularia</i>	
<i>Gloeocapsa</i>		<i>Microcoleus</i>	<i>Nostoc</i>	
<i>Gloeotheca</i>		<i>Oscillatoria</i>	<i>Scytonema</i>	
<i>Microcystis</i>		<i>Planktothrix</i>	<i>Calothrix</i>	
<i>Prochlorococcus</i>		<i>Prochlorothrix</i>	<i>Rivularia</i>	
<i>Prochloron</i>		<i>Pseudanabaena</i>	<i>Tolypothrix</i>	
<i>Synechococcus</i>		<i>Spirulina</i>		
<i>Synechocystis</i>		<i>Starria</i>		
		<i>Symploca</i>		
		<i>Trichodesmium</i>		
		<i>Tychonema</i>		

2.5. Siyanobakterlerin Genel Özellikleri

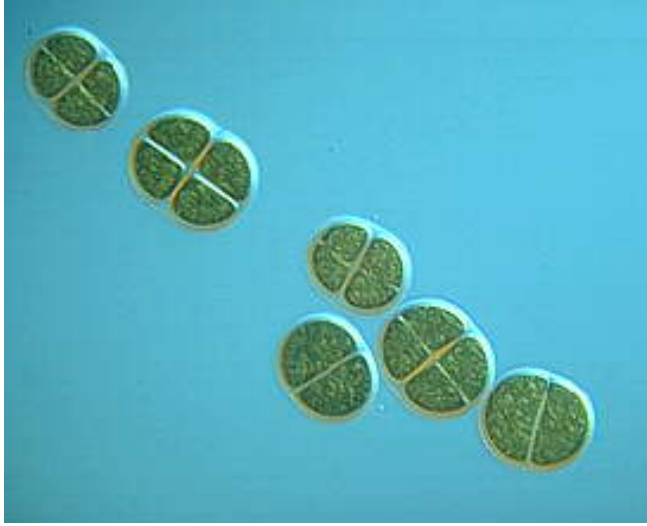
2.5.1. Habitat

Siyanobakteriler, tuzlu su, tatlı su ve toprak gibi gelişebilmeleri için uygunluk gösteren geniş bir habitata sahiptirler. Nitrojen fikse edebilenleri ise, özellikle azotça fakir tropik bölgelerin kombine nitrojenin sınırlı olduğu kısımlarında, bol miktarda bulunmaktadır. Siyanobakter türleri nötr ve alkali ortamlarda bulunurlar (pH 6,5–9,0). Bunların gerek duyduğu sıcaklık derecesi farklı (20–30 °C arası) olsa da *Thermococcus* spp. gibi bazı tek hücreli türleri 70 °C'nin üzerinde dahi gelişebilmektedir.

Siyanobakter üyeleri çevre koşullarına çok dayanıklı olup, hemen hemen bütün akuatik ve kuru çevrelerde bulunabilmektedir [Prescot, 1990].

2.5.2. Morfolojisi

Siyanobakteriler kendi aralarında beslenme ve metabolizma olarak herhangi farklılık göstermeseler de hücre yapısı bakımından tek hücreli (Resim 2.2) ve ipliksi (Resim 2.3) gibi belli farklılıklar göstermektedir [Stanier ve ark., 1976].



Resim 2.2. Tek hücreli siyanobakter (*Chroococcus turgidus*) (http2)



Resim 2.3. İpliksi siyanobakter (*Oscillatoria* sp.) (http3)

Siyanobakterilerdeki en önemli morfolojik olarak tanımlayıcı faktörlerden biri içerdikleri pigmentlerdir [Prescot, 1968]. Fikoeritrin (kırmızı pigment) içermelerine rağmen renklerini fikosiyanin ve allofikosiyaninden almaktadırlar. Şu ana kadar incelenen tüm siyanobakter türlerinde klorofil a (klorofil b yoktur), fikosiyanin (r-c), fikoeritrin C, β -karotenler gibi pigmentlerin varlığı saptanmıştır [Van den Hoek, 1997]. Bu pigmentlerin kompozisyonundaki farklılıklar, söz konusu mikroorganizmaların sarımsı, yeşil (zeytinyağı rengine benzer), gri-yeşil, sarı-kahverengi ve mor (erguvan) gibi renkler sergilemelerine neden olmaktadır [Prescot, 1990].

Fikosiyanin, fikoeritrin ve allofikosiyaninin aynı bileşikler olduğundan, toplu olarak Fikobiliprotein adı ile anılmaktadır. Ancak kromatoforlarına Fikobilin denilmektedir. Söz konusu pigmentler arasında fikosiyanin en fazlası olduğundan, morfolojik olarak yeşil veya mavi-yeşil renkte görünmektedirler [Van den Hoek, 1997].

Bu mikroorganizmaların 1–10 μ m çapındaki tek hücreli bir morfoloji gösterdiği gibi değişik morfolojileri de bulunmaktadır. Aynı zamanda trikom adı verilen filamentler de oluşturabilmektedirler. Çoğunluğunun fikosiyaninden dolayı mavi-yeşil görünüm vermesine rağmen *Haematococcus* gibi bazı cinslere ait bireylerin de fikoeritrinden dolayı kırmızı ve kahverengi görüldüğü de belirtilmiştir [Prescot, 1968]. Bazen de yalancı vakuollerin ışığı kırma özelliğinden dolayı mikroskop altında mor, kahverengi ve hatta siyah görünmektedir [Prescot, 1990].

2.5.3. Sitoplazma

Hücrenin sitoplazmik bölgesinde ilk göze çarpan unsurlardan biri değişik pigmentleri içinde bulunduran, *Prochlorophyta* ve birçok ökaryot alglerin tersine tek ve eşit uzaklıklardaki tilakoitlerdir [Van den Hoek, 1997]. Sitoplazmayı saran zarı mevcut olabildiği gibi, bazı durumlarda rastlanmayabilir. Sitoplazma aynı zamanda kromoplazma ve sentroplazma rolünü de oynamaktadır. Bu canlılarda bilinen kromoplazmanın bir ağ içinde olduğu bilinmektedir. Sentroplazmada az miktarda

pigment mevcut olsa da, çoğunlukla nüklear granülleri içermekte olup, ancak çekirdek zarı ve çekirdekçikle donanmış düzenli bir çekirdek bulunmamaktadır. Nüklear materyal gevşek bir retikulumda düzenlenen DNA ve RNA'yı kapsayan fibrillerden oluşmaktadır.

Bunlarda gerçek vakuol mevcut olmayıp, yalancı vakuollar gelişmektedir. Dolayısıyla bu vakuollar sayesinde hareket kabiliyetini kazanmaktadırlar [Prescot, 1968]. DNA hücre merkezinde herhangi bir çekirdek zarı ile çevrili bulunmaksızın sitoplazmada serbest biçimde bulunmaktadır. Böylece tilakoitler de kloroplastlarda bulunacağına sitoplazmada serbest olarak bulunmaktadır (fotosentetik prokaryotlarda). Aynı zamanda tüm ökaryot bitkilerde fotosentez pigmentleri kloroplastlarda bulunurken, siyanobakterilerde ise çoğunlukla protoplastın dış kısmında yerleşmişlerdir. Bu renkli protoplazma kromatoplazma olarak adlandırılmaktadır. Elektron mikroskop çalışmaları, kromatoplazmanın sitoplazmada serbest bulunan ve çoğu türlerde hücre yüzeyine paralel olarak tanınan tilakoitleri içerdiğini göstermektedir. Tilakoitlerin membranı çözülebilen fotosentetik yağ, klorofil a ve karotenoitleri, suda çözülebilen fikobiliproteinine ise tilakoitlerin dış yüzeyinde yapışık halde bulunan küçük cisimcikler içerisinde bulundukları bilinmektedir [Van den Hoek, 1997].

Siyanobakteriler çekirdek şekli açısından etrafının belirgin bir membranla çevrili olmaması ve fotosentez işleminin diğer yüksek bitkilerde olduğu gibi kloroplastlarda gerçekleşmemesiyle bakterilere benzerlik göstermektedirler [Cooley ve ark., 2000].

2.5.4. Hücre duvarı

Genel itibarıyla hücre yapısına bakıldığında, hücrenin iç kısmının peptidoglikan kısmından oluşan, çok katlı sert bir duvarla çevrili olduğu bildirilmiştir. Bu duvar aynı zamanda jelatinimsi bir kılıfla da çevrili olabilmektedir. Hücre duvarı gram reaksiyonu açısından negatiftir [Prescot, 1990]. Hücre duvarı esasen üç katmandan oluşmaktadır. İçeriden dışarıya doğru, en içteki ince selüloz, ortadaki peptik ve son

tabaka ise yapışkan bir katman olan müsilaıdan oluşmaktadır. Elektron mikroskop çalışmaları sonucu olarak iç katmanın da üç ayrı tabakadan oluştuğu düşünölmektedir. Hücre duvarının yüksek derecede müsilaı taşıma özelliği karakterizasyonunda kolaylık sağlayıp, bunlara *Myxophyceae* (müsilaıalı algler) adını kazandırmıştır. Ancak koloni şeklinde bulundukları zaman, koloni etrafı jelatinimsi kılıfla çevrili olabilmektedir [Prescot, 1968].

Bazı siyanobakter üyeleri sadece hücre duvarı ile sarılmış olmasına rağmen (*Oscillatoria*), bazıları da hücre duvarlarının yanı sıra yapışkan bir kılıfla da çevrilmiştir (*Cyanothece* ve *Chroococcus*). Siyanobakter ve diğer *Eubacteria*'nın hücre duvarı bakımından benzerlikleri ancak lizozim enzimiyle parçalanabilme özelliğine dayanmaktadır [Van den Hoek, 1997].

2.5.5. Siyanobakter ekzopolisakkaritlerinin yapısı

Kuraklık, ultraviyole ışınlar, tuzluluk, pH değişimleri ve ağır metallere gibi stres faktörlerine maruz kalan siyanobakter hücreleri ekzopolisakkarit adı verilen mukoid bir yapı sentezlemektedir. Kimyasal kompozisyonuna göre ekzopolisakkaritler homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Homopolisakkaritler tek tip monosakkarit ihtiva ederken, heteropolisakkaritler birden fazla monosakkarit içermektedirler [De Vuyst ve ark., 2001]. Siyanobakterilerin ekzopolisakkaritleri genelde heteropolimer yapıda olup çoğunlukla glikoz, galaktoz, mannoz, riboz, arabinoz, ksiloz, fukoz, ramnoz şekerleri ile glukronik ve galaktronik şeker asitlerinden oluşmaktadır [De Philippis ve ark., 2000; Moreno ve ark., 2000; Shah ve ark., 2000]. Siyanobakterilerde ekzopolisakkaritler, hücre duvarına bağlı ve dış ortama salınan olmak üzere iki şekilde bulunmaktadır. Hücreler metale maruz kaldıklarında, dışarı salınan EPS birinci bariyer görevi görerek metalin büyük bir kısmını tutmaktadır. Hücre duvarına bağlı olan EPS ise ikinci bariyerdır ve geriye kalan metalin tutulmasında görev almaktadır [Richert ve ark., 2005]. Siyanobakter ekzopolisakkaritlerinde yüksek miktarda karboksil grubu içeren uronik asitler, fosfat ve purivil grupları bulunmaktadır [De Philippis ve ark., 2001]. EPS yapısında bulunan bu fonksiyonel

gruplar toksik ağır metalleri tutarak hücreye zarar vermesine engel olur. Son yıllarda araştırmacılar hücre kullanmak yerine sadece ekzopolisakkaritler ile ağır metal giderimini araştırmaktadırlar. Raungsomboon ve ark. (2006), siyanobakterlerden *Gleocapsa gelatinosa*'nın EPS'sini çıkararak Pb(II) giderimini araştırmışlar ve monomer kompozisyonu ksiloz, arabinoz, riboz, ramnoz, galaktoz, glukoz, mannoz ve fruktoz şekerlerinden oluşan EPS yapısının yüksek miktarda Pb(II)'yi tuttuğunu rapor etmişlerdir [Raungsomboon ve ark., 2006]

2.5.6. Hareket

Siyanobakteriler dikey biçimde hareket ettiklerinden dolayı, çoğunlukla gaz vakuollarını bu amaca yönelik kullanırlar. Ancak filament türleri kayma hareketini de gerçekleştirebilmektedir. Denizde bulunan *Synechococcus* cinsinin pek çok türü, flagellalara sahip olmamasına rağmen bilinmeyen bir mekanizmayla saniyede 25 μm 'ye kadar hızla hareket edebilmektedirler [Prescot, 1990].

Çoğu siyanobakteriler tek hücreli veya filament olsun kayma türü hareket etme yeteneğine sahiptirler. Filamentler ileri veya geriye doğru $2-11 \mu\text{m s}^{-1}$ hareket ettiği halde, tek hücreliler düzensiz ve titreşim biçiminde hareket etmeye meyillidirler. Bunlar tıpkı sümüklüböcekler gibi sürünürken arkalarında yapışkan bir iz bırakırlar. Bu da sözkonusu yapışkan maddenin, hücre duvarındaki harekete neden olan porların içerisinde gizli bulunduğu düşüncesini ortaya koymaktadır. Ancak son teoriler ilgili maddenin hareket ile direkt ilişkisi olmadığını göstermektedir. Bunun yerine spiral şeklinde hücre duvarının murein tabakasının hemen dış kısmındaki birtakım mikrofibrillerin harekete sebep olduğu belirtilmektedir. Nitekim elektron mikroskop çalışmaları da mikrofibrillerin hareketten sorumlu olduğunu ortaya koymaktadır.

Dönme biçimindeki hareket tarzı sadece *Oscillatoria*'da gözlenmekte olup, diğer türler dönmeksizin hareket etmektedirler. Hücreler sağlam ve uygun substratta bulunmadıkça hareket fonksiyonunu gerçekleştiremezler. En uygun substrat ise

çamur olarak bilinmektedir. Siyanobakterilerin hareketinde ışık kaynağı büyük rol oynar. Diğer alglerde de olduğu gibi bunlar düşük ışığa karşı pozitif fototaksi (ışık kaynağına doğru hareket eder) ve yüksek ışığa karşı negatif fototaksi reaksiyonu göstermektedir [Van den Hoek., 1997].

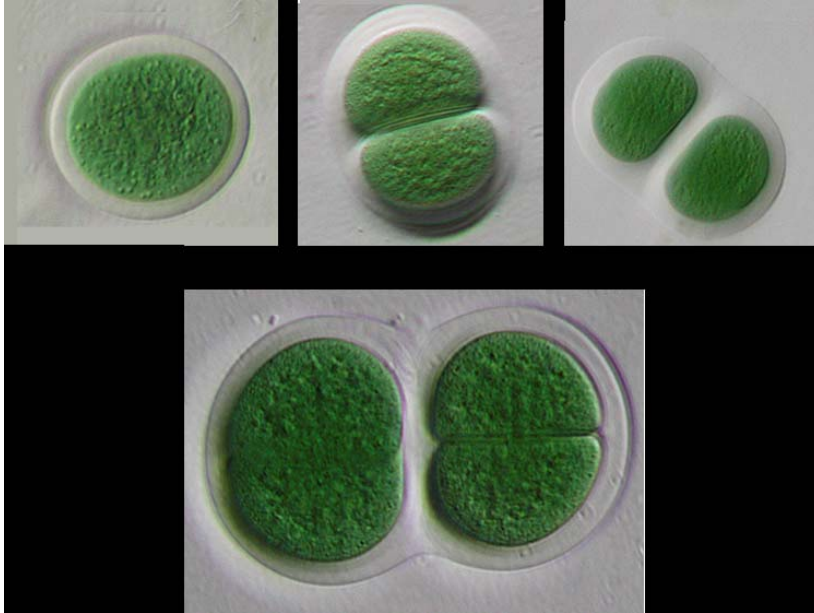
2.5.7. Siyanobakterilerde fotosentez ve azot fiksasyonu

Siyanobakteriler ototrof mikroorganizmalar olup, yüksek organizasyonlu bitkilerde olduğu gibi fotosistem-I ve fotosistem-II'yi birlikte kullanarak glikoz ve O₂ meydana getirmektedirler. Sitoplazmanın etrafını saran tilakoid membranda klorofil-a, karotenoid, fikosiyanın, allofikosiyanın ve fikoeritrin gibi fotosentetik pigmentler bulunmaktadır. Işık bu pigmentler vasıtası ile soğurulur ve suyun bir elektron vererek CO₂'i indirgemesi ile fotosentez başlamaktadır [Whitton, 1992].

Atmosferde bol miktarda bulunmasına karşın azot N₂ halinde inaktif özellik göstermektedir. Azotun biyolojik sistemlerde kullanılabilmesi için amonyuma dönüşmesi gerekmektedir. Biyolojik olarak indirgenme, multimerik enzim kompleksi olan nitrogenaz vasıtası ile gerçekleşmektedir. Nitrogenaz enzimi oksijen varlığında etkisini kaybetmektedir. Oksijen stresine maruz kalan, azot fiske eden mikroorganizmalar nitrogenaz enziminin inhibisyonu önlemek adına çeşitli adaptasyon mekanizmaları geliştirmektedir. Azot fiske eden mikroorganizmalar arasında sadece siyanobakteriler fotosentez ürünü olarak anaerobik enzim ile birlikte oksijen üretmektedirler [Adams, 2000; Gallon, 2001]. İpliksi siyanobakterilerde bulunan diğer hücrelerden farklılaşmış, kalın çeperli heterosistler hücre içersine oksijenin girişini engelleyerek nitrojenaz enziminin çalışması için uygun bir ortam oluşturmaktadır. *Symploca* ve *Lyngbya* gibi ipliksi, *Gloeotheca* ve *Cyanothece* gibi tek hücreli ve heterosist yapısı içermeyen siyanobakterilerde nitrogenaz enzimi bütün hücrelerde bulunur ve azot fiksasyonu fotosentezin olmadığı zamanlarda yani geceleri gerçekleşmektedir [Kumazawa ve ark., 2001; Lundgren ve ark., 2001].

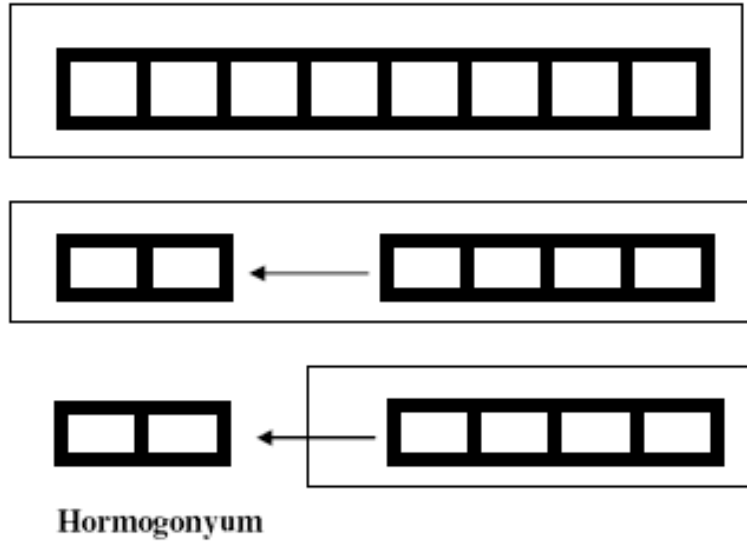
2.5.8. Üreme

Diğer prokaryotlarda nadiren rastlanan, tek hücreli siyanobakter türlerinin karakterini oluşturan üreme biçimi çok bölünmedir (multiple fission). Hücre şekil olarak büyür ve daha sonra oğul hücrelerinin ana hücre duvarının kırılması sonucu dağılması ile sonuçlanan hücre bölünmesi gerçekleşir. Oğul hücre kısa bir süre hareketli olup, gelişmeye başladığı andan itibaren bu özelliğini (hareketliliğini) kaybeder. Tek hücreli siyanobakter hücrelerinin diğer bir bölünme şekli de ikiye bölünmedir (Resim 2.4).



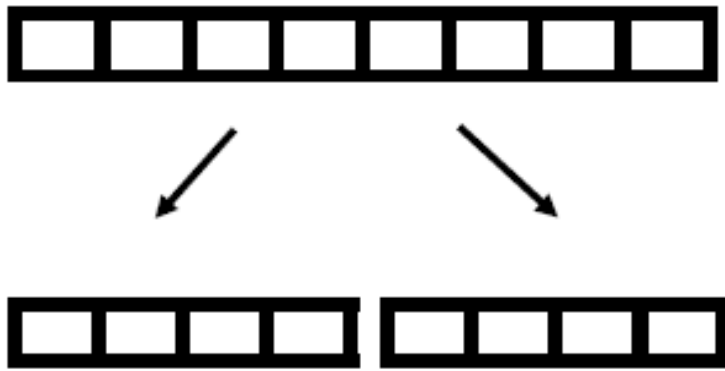
Resim 2.4. *Chroococcus* sp.'de bölünerek çoğalma [http5]

Bazı iplikli siyanobakterilerde, ipliği meydana getiren hücrelerden bir kısmının ölmesi sonucunda, bakteriden birkaç hücreli parça ayrılmaktadır. Bu parçalar eşeysiz olarak üreyebilir. Bu ayrılan parçalara “hormogonyum” adı verilmektedir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. İpliksi siyanobakterilerde hormogonyum oluşumu [http4]

Anabaena ve *Nostoc* cinslerinde fragmentasyon olarak adlandırılan bölünme şekillerine de rastlamak mümkündür (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. İpliksi siyanobakterilerde hormogonyum oluşumu [http4]

Diğer bakterilerde rastlanılan transformasyon ve konjugasyon gibi transfer şekillerinin bu canlılarda da gerçekleşebileceği belirtilmiştir [Van den Hoek., 1997]. Nitekim tek hücreli siyanobakter olan *Anacystis nidulans* R₂ suşunda amfisilin antibiyotikğine dirençlilik genin transformasyonu gerçekleştirilmiştir [Golden ve Sherman, 1984].

2.6. Siyanobakteriler ile İlgili Moleküler Çalışmalar

Genom büyüklüğü diğer bakterilerle ($1,0-3,6 \times 10^9$ Da) karşılaştırıldığında siyanobakterilerin genomu ($1,6-8,6 \times 10^9$ Da) çok daha büyüktür. İlk fotosentetik organizma olan *Synechocystis* 6803'ün 1996 yılında genomunun tamamı çıkarılmıştır. 3,6 Mbp genoma sahip bu canlılarda 7 adet plazmid DNA'ya rastlanmıştır. 490'ı plazmid, 3264'ü kromozomal olan toplam 3754 geni ve 3569 proteini bulunmaktadır [Kaneko ve ark., 1996].

Biyoteknolojik açıdan önemli olan siyanobakteriler ile ilgili tanımlamada, toksin veya diğer metabolitlerden sorumlu genlerin belirlenmesinde, plazmidlerin fonksiyonlarının belirlenmesi gibi birçok moleküler çalışmalar yapılmaktadır. Örneğin Orchard ve ark. (2003), *Trichodesmium* sp. izolatlarının fosforu regüle eden genleri ile yaptıkları çalışmada, bu genlerin karbon ve azot fiksasyonunda da önemli görevleri olduğunu rapor etmişlerdir [Orchard ve ark., 2003]. Yine *Anabaena variabilis* ile yapılan bir çalışmada azot fiksasyonunda önemli görevi olan, nitrogenaz enzimini kodlayan nif genlerinin karakterizasyonu yapılmıştır [Lyons ve Thiel, 1995]. Burns ve ark. (2004) *Microcystis*, *Nodularia* ve *Cylindrospermopsis* cinsleri ile yaptıkları çalışmada toksin üretiminden sorumlu genleri tanımlamışlardır.

Özellikle son 10 yıldır rekombinant siyanobakter suşları elde etmeye yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Suziki ve ark. (1996), *Alcaligenes eutrophus*'un polyhidroksibütirat (PHB) üretimi ile ilgili genlerini *Synechococcus* sp. PCC 7942 izolatına aktararak bu izolatta PHB üretimini sağlamışlardır [Suziki ve ark., 1996]. Sudesh ve ark. (2001), polihidroksialkonat (PHA) üretimi düşük olan *Synechocystis* sp. izolatına, PHA üretimi yüksek olan *Ralstonia eutropha*'nın PHA üreten genlerini aktararak, bakteriler açısından zengin bir karbon kaynağı olan bu maddenin üretimini arttırmışlardır [Sudesh ve ark., 2001]. Takahama ve ark. (2003), *Synechococcus elongatus*'a *Pseudomonas syringae*'den etilen üretimini sağlayan *efe* genlerini aktararak biyoteknolojik açıdan önemli yeni bir rekombinant izolat meydana getirmişlerdir [Takahama ve ark., 2003].

2.7. Siyanobakterilerin Ürettiği Metabolitler ve Biyoteknolojide Kullanım Alanları

Prokaryotik genom ve organizasyona sahip olmaları, yüksek organizasyonlu bitkiler gibi fotosentez yapabilmeleri, kontaminasyon riskinin diğer bakterilere göre daha az olması, geniş spektrumlu antibakteriyal, antifungal ve antiviral aktiviteye sahip olmaları, ağır metaller ve herbisitler gibi bazı toksik maddelere ve stres şartlarına dirençli olmaları nedeniyle siyanobakteriler biyoteknoloji çalışmalarında en çok tercih edilen mikroorganizmalardır.

Son yıllarda Siyanobakterilerin ürettiği metabolitlere ilgi artmıştır. Bazı firmalar bu canlıların çeşitli şekillerde ürün haline getirip ticari olarak satışa sunmaktadır. *Spirulina* yaklaşık 70 ülkede insanlar tarafından gıda olarak tüketilmektedir [Cox ve ark., 2005]. Birçok Siyanobakter en az soya fasülyesi kadar protein ihtiva etmektedir. Siyanobakteriler aynı zamanda yüksek miktarlarda vitamin üretmektedirler. Özellikle *Spirulina* B₁₂ vitaminince zengin olup aynı zamanda provitamin A, E vitamini, tiyamin, kobalamin, biyotin ve inozitol üretebilmektedir. Birçok ülkede siyanobakteriler makarna, margarin, yoğurt, peynir gibi gıdalara direkt olarak katılmaktadır [Pulz ve Gross, 2004].

Siyanobakter metabolitleri biyoteknoloji, tıp ve eczacılık endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Birçok araştırmacı siyanobakterilerin biyolojik aktivitesinde antikanser özelliğinin olduğunu rapor etmişlerdir. Şu ana kadar bu canlılardan elde edilen en önemli antitümör özellikteki madde kriptofisin Trimurtulu ve ark. (1994) tarafından tanımlanmıştır [Trimurtulu ve ark., 1994]. Diğer bir antikanser bileşen Dolastatin ise siyanobakterlerin *Lyngbya* ve *Symploca* cinsinden elde edilmiştir [Luesch ve ark., 2002]. Dolastatin analogları, klinik denemelerde göğüs ve karaciğer kanserlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Siyanobakterilere mavi rengini veren C-fikosianin pigmenti yüksek miktarda fikobiliproteinden meydana gelmiştir ve bu proteinin potansiyel bir kemoterapik ajan olduğu bilinmektedir. Yapılan araştırmalarda C-fikosianin'in apoptotik tümör hücrelerini öldürdüğü rapor

edilmiştir [Pardhasaradhi ve ark., 2003, Subhashini ve ark., 2004]. Fikosiyanin pigmentinin aynı zamanda antioksidan, anti-inflamatuar ve sinir hücrelerini koruyucu özellikleri de bulunmaktadır [Hirata ve ark., 2000; Romy ve ark., 2003].

Birçok araştırmacı siyanobakterilerin antibiyotik özelliklerinin olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan araştırmalara göre bu canlılar yağ asitleri, bromfenoller, peptidler, poliketidler, polisakkaritler ve alkoller gibi antibiyotik özellikteki bileşikler ihtiva etmektedirler [Skulberg, 2000]. Pulz ve Gross (2004), *Spirulina*'nın insan sindirim sisteminde bulunan *Lactobacillus*'ların gelişmesini arttırdığını tespit etmişler ve bu canlıların gıda olarak tüketiminin sindirim sisteminin düzenlenmesi açısından avantaj sağlayacağını belirtmişlerdir [Pulz ve Gross, 2004]. Siyanobakterilerin ürettikleri sülfatlı homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritlerin HIV ve *Herpes simplex* gibi retrovirüsler üzerinde antiviral etkisinin olduğu rapor edilmiştir [Schaeffer ve Krylov, 2000]. Başka bir çalışmada ise *Microcystis* sp.'nin metanolik ekstraktının influanza virüsüne karşı etkili olduğu tespit edilmiştir [Zainudin ve ark., 2002]. Sıçanlarla yapılan bir çalışmada, kolesterol hastası olan sıçanlar düzenli olarak siyanobakter tozları ile beslendiğinde serumlarındaki kolesterolün düştüğü tespit edilmiştir [Shibata ve ark., 2001]. Nostoc 78-12A'dan elde edilen nostokarbolinin potansiyel bir bütirilkolinesteraz inhibitörü olduğu tespit edilmiştir [Becher ve ark., 2005]. Bütilesteraz inhibitörü alzhaymer hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. Bu nedenle nostokarbolinin bu hastalığın tedavisinde kullanılması olasıdır.

Siyanobakterilerin ürettikleri diğer bir metabolit de ekzopolimerlerdir. Ekzopolimerler olumsuz çevre şartlarına direnç sağlayarak ortamda bulunan ağır metaller gibi toksik inorganik metalleri toplama özelliğine sahiptir. Mikrobiyal polisakkaritler özellikle endüstride çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde kıvam arttırıcı ve jelleştirici ajan olarak kullanılırken (Gandhi ve ark., 1997), eczacılıkta ise bazı aşıların geliştirilmesinde, anti-HIV ajanı ve bağışıklık sistemini düzenleyici olarak kullanılmaktadır (Shah ve ark., 2000).

Bütün bu özelliklerin yanı sıra birçok siyanobakter çevre ve canlılar açısından risk oluşturan toksinler üretmektedirler. Tatlısularda kirliliğin artması ile birlikte toksin üreten siyanobakterlerde de artış gözlenmektedir. Yaklaşık 56 Siyanobakter cinsinden 13 tanesi, hücre duvarından sentezlenen hepatoksin (mikrosistin, nodularin ve silindrospermopsin) ve nörotoksin (anatoksin-a, anatoksin-a(s) ve saksitoksin) olmak üzere iki çeşit toksin bulunmaktadır [Harada, 2004]. Mikroalglerden toksin üreten cinsler *Microcystis* spp., *Planktothrix* spp., *Oscillatoria* spp., *Nostoc* spp., *Anabaena* spp., *Anabaenopsis* spp., *Hapalosiphon* spp., *Nodularia* spp., *Aphanizomenon* spp., *Cylindrospermum* spp., *Lyngbya* spp., *Cylindrospermopsis* spp., *Planktothrix* spp., *Synechococcus* spp., *Gloeotrichia* spp., *Schizothrix* spp., *Synechocystis* spp.'dir [Sivonen ve Jones, 1999].

2.8. Siyanobakteriler ile Ağır Metal Giderimi

Dünyanın en büyük primer üreticileri olan siyanobakteriler çok önemli biyomateriyaller üretebilme yeteneğine sahip olsalar da araştırmacılar tarafından en çok ilgi çeken özellikleri ağır metal giderimidir. Fungus, maya ve diğer bakterilerle karşılaştırıldığında siyanobakteriler, hücre duvar yapısında ihtiva ettikleri özel polimerlerden dolayı metal bağlama kapasitesi daha yüksek olan mikroorganizmalardır [Tüzün ve ark., 2005]. Ağır metal gideriminde en çok kullanılan siyanobakteriler, *Synechococcus* spp., *Aphanoteche* spp., *Microcystis* spp., *Gleotheca* spp., *Oscillatoria* spp., *Anabaena* spp., *Lyngbya* spp., *Phormidium* spp., *Nostoc* spp., *Spirulina* spp.'dir [Roane, 1994].

Siyanobakterilerin hücre yüzeylerinde polisakkaritler ve proteinler gibi ağır metallerin bağlanmasına yarayan çeşitli bölgeler bulunmaktadır. Bu fonksiyonel gruplara, hücre duvarındaki polisakkarit ve proteinlere bağlı olarak bulunan anyonik karboksil, hidroksil, karbonil, sülfat, fosfat, tiyol, thioeter, amin, imin, amid, imidazol ve fosfodiester gruplarını örnek olarak verebiliriz [Crist ve ark., 1994; Crist ve ark., 1999; Ting ve ark., 2002]. *Chlamydomonas reinhardtii* ile yapılan bir çalışmada lyofilize biyomas ile kadmiyumun hücre yüzeyine tutunması araştırılmış,

FITR spektra sonuçlarına göre Cd(II) bağlanmasının karboksilik fonksiyonel gruplar vasıtası ile ilgili olduğu belirlenmiştir [Adhiya ve ark., 2002].

Siyanobakteriler, çeşitli olumsuz çevresel rejimlere karşı savunma mekanizması olarak, biyosorpsiyon kapasitesini de olumlu yönde etkileyen, EPS (eksopolisakkarit) üretmektedirler [Reddy ve ark. 1996; Singh ve ark. 1999]. Ürettikleri eksopolisakkarit yapı suda çözünebilir bir karaktere sahip olup birçok endüstri alanında ham madde olarak da kullanılmaktadır [De Philippis ve ark. 1998, 2000; Nicolaus ve ark., 1999]. Ağır metallere maruz kalan hücreler EPS üretimlerini arttırarak, EPS'ye bağlı fonksiyonel gruplar vasıtası ile metalleri bağlamaktadırlar.

Metal gideriminde bir diğer faktör de proteinlerdir. Hücre membranından metallerin taşınmasını sağlayan proteinlerin dışında hücre içersinde çözünebilir reseptör proteinler de bulunmaktadır [O'Halloran ve Cullota, 2000]. Ağır metallere maruz kalan siyanobakter hücreleri metal bağlayıcı peptidler sentezlemektedirler. Bu peptidler vakuollere yerleşerek sitoplazma içersinde dağılarak, hücre içersine giren metalleri detoksifiye etmektedirler. Metal bağlayıcı peptidler, metabolizma için gerekli metallerin konsantrasyonlarını da düzenlemektedirler [Cobbett ve Goldsbrough, 2002]. Özellikle class II metallothioneinler siyanobakterilerde çok yaygın olarak bulunmaktadır [Gaur ve Rai, 2001]. Ayrıca siyanobakteriler ağır metal stresine karşı GroEL stres proteinleri sentezleyerek class II metallothioneinler ile birlikte ağır metallere maruz kalan siyanobakterilerde hücre hasarı azaltmaktadır. Class II metallothioneinler sistein aminoasitince zengin olup sülfidril grupları içermektedirler. Metaller sistein aminoasitlerinde bulunan sülfidril gruplarına tutunmaktadırlar [Ybarra ve Webb, 1999].

Sülfidril gruplarına aynı zamanda tiyol grupları da denilmektedirler. Metallothionein, fitoşelatin ve protein yapısı içermeyen glutatyonda bol miktarda tiyoller bulunmaktadır. Yapılarına -SH grupları içeren tiyoller toplam tiyol, proteine bağlı tiyol ve proteine bağlı olmayan tiyoller olmak üzere üç gruba ayrılmaktadırlar [Cobbett ve Goldsbrough, 2002]. Hem proteine bağlı hem de proteine bağlı olmayan tiyoller metal detoksifikasyonunda görev almaktadırlar. Hücreler metale maruz

kaldıklarında her iki tiyol grubunda da artış olduğu gözlenmiştir [Guimaraes-Soares ve ark., 2007].

Mikroalgler ve siyanobakterilerin Cr(VI) ve Cd(II) giderimi ile ilgili bir çok araştırma yapılmış, sıcaklık, pH, tuzluluk, ortamın aerobik veya anaerobik olması gibi çeşitli çevresel faktörlerin yanı sıra mikroorganizmanın türü de metal alınımında etkili olduğu rapor edilmiştir [Goldberg, 2005] (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4. Bazı mikroalglerin Cr(VI) ve Cd(II) alma kapasiteleri

Mikroorganizma	Metal	Kapasite (mg/g)	Kaynak
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cr(VI)	23,60	Aksu ve Kutsal (1990)
<i>Cladophora crispata</i>	Cr(VI)	30,40	Aksu ve ark. (1996)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cr(VI)	23,00	Cetinkaya Donmez ve ark. (1999)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Cr(VI)	15,60	Cetinkaya Donmez ve ark. (1999)
<i>Synechocystis</i> sp.	Cr(VI)	19,20	Cetinkaya Donmez ve ark. (1999)
<i>Dunaliella</i> sp.	Cr(VI)	58,30	Donmez ve Aksu (2002)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cd(II)	85,30	Aksu (2001)
<i>Gelidium</i> algae	Cd(II)	18,00	Vilar ve ark. (2006)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Cd(II)	42,60	Tüzün ve ark. (2005)
<i>Spirulina platensis</i>	Cd(II)	98,04	Rangsayatorm ve ark. (2002)
<i>Chlorella minutissima</i>	Cd(II)	11,10	Roy ve ark. (1993)
<i>Caulerpa lentillifera</i>	Cd(II)	4,70	Pavasant ve ark. (2006)
<i>Synechococcus</i> sp. H1	Cd(II)	47,73	Saeed ve Iqbal (2006)
<i>Synechococcus</i> sp. H1 (Tutuklanmış)	Cd(II)	57,76	Saeed ve Iqbal (2006)
<i>Oscillatoria</i> sp. H1	Cd(II)	27,50	Katircioğlu ve ark. (2007)
<i>Oscillatoria</i> sp. H1 (Tutuklanmış)	Cd(II)	32,20	Katircioğlu ve ark. (2007)

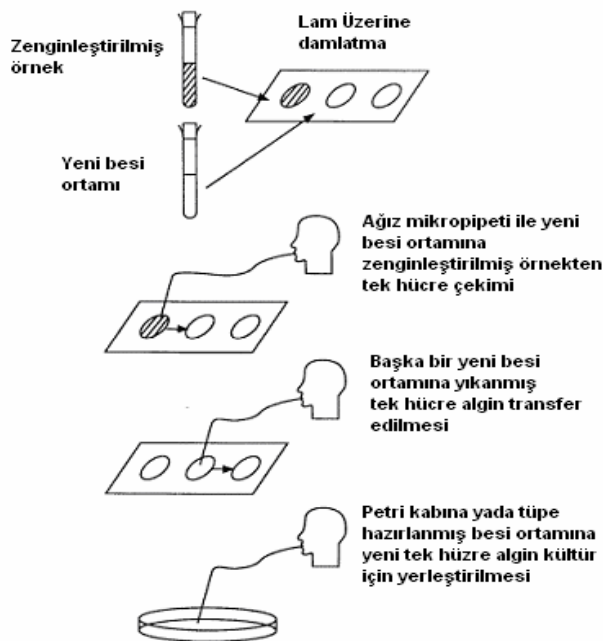
Son yıllarda ağır metallerin siyanobakteriler üzerine etkisini ve hücrel deformasyonları daha detaylı incelemek için taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve enerji dağılım spektroskopisi (EDS) analizleri yapılmaktadır [McLean ve Beveridge, 2001; Wang ve Chen, 2006; Priester ve ark., 2007; Can ve Jianlong, 2008]. SEM bir mikroskop çeşidi olup ışık yerine elektron kullanarak nesne ve mikroorganizmaların yüzeyini tarayarak görüntülemektedir. Walker ve ark. (2001), metal stresine maruz kalan hücrelerin ürettikleri ekzopolisakkaritlerin durumlarının incelenmesinde SEM'in etkili bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir [Walker ve ark., 2001]. EDS ise yine elektron vasıtası ile yüzeyde bulunan elementlerin analizini yapmaktadır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Siyanobakterilerin izolasyon ve tanımlanmaları

Mogan Gölü, Kurtboğazı Barajı, Uncalı Deresi, Bafa Gölü, Hatim Çayı, Harikalar Diyarı Göleti ve Kızılırmak Nehri'nden alınan su örneklerinden 15 adet siyanobakter izolatu izole edilmiştir. İzolasyon işlemleri Rippka ve ark.'nın (1979) metoduna göre yapılmış ve kültür için BG11 besiortamı kullanılmıştır [Rippka ve ark., 1979]. Siyanobakter suşlarının izolasyonu iki şekilde yapılmıştır. Genelde saflaştırma yoğun halde üreyen karışık kültürden pastör pipeti ile tek hücre alınıp yeni bir besiortamına aktarılırak (Şekil 3.1), bazen de BG11 agar plaklarında oluşan tek koloninin yeni bir besiortamına aktarılması ile yapılmıştır. Saf kültürler Bergeys'in Manual of Systematic Bacteriology'e göre cins düzeyinde yapılmıştır [Bone ve ark., 2001].



Şekil 3.1. Şematik olarak siyanobakter izolasyonu.

Morfolojilerine Göre Tanımlama

Saf kültürler trinoküler Leica DM LB2 kamera ataçmanlı ve bilgisayar donanımlı ışık mikroskobu kullanılarak morfolojik karakterleri ve bölünme fizyolojilerine göre Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de anlatıldığı gibi tanımlanmışlardır. İzolat boyutları görüntü analiz sistemi kullanılarak ölçülmüştür.

16S rRNA'larına Göre Tanımlama

Çizgi ekimleri yapılan kültürlerden tek koloni alınarak, saf kültürlerin üretimi sıvı BG11 ortamında 25 °C'de, 12/12 saat gündüz/gece periyodunda, 120 rpm çalkalamada, % 5'lik CO₂ kültür şartlarında gerçekleştirilmiştir. Kültürlerin gelişim ortamına 5 µg/l oranında kanamisin ve sefoksitin antibiyotiği ilave edilerek bakteriyel kontaminasyondan korunmuştur.

İzolatların DNA'sı DNeasy® Blood & Tissue Kit (Cat. No.: 69504, QIAGEN) ile izole edilmiştir. PCR'da (polimer zincir reaksiyonunda) kullanılacak örneğin DNA miktarı 20 ng/µl, saflığı (OD_{260/280}) 1,8 olacak şekilde 16S rDNA sekansları siyanobakterilere özgü CYA-106F ve CYA-781R primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır [Nubel ve ark., 1997; Thacker ve Starnes, 2003]. Bu primerlerinin yanı sıra amplifikasyon için Prof. Dr. Belma Aslım tarafından tasarlanan BA-CF ve BA-CR primerleri de kullanılmıştır (Çizelge 3.1). PCR şartları Nübel ve ark. (1997)'de izah edildiği şekilde yapılmıştır. 20 ng kalıp DNA, 5 µl 10 x PCR tamponu (100 mM Tris-HCl, pH 9; 500 mM steril KCl), 15 mM MgCl₂, 1 U Taq DNA Polimeraz, 0,50 mM ileri primeri, 0,50 mM geri primeri, 25 nmol dATP, 25 nmol dGTP, 25 nmol dCTP, 25 nmol dTTP karışımı steril ddH₂O ile 50 µl'ye tamamlanmıştır. Çoğaltma işlemi 200 µl'lik tüplerde Hybaid thermocycler (ThermoHybaid, UK) cihazında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sıcaklıkları ve süreleri ise: İlk denaturasyon basamağı 94 °C'de 5 dak olarak gerçekleştirildikten sonra, 35 döngü 95 °C'de 1 dak (denaturasyon için), 60 °C'de 1 dak (hibridizasyon için), 72 °C'de 1 dak

(polimerizasyon için) şeklinde gerçekleştirilmiştir. PCR ile çoğaltılan DNA'lar % 1'lik agaroz jelde DNA marker (Ambresco) ile birlikte yürütülmüştür. Sekans analizi REFGEN (Ankara) tarafından yapılmış ve analiz sonuçları blast fonksiyonu ile NCBI DNA Gen Bankası'nda taranarak moleküler tanımlama yapılmıştır.

Çizelge 3.1. Primer sekansları, optimal annealing sıcaklıkları ve hedeflenen bölgeler

Primer	Sekans (5' – 3')	Baz	Çoğaltılan Bölge
CYA-106F	CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA	22	640 bp
CYA-781R	GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT	25	
BA-CF	GCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGA	24	629 bp
BA-CR	CATGGTGTGACGGGCGGTGTG	21	

3.1.2. Kültürlerin gelişim ortamları

Teşhisi yapılan saf kültürler fotosentetik bakterilere özel çalkalamalı etüvde (Minitron), 250 ml'lik erlenler içerisinde 120 rpm çalkalamada, 25 °C'de, 12 saat gündüz, 12 saat gece periyodunda üremeye bırakılmıştır. Gündüz periyodundaki ışık şiddeti 3000 lüks'dür. Siyanobakter örneklerinin kültüre edilmesinde flöresan lambalı düzenek ve Minitron marka inkübatör kullanılmıştır (Resim 3.1 ve 3.2). İnkübasyon süresi 15–30 gündür.



Resim 3.1. Kùltürler için inkübasyonun yapıldığı inkübatör



Resim 3.2. Kùltürler için inkübasyonun yapıldığı düzenek

3.1.3. Araştırmada kullanılan besiortamları

Siyanobakter izolatlarının aktifleştirilmesi için BG11 besiortamı kullanılmıştır [Ripka ve ark., 1979].

BG11 sıvı besi ortamı

Maddeler 1000 ml distile suya tamamlanmıştır. Besi ortamının pH'sı 0,01 M HCl ile 6,8'e ayarlanmıştır. Amaca uygun olacak şekilde besiortamına % 1,5 oranında agar ilave edilip katı besi ortamı hazırlanmıştır. Besi ortamı 121 °C'de 15 dak steril edilmiştir.

Maddeler	g/l
NaNO ₃	15
K ₂ HPO ₄	0,40
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,75
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,36
sitrik asit	0,06
ferik amonyum sitrat	0,06
Na ₂ -EDTA	0,01
Na ₂ CO ₃	0,20

İz element çözeltisi:

Maddeler	mg/l
H ₃ BO ₃	61,0
MnSO ₄ .H ₂ O	169,0
ZnSO ₄ .7H ₂ O	287,0
CuSO ₄ .5H ₂ O	2,5
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	12,5

3.2. Metod

3.2.1. İzolatların muhafazası

İzolatların muhafazası BG11 sıvı ve agar besi ortamında gerçekleştirilmiştir. 3.1.2 numaralı bölümde anlatıldığı gibi geliştirilen 15-30 günlük sıvı kültürler ve agar plaklarında tek koloni halinde üremeleri sağlanmış izolatlar +4 °C’de muhafaza edilmişlerdir.

3.2.2. Biyokütlenin ölçülmesi

Siyanobakter kültürlerin biyokütlelerinin kantitatif değerleri, 664 nm’deki optik yoğunlukları (OD_{664}), klorofil-a ve protein miktarının ölçülmesiyle elde edilmiştir [Cirik ve Gökpinar, 1993].

Klorofil-a miktarı tespiti, siyanobakterilerde canlılığın ve biyokütlenin belirlenmesinde çok sık kullanılmaktadır. Bu çalışmada klorofil-a tespiti için 12 gün boyunca Bölüm 3.1.2’de anlatıldığı gibi inkübasyona bırakılan aktif kültürlerin 1 ml’si santrifüj edilmiştir. Pellet % 80’lik aseton (Merck) ile muamele edilip bir gece +4 °C’de bekletilmiştir. 24 saat sonra 664 nm ve 750 nm dalga boylarında DIGILAB-HITACHI U-1800 marka spektrofotometrede ölçümleri yapılmış ve örnekler ait değerler aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır [Hirschberg ve Chamovitz, 1994].

$$\text{Klorofil-a } (\mu\text{g/ml}) = (A_{664} - A_{750}) \times 11,92$$

Proteinler kolorimetrik olarak Bradford yöntemi kullanılarak Bradford çözeltisi (Sigma-Aldrich) ile tespit edilmiştir [Bradford, 1976]. 100 µl örnek alınarak üzerine 1 ml Bradford çözeltisi ilave edilmiştir. 5 dak karanlıkta ve oda sıcaklığında bekleyen karışım 595 nm’de körve (örnek ihtiva etmeyen karışım)

spektrofotometrede okunmuştur. Standart olarak bovin serum albumin (BSA) kullanılmıştır. 2,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30 µg/ml konsantrasyonlarında BSA çözeltileri hazırlanarak 595 nm’de okunmuştur. Deneyler 3 paralelli gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Siyanobakter izolatlarının ışık mikroskobu görüntüleri

Çalışmada kullanılan 15 siyanobakter izolatının LEICA DM LB2 marka ışık mikroskobu ile görüntüleri çekilmiştir. Skalalar mikroskoba ait software programında otomatik olarak verilmiştir.

3.2.4. Metal iyon çözeltilerinin hazırlanması

Biyosorpsiyon denemeleri için seçilen Cr(IV) için $K_2Cr_2O_7$ ve Cd(II) için $CdCl_2$ ’den 1000 ppm’lik distille suda çözünmüş ana stoklar hazırlanmıştır. Ayrıca, hazırlanan 1, 3 ve 5 ppm’lik metal çözeltileri atomik absorpsiyon okumaları için kullanılmıştır. Önemli bir değişken olan pH’nın metalden etkilenmemesi için deney setlerinde seyreltme için distile su yerine Britton-Robinson tampon çözeltisi [İnam ve Toprak, 2005] kullanılmıştır.

Britton-Robinson tampon çözeltisi:

Maddeler	Miktar
asetik asit	2,3 ml
% 85’lik fosforik asit	2,7 ml
borik asit	2,5 g

Karışım triple distille su ile 1000 ml’ye tamamlanarak hazırlanmıştır (pH 2).

3.2.5. Toksidite ve toleranslarının tespiti

Bu çalışmada toksik madde olarak metal tuzlarından krom(IV) ($K_2Cr_2O_7$) ve kadmiyum(II) ($CdCl_2$) kullanılmıştır. Denemelerde 5, 15, 25, 35, 45, 50 ppm (mg/l)'lik konsantrasyonlarında Cr(VI) ve Cd(II) olacak şekilde 100 ml'lik BG11 besiortamları hazırlanmıştır. Uygulanan konsantrasyonların etkisinde 12 gün boyunca 48 saatte bir numuneler alınmıştır. Kullanılan ağır metallerin toksiditesi klorofil-a miktarlarına bakılarak belirlenmiştir. Metal içermeyen besiortamında hazırlanan kültürler de kontrol olarak kullanılmıştır. Canlı hücrelerin % 50'sini öldüren metal dozları (EC_{50}), % 95 güven sınırlarında probit analizleri ile tespit edilmiştir [OECD, 1984, APHA, 1971]. EC_{50} değerleri, altıncı güne ait metale maruz kalan hücrelerin biyokütlelerinin kontrol hücrelerin biyokütlelerinden çıkarılarak hesaplanmıştır. Çalışmalar 3 paralelli olarak tasarlanmıştır [Finney, 1963].

3.2.6. Tutuklanmış materyalin hazırlanması

İzole edilen kültürlerden Cr(VI) ve Cd(II)'ye en toleranslı olan izolat EC_{50} değerlerine göre seçilmiş ve bundan sonraki denemelerde bu izolat kullanılmıştır.

Ca-aljinatla tutuklama için, 100 ml % 2'lik Na-aljinat (2,0 g; from *Macrosytia pyrifera*, high viscosity, Sigma Chem., Co., U.S.A.) hazırlanmış ve algal biyokütle ile karıştırılmıştır. Tutuklama için canlı ve cansız siyanobakter hücreleri kullanılmıştır. 30 günlük bir inkübasyondan sonra hücreler santrifüj ile toplanarak 0,1 M HCl ile muamele edildikten sonra iki kez distile su ile yıkanmış ve 70 °C'de etüvde kurutularak toz haline getirilerek ölü biyokütle hazırlanmıştır. Canlı biyoküteller ise, 30 günlük bir inkübasyondan sonra hücreler santrifüj ile toplanarak iki kez steril distille su ile yıkanmış ve direkt olarak olarak tutuklanmıştır. Tutuklanmış hücreler, % 2'lik aljinat karışımı içersine ölü ve canlı hücrelerden 1 g karıştırılarak hazırlanmıştır. Aljinat karışımı 0,01 M $CaCl_2$ çözeltisi içine, manyetik karıştırıcı da kullanarak, şırınga yardımıyla damlatılmıştır. Küreler yaklaşık 4 mm çapında olup sertleşmesi için 1 saat soğuk $CaCl_2$ içinde tutulmuştur. Üç kez 150 ml steril distile suda yıkanan küreler kullanılıncaya kadar saklanabilmesi için 5 mM

CaCl₂ içinde, 4 °C’de muhafaza edilmiştir. Tutuklanan organizma miktarını belirleyebilmek için de hazırlanan küreler bir havanda ezilerek klorofil-a miktarları Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı gibi tespit edilmiştir.

3.2.7. Biyosorpsiyon deneyleri

Biyosorpsiyon deneylerinde cansız (inaktif), tutuklanmış cansız (inaktif) ve tutuklanmış canlı (aktif) hücrelerin metal adsorblama mekanizması üzerine pH, biyokütle, sıcaklık, metal konsantrasyonları ve zaman gibi değişkenlerin etkisi incelenerek, metal gideriminin en yüksek olduğu şartlar belirlenmiştir. Cr(VI) ve Cd(II) biyosorpsiyonu için pH 2-8 aralığında denenerek en uygun pH, çeşitli biyokütle miktarları (ölü hücreler için, 0,03-0,1 g ve tutuklanmış hücreler için, 10-60 küre) denenerek en uygun miktar, ortam sıcaklığı 20-40 °C arasında denenerek en uygun sıcaklık, 50-300 ppm arasında metal konsantrasyonları denenerek en uygun konsantrasyon ve 0-24 saat zaman aralığı denenerek en uygun zaman birimi tespit edilmiştir.

Cansız biyokütlenin hazırlanmasında; kültür 30 günlük üreme periyodunun ardından +4 °C’de 10 000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Besi ortamından kaynaklanan ağır metal iyonlarının uzaklaştırmak amacıyla 0,1 M HCl ile muamele edildikten sonra iki kez distile su ile yıkanmıştır. Her yıkama işleminin ardından hücreler soğutmalı santrifüj yardımı ile 10 000 rpm’de çöktürülerek toplanmıştır. Son yıkama işleminden sonra çöktürülen biyokütle 70 °C’de 24 saatte kurutularak yaklaşık 200 µm boyutunda bir havanda öğütülmüştür [Lau ve Wong, 1998, Zhou ve ark., 1998]. Biyosorpsiyon deneylerinde 0,05 g cansız, 0,95 g tutuklanmış cansız ve 0,99 g tutuklanmış canlı biyokütleler kullanılmıştır.

İçersinde 50 ml 100 ppm (mg/l)’lik metal çözeltisi bulunan 100 ml’lik erlenlere 0,05 g cansız biyokütle eklenerek, ortamın pH’ sı 2-8 aralığında değiştirilerek metal adsorpsiyonunun en fazla olduğu pH belirlenmiştir. Daha sonra sırası ile biyokütle, sıcaklık, metal konsantrasyonları ve zamanın etkisi denenmiştir. Tüm işlemlerin

yapılması sırasında etkili adsorpsiyonun sağlanabilmesi amacı ile sıcaklık ve pH sabit tutularak 100 rpm’de çalkalama yapılmıştır.

Tutuklanmış materyallerin biyosorpsiyon denemelerinde; aynı şekilde hazırlanan metal ortamlarına, ayrı olarak, canlı (aktif), cansız (inaktif) ve boş (mikroorganizma içermeyen) kürelerden 30’ar tane konulmuştur. Metallerin biyosorpsiyon mekanizması üzerine pH (2-8), biyokütle (10-60 küre), sıcaklık (20-40 °C), metal konsantrasyonları (50-300 ppm) ve zaman (0-24 saat) gibi değişkenlerin etkisi incelenmiştir. Her deney seti üç paralelli olarak düzenlenmiştir. Alınan örnekler atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS) ile okunmuş ve adsorblanan metal miktarları belirlenmiştir. Okunmanın yapılacağı gün Cr(VI) ve Cd(II) metalleri için 1, 3 ve 5 ppm’lik kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır.

Bu çalışmada Philips PU9285 model alevli atomik absorpsiyon spektrofotometresi (AAS) kullanılmış olup çalışılan elementler için aletsel parametreler Çizelge 3.2’de verilmiştir. Atomlaşma ortamı olarak hava/asetilen alevi, zemin absorpsiyonlarını düzeltmek için de döteryum lambası kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Çalışılan elementler için aletsel parametreler

Parametreler	Element	
	Krom(VI)	Kadmiyum(II)
Çalışılan dalga boyu (nm)	357,9	228,8
Yarık genişliği (nm)	0,5	0,5
Lamba akımı (mA)	9,0	9,0
Asetilen akış hızı (l/dak)	1,6	1,1
Zemin düzeltme (DL)	Var	Var

3.2.8. Desorpsiyon deneyleri

Çalışmada kullanılan kuru ve tutuklanmış biyomateriyallerin tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için aynı örnek beş defa biyosorpsiyon işleminin ardından beş defa

desorpsiyon işlemine tabi tutulmuştur. Her bir biyosorpsiyon-desorpsiyon işlemi 1 döngü olarak kabul edilmektedir.

Cr(VI) ve Cd(II)'nin desorpsiyonu 50 ml 0,1 mol/l HCl ile yapılmıştır. Cr(VI) ve Cd(II)'ye maruz bırakılan cansız biyokütle ile tutuklanmış canlı ve cansız biyokütle ve boş Ca-aljinat küreleri desorpsiyon ortamına koyularak, bir saat boyunca 100 rpm'de 25 °C'de çalkalanmıştır. Her bir biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonrasında örnekler % 0,9'luk tuz çözeltisi ile yıkanarak, diğer döngü için hazır hale getirilmişlerdir [Tüzün ve ark., 2005]. Biyosorpsiyon ortamından ve desorpsiyon çözeltisinden (0,1 mol/l HCl) alınan örnekler AAS ile okunmuştur. Deneyler 3 kez tekrarlanmıştır. Desorpsiyon oranı şu denklemle hesaplanmıştır:

$$\text{Desorpsiyon oranı} = \frac{\text{Desorbe olan metal iyon miktarı}}{\text{Biyosorbent üzerinde tutunan metal miktarı}} \times 100 \quad (2)$$

3.2.9. Biyobirikim deneyleri

Daha önceden belirlenen *Synechocystis* sp. BASO670 izolatına Cr(VI) ve Cd(II)'nin EC₅₀ değerleri sırasıyla 11,5 ve 15,3 ppm'dir. Bu nedenle biyobirikim deneylerinde EC₅₀ değerlerinin altı olan 10 ppm Cr(VI) ve Cd(II) çözeltileri kullanılmıştır. 30 günlük BG11 besiortamında üretildikten (Bölüm 3.1.2'de açıklandığı şekilde) sonra OD₆₆₄'si 2,3-2,5 yoğunlukta olan kültürler, 250 ml'lik erlenlere 200 ml koyularak her bir erlenin metal konsantrasyonu 10 ppm olacak şekilde bir hafta boyunca 25 °C'de, 100 rpm çalkalamada, 3000 lüks ışık şiddetinde 12 saat gündüz 12 saat gece inkübasyona bırakılmıştır. Biyobirikim deneylerinde ayrıca 10 ppm Cr(VI) ve 10 ppm Cd(II)'den oluşan metal karışımı da denenmiştir. 0. zaman da dahil olmak üzere *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının Cr(VI) ve Cd(II) alma kapasitelerini belirlemek için 0', 5', 10', 20', 30', 60', 120', 1.-7. güne kadar 1'er ml örnek alınmıştır. Cr(VI) ve Cd(II) konsantrasyonları AAS ile ölçülmüştür. Deneyler üç paralelli olarak çalışılmış ve üç aşamadan oluşmaktadır; suda kalan metal miktarı, hücre yüzeyine

tutunan metal miktarı ve hücre içersine alınan metal miktarı [Matsunaga ve ark., 1999].

Suda kalan metal miktarı: Her zaman diliminde 1 ml örnek alınarak 10 000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Üst fazda kalan metal miktarı AAS ile tayin edilmiştir.

Hücre yüzeyine tutunan metal miktarı: Yukarda belirtilen zaman dilimlerinde 1’er ml alınan örnekler 10 000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Hücreler üzerine 1 ml 10 mM EDTA (Merck) çözeltisi eklenmiş ve vortekslenerek hücre yüzeyine tutulan metal desorbe edilmiştir. Örnekler 10 000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Elde edilen üst faz, hücrenin yüzeyine yapışan metal miktarını belirlemek üzere AAS ile tayin edilmiştir.

Hücre içersine alınan metal miktarı: Her bir zaman diliminde 1 ml alınan örnekler 10 000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Hücre içine alınan metalin belirlenmesi için hücreler üzerine 1 ml 1 M HNO₃ ilave edilerek 10 000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Üst faz AAS ile tayin edilmiştir.

3.2.10. Taramalı elektron mikroskop (SEM) için hücrelerin hazırlanması

Cr(VI), Cd(II) ve Cr(VI)+Cd(II) metallerinin hücrede etkilerini ve hücre etkileşimini görüntüleyebilmek amacıyla elektron mikroskobu çalışması yapılmıştır. Mikroskop çekimlerinden önce; 30 günlük BG11 besi ortamında üretildikten (Bölüm 3.1.2’de açıklandığı şekilde) sonra, OD₆₆₄’si 2,3-2,5 yoğunlukta olan aktif kültürler aşağıda verilen ortamlara ilave edilmiştir.

- Kontrol (metalsiz ortamda geliştirilmiş hücre kültürü)
- 10 ppm Cr(VI)
- 10 ppm Cd(II)
- 10 ppm Cr(VI) + 10 ppm Cd(II)

Yukarda verilen 4 farklı ortama ekilen siyanobakter kültürleri, biyobirikim çalışması ile aynı koşullarda (pH=7, T=25 °C, 100 rpm, t=7 gün ve 12 saat gece/12 saat gündüz) inkübasyona bırakılmıştır.

Yedi günlük inkübasyon süresi sonunda, siyanobakteriler 50 ml'lik tüplere alınarak 3000 rpm'de 15 dak santrifüj edilmiştir. Duru faz atıldıktan sonra kültürün üzerine 1 ml 0,1 M PBS (Phosphate-Buffered Saline) tamponu ile iki kez yıkanmıştır. Daha sonra 3000 rpm'de 15 dak santrifüj edilmiştir. Duru faz atıldıktan sonra kültürün üzerine 1 ml % 2,5-3'lük glutaraldehit (Electron Microscope Sciences) eklenmiştir.

Yapılan ön işlemlerden sonra, siyanobakteriler Polaron SC 502 Sputter Coater marka kaplayıcı kullanılarak altınla kaplanmıştır. Kaplama işleminin ardından örnekler Jeol JSM 6060 marka taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiş ve ilgili kısımların görüntüleri bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Bu işlemler, Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Elektron Mikroskobu laboratuvarlarında yapılmıştır.

Hücre yüzey analizleri, Marmara Üniversitesi'nde Jeol JSM-5910 marka taramalı elektron mikroskobuna (SEM) bağlı, Oxford marka enerji dağıtımli X-ışını analizörü (Energy dispersive X-ışını spectroscopy, EDS) ile görüntüsü çekilen alanlardaki element dağılımları belirlenerek yapılmıştır.

Phosphate-Buffered Saline Tamponu:

Maddeler	g/l
NaCl	0,80
KCl	0,20
Na ₂ HPO ₄	1,44
KH ₂ PO ₄	0,24

1M NaOH ve HCl ile pH değeri 7,2'e ayarlanan tampon distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmış ve otoklavda steril edilmiştir.

3.2.11. Metalli ve kontrol ortamlarında geliştirilmiş siyanobakterilerin protein çalışması

30 günlük BG11 besi ortamında üreme periyodunun (Bölüm 3.1.2’de açıklandığı şekilde) ardından 200 ml, OD₆₆₄’si 2,3-2,5 yoğunlukta olan kültürler 7 gün süre ile 10 ppm Cr(VI), 10 ppm Cd(II) metallerine ve 10 ppm Cr(VI)+10 ppm Cd(II) metal karışımlarına maruz bırakılmışlardır. Proteinlerinin izolasyonu Laemmli (1970)’in önerdiği yöntemine göre yapılmıştır [Laemmli, 1970]. Kültürler 7. günün sonunda 10 000 rpm’de 10 dak santrifüj edilmiş ve sıvı faz atılarak elde edilen hücreler 5 ml PBS tamponu (pH 7) ile iki kez yıkanmıştır ve PBS tamponunda 50 MHz ultrasonikasyon (Vibra Cell) ile buz içerisinde 10 dak sonikasyona tabii tutulmuştur. Sonikasyon işleminden sonra hücreler 10 000 rpm’de 10 dak santrifüj edilmiştir. Üstteki sıvı kısımdan 75 µl alınarak 25 µl örnek tamponu ile karıştırılmış ve 5 dak kaynatılmıştır. Örnekleri -20 °C’de saklanmıştır.

Fosfat Tamponu (g/l): 6,8 g KH₂PO₄ ve 8,7 g K₂HPO₄ tartılarak ayrı ayrı 1000 ml distile suya tamamlanarak çözülmüştür. Hazırlanan iki çözelti belirli oranlarda karıştırılarak pH 7,0’a ayarlanmıştır.

Örnek Tamponu: 5 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 8 ml gliserol, 4 ml 2-β-merkaptotanol, 2 g SDS (sodyum dodesil sülfat), 0,01 g bromfenol mavisi, 3ml distile su ilave edilerek hazırlanmıştır.

3.2.12. SDS-PAGE jellerinin hazırlanması

Protein analizleri Laemmli’ ye göre % 4,5’luk yığınlaştırıcı ve % 10’luk ayırıcı jel kullanılarak sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) yapılmıştır [Laemmli, 1970].

Ayırma Jeli: 16,7 ml Akrilamid/Bis Akrilamid (% 30’ luk), 19,8 ml distile su, 12,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,6), 500 µl % 10’ luk APS (amonyum per sülfat), 500 µl %

10'luk SDS (sodyum dodesil sülfat) birbirine karıştırıldıktan sonra 30 µl TEMED (N,N, tetraetilen diamid) ilave edilerek, 1 mm aralığa sahip iki jel camı arasına hızlı bir şekilde dökülmüştür. Jelin üst kısmı distile su ile kaplanarak, hava ile teması önlenerek polimerize olması sağlanmıştır.

Yığma Jeli: 3,4 ml % 30'luk Akrilamid/Bis Akrilamid, 13,6 ml distile su, 2,5 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 200 µl % 10'luk APS ve 200 µl % 10'luk SDS birbiri ile karıştırıldıktan sonra 20 µl TEMED ilave edilmiştir. Bu karışım, polimerize olan ayırma jelinin üzerindeki distile su uzaklaştırıldıktan sonra ayırma jeli üzerine dökülmüştür. Tarak yerleştirilmiş ve jelin polimerize olması sağlanmıştır.

Polimerize olan jelden tarak çıkarılmış, jel tanka sabitlenmiş ve elektroforez düzeneği (Scie-Plus Vertical Electrophoresis) yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Protein marker (2 µl) (Biorad) ve örnekler (15 µl) kuyucuklara yüklenmiş ve güç kaynağı (Biometra) bağlantısı ile 24 mA'de 100 V' ta ortalama 5 saat yürütülmüştür.

Elektroforez işleminin hemen ardından jeller, tespit çözeltisi içerisinde bir gece bekletilmiştir. Tespitleme işleminden sonra jeller boyama çözeltisine alınmış ve ortalama iki gün bekletilerek boyanmıştır. Daha sonra jeller distile su ile 20 dak'lık aralıklarla yıkanarak jellerin zemininde bulunan boyanın çıkması sağlanmıştır. Jellerin görüntüleri bilgisayar bağlantılı tarayıcı ile alınarak bilgisayar ortamına aktarılmıştır.

SDS-PAGE Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler

Akrilamid Çözeltisi (% 30): 29,2 g akrilamid, 0,8 g N, N' metilen-bis-akrilamid 100 ml distile suya tamamlanarak çözölmüştür. Hazırlanan çözelti Whatman No:1 filtre kağıdından geçirilerek süzölmüş ve 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

1,5 M Tris-HCl (pH 8,6): 18,165 g Tris 75 ml distile suda çözölüp pH 1 M HCl ile 8,6'ya ayarlanmıştır. Son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

1M Tris-HCl (pH 6,8): 12,01 g Tris 75 ml distile suda çözülüp pH 1 M HCl ile 6,8'e ayarlanmıştır. Son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

SDS (% 10'luk): 10 g SDS 100 ml distile suya tamamlanarak çözölmüştür.

Amonyum persölfat (AP) (% 10'luk): 0,1 g AP 1 ml distile su içerisinde çözölerek hazırlanmıştır.

Elektroforez stok yürütme tamponu (pH 8,3) (5x): 25 mM Tris, 250 mM Glisin, % 1 (w/v) SDS, distile su karıştırılarak hazırlanmıştır.

Tespit çözeltisi: 25 ml % 100 (w/v) TCA (Trikloroasetik asit), 82,5 ml Metanol, 142,5 ml distile su karıştırılarak hazırlanmıştır.

Stok boya çözeltisi: 1 g Coomassie Brilliant Mavisi G-250, 46,5 ml HCl ile karıştırılarak hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Boya çözöldükten sonra Whatman No:1 filtre kağıdından süzülmüş ve renkli cam şişede oda sıcaklığında saklanmıştır.

Boyama çözeltisi: 150 ml stok boya çözeltisi, 17,5 ml 10 M (w/v) KOH, 25 ml % 100 (w/v) TCA karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.2.13. Metalli ve kontrol ortamlarında geliştirilmiş siyanobakterilerin tiyol miktarlarının belirlenmesi

30 günlük BG11 besiortamında üreme peryodunun (Bölüm 3.1.2'de açıklandığı şekilde) ardından 200 ml, OD₆₆₄'si 2,3-2,5 yoğunlukta olan kültürler 7 gün süre ile 10 ppm Cr(VI), 10 ppm Cd(II) metallerine ve 10 ppm Cr(VI)+10 ppm Cd(II) metal karışımlarına maruz bırakılmışlardır. Metallere maruz kalan ve kontrol hücrelerin tiyol miktarları Sedlak ve Lindsay (1968)' in metoduna göre toplam tiyol (TT), proteine bağlı olmayan tiyol (PBOT) ve proteine bağlı olan tiyoller (PBT) olmak üzere üç şekilde hesaplanmıştır [Sedlak ve Lindsay, 1968]. 7. güne kadar her gün 1 ml örnek alınarak 10 000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Besi ortamından ayrılan hücreler 1ml 0,1 N HCl ile karıştırılarak buz kabı içerisinde 3 dak 50 MHz ultrasonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. 10 000 rpm'de +4 °C'de 15 dak santrifüj edilen örneklerin sıvı faz kısmı kullanılmıştır.

Toplam tiyollerin belirlenmesinde; 50 µl sıvı faz, 150 µl 0,2 M Tris (pH 8,2) ve 10 µl 0,01 M 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) karıştırılarak üzerine 1 ml metanol eklenmiştir. 15 dak oda sıcaklığında bekleyen karışım 412 nm'de kontrole (örnek ihtiva etmeyen karışım) karşı spektrofotometrede okunmuştur. OD_{412} değerleri standartta göre µmol/ml olarak hesaplanmıştır.

Proteine bağlı olmayan tiyollerin belirlenmesinde; 500 µl sıvı faz 400 µl duble distille su ve 100 µl % 50'lik TCA ile karıştırılmıştır. Karışım oda sıcaklığında 12 dak çalkalanmış ve 5 000 rpm'de 15 dak santrifüj edilmiştir. 200 µl sıvı faz, 400 µl 0,4 M Tris (pH 8,9) ve 10 µl 0,01 M DTNB karıştırılarak 412 nm'de spektrofotometrik olarak okunmuştur. Proteine bağlı tiyollerin miktarı toplam tiyollerden proteine bağlı olmayan tiyollerin çıkarılması ile elde edilmiş ve hesaplamalar aşağıdaki denkleme göre yapılmıştır. Deneyler 3 paralelli gerçekleştirilmiştir.

$$TT = PBOT - PBT$$

0,1-5 µmol/ml glutatyon konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltilerde 412 nm dalga boyunda yapılan okumalar sonucu çıkarılan kalibrasyon grafiğinden tiyol miktarları hesaplanmıştır. Deneyler 3 paralelli gerçekleştirilmiştir.

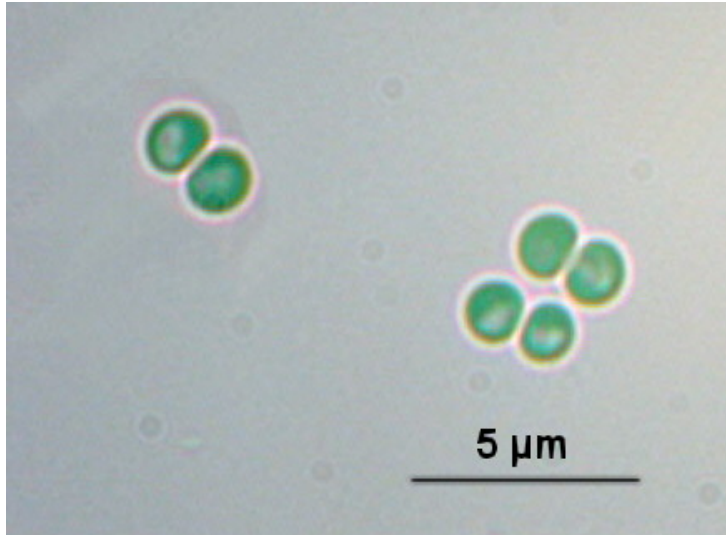
Bu çalışmada TT, PBOT ve PBT' lerin yanı sıra aynı örneklerin klorofil-a ve protein miktarları da Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. İzolatların Tanımlama Sonuçları

Mogan Gölü, Kurtboğazı Barajı, Uncalı Deresi, Bafa Gölü, Hatim Çayı, Harikalar Diyarı Göleti ve Kızılırmak Nehri gibi tatlı su kaynaklarına ait örneklerden siyanobakter izolasyonu iki şekilde gerçekleştirilmiştir. Genelde saflaştırma yoğun halde üreyen karışık kültürden pastör pipeti ile tek hücre alınıp yeni bir besiortamına aktararak, bazen de BG11 agar plaklarında oluşan tek koloninin yeni bir besiortamına aktarılması ile yapılmıştır. İzolasyonlar sonucunda toplam 50 adet saf izolat alınmış ve bunlar içerisinde morfolojik yapılarına ve bölünme fizyolojilerine göre yapılan incelemelede 15 adet siyanobakter izolatı tespit edilmiştir. İzolatların tanımlamaları morfolojik yapılarına, bölünme fizyolojilerine ve 16S rRNA'larına göre yapılmıştır.

Bu çalışmada tatlısularda çok yoğun bulunması, kolay izole edilebilir olması, daha hızlı üretilmesi ve uygulama kolaylığı nedeniyle tek hücreli siyanobakterilerin kullanılması tercih edilmiştir. Bu nedenle su örneklerinden ipliksi formdaki siyanobakterilerin izolasyonları yapılmayıp sadece tek hücreli formlara sahip siyanobakterilerin izolasyonları yapılmıştır. İzolatların morfolojik tanımlanmaları Rippka ve ark. (1979) ile Bone ve ark. (2001)'e göre, bölünme fizyolojileri ve morfolojik karakterlerine göre yapılmıştır. Resim 4.1'de *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının mikroskop görüntüsü verilmiştir. Tanımlanan izolatların kodları, cins adları ve izole edildiği su kaynakları Çizelge 4.1'de verilmiştir.



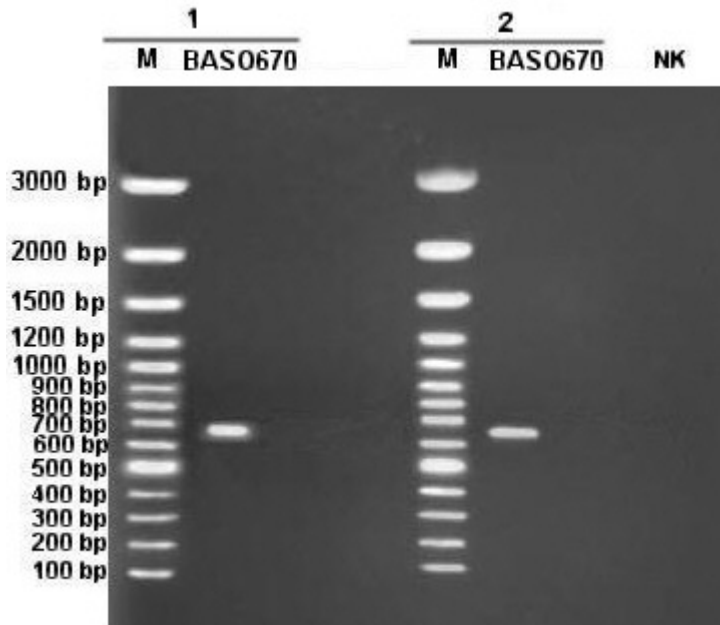
Resim 4.1. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının 100X10X4 büyütmede ışık mikroskobu görüntüsü

Çizelge 4.1. İzolatların izole edildiği tatlı su kaynakları ve cins adları

İzolat Kodları*	Cins Adları	Kaynak
BASO444	<i>Synechocystis</i> sp.	Mogan Gölü, Ankara
BASO500	<i>Synechocystis</i> sp.	Kurtbogazı Barajı, Ankara
BASO501	<i>Synechocystis</i> sp.	Uncalı Deresi, Antalya
BASO502	<i>Synechocystis</i> sp.	Kurtbogazı Barajı, Ankara
BASO503	<i>Synechocystis</i> sp.	Kurtbogazı Barajı, Ankara
BASO504	<i>Synechocystis</i> sp.	Uncalı Deresi, Antalya
BASO506	<i>Synechocystis</i> sp.	Hatim Çayı, Ankara
BASO507	<i>Synechocystis</i> sp.	Bafa Gölü, Aydın
BASO508	<i>Synechocystis</i> sp.	Harikalar Diyarı Göleti, Ankara
BASO509	<i>Synechocystis</i> sp.	Kızılırmak Nehri, Kırıkkale
BASO510	<i>Synechocystis</i> sp.	Uncalı Deresi, Antalya
BASO511	<i>Synechocystis</i> sp.	Uncalı Deresi, Antalya
BASO670	<i>Synechocystis</i> sp.	Mogan Gölü, Ankara
BASO671	<i>Synechocystis</i> sp.	Uncalı Deresi, Antalya
BASO672	<i>Synechocystis</i> sp.	Bafa Gölü, Aydın

*İzolat kodları Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonuna göre verilmiştir.

BASO670 izolatın DNA'sı izole edildikten sonra 16S rRNA sekansları için CYA-106F, CYA-781R ve BA-CF, BA-CR primerleri kullanılmıştır. CYA-106F ve CYA-781R primerleri ile 640 bp, BA-CF ve BA-CR primerleri ile ise 629 bp'lik bir alan çoğaltılmıştır (Resim 4.2). Çoğaltılan iki alan birleştirilerek 16S rDNA'yı da kapsayan 1262 bp'lik DNA dizisi elde edilmiştir. Bu gen bölgesinin dizi analizi Çizelge 4.2'de verilmiştir. Bu bölgenin DNA'sı, NCBI Gen Bankası'nda var olan diğer bakteriyal 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırılarak benzerlik oranları belirlenmiştir.



Resim 4.2. Her iki primerle çoğaltılan PCR ürünü DNA'ların % 1'lik agaroz jel görüntüleri. M: (100 bp DNA ladder plus) DNA marker, NK: Negatif kontrol, 1: CYA-106F ve CYA-781R primerleri ile çoğaltılan DNA'lar, 2: BA-CF ve BA-CR primerleri ile çoğaltılan DNA'lar.

İki farklı primer ile PCR'ı yapılan iki farklı DNA bölgesinin sonuçlarının birleştirilmesi ile elde edilen 1262 bp'lik baz dizisi tanımlanma açısından hassasiyeti arttırmıştır. Birleştirilen sekanslara göre *Synechocystis* sp. BASO670 izolatına ait çoğaltılan gen bölgesinin baz sırası Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının her iki primerin birleşmesi ile oluşan gen bölgesinin dizi analizi (1262 bp)

1	ctactacctt	caggatgggg	acaacagttg	gaaacgactg	ctaataccca	atgtgccgaa
61	aggtgaaaga	tttatcgctc	tgaagatggg	ctcgcgctctg	attagctaga	tggtggggta
121	agagcctacc	atggcaacga	tcagtagctg	gtctgagagg	atgagcagcc	acactgggac
181	tgagacacgg	cccagactcc	tacgggaggg	agcagtgggg	aattttccgc	aatgggcgaa
241	agcctgacgg	agcaataaccg	cgtgagggag	gaaggtcctt	ggattgtaaa	cctcttttat
301	caggaagaa	gttctgacgg	tacctgatga	ataagcatcg	gctaactccg	tgccagcagc
361	cgcggaata	cggaggatgc	aagcgttatc	cggaattatt	gggcgtaaag	cgtccgtagg
421	tggttatgca	agtctgccgt	taaagaatgg	agcttaactc	cataggagcg	gtggaaactg
481	caagactaga	gtacagtagg	ggtagcagga	attcccagtg	tagcggtgaa	atgcgtagat
541	attgggaaga	acatcggtgg	cgaagcgtg	ctactgggct	gaaactgaca	ctgagggacg
601	aaagctaggg	tagcgaaagg	gattagaata	caccctgtgt	agtcatagcc	gtaaacgatg
661	gatactaggc	gtggcttgta	tcgacccgag	ccgtgccgaa	gctaacgcgt	taagtatccc
721	gcctggggag	tacgcacgca	gggtgtgaaac	tcaaaggaat	tgacgggggc	ccgcacaagc
781	ggtggagtat	gtggtttaat	tcgatgcaac	gcgaagaacc	ttaccaaggc	ttgacatccc
841	tggaaatcctg	cggaaacgtg	ggagtgcctt	atggagccag	gagacaggtg	gtgcattggct
901	gtcgtcagct	cgtgtcgtga	gatgttgggt	taagtcccg	cacgagcgca	accctcggtg
961	ttagttgcca	tcattaagtt	gggcactcta	gagagactgc	aggtgacaaa	ccggaggaag
1021	gtggggatga	cgtcaagtca	tcattgccctt	tacgccttgg	gctacacacg	tactacaatg
1081	gtcgggacaa	cgggcagcga	gctcgcgaga	gtaagcgaat	cccatcaaac	ccagcctcac
1141	ctcagattgc	atgctgcaac	tcgcctgcat	gatggaggaa	tcgctagtaa	tcgcacgtca
1201	gaatactgca	gtgaattcat	tcccgggcct	tgtacacacg	ccccccccc	ccatgaaaag
1261	aa					

Sekans analizleri NCBI Gen Bankasında bulunan diğer siyanobakterilere ait dizi analizleri ile mukayese edilerek % homolojisi belirlenmiştir. Karşılaştırma sonucunda BASO670 izolatı *Synechocystis* sp. suşuna % 98 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.3). Çalışmada kullanılan diğer 14 izolatlarda da benzer sonuçlar elde edilmiş, bu nedenle sadece *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının sonuçları verilmiştir. Diğer izolatların da % 97-99 oranında *Synechocystis* sp. suşuna benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3. BASO670 izolatının 16S rDNA sekansının NCBI Gen Bankası sonuçlarına göre % benzerlikleri

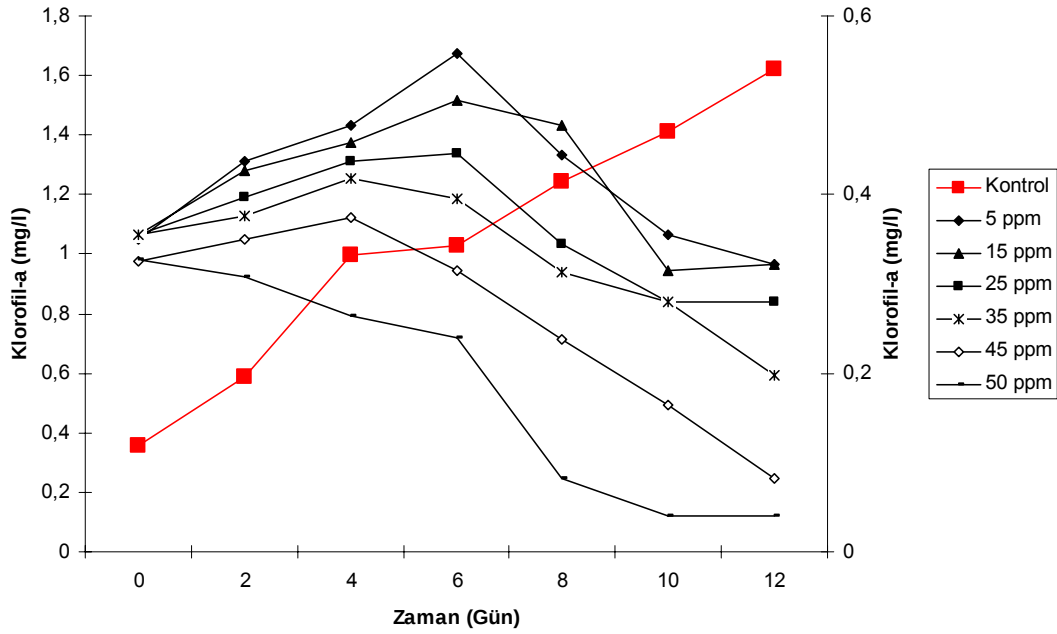
EMBL/GenBank no	Siyanobakter türleri	% Homoloji
BA000022.2	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	% 98
AB041938.1	<i>Synechocystis</i> PCC6805	% 98
AB041937.1	<i>Synechocystis</i> PCC6714	% 98
AB041936.1	<i>Synechocystis</i> PCC6702	% 98
AY224195.1	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	% 98
X94705.1	<i>M. glauca</i> B1448-1	% 96
AJ781043.1	<i>Woronichinia naegeliana</i> OLE35S01	% 93
AJ781044.1	<i>Merismopedia glauca</i> OBB39S01	% 93
AB275352.1	Tanımlanmamış siyanobakter Ni 3-C1	% 92
AJ639890.1	<i>Spirulina major</i> OBB36S18	% 92
AJ635436.1	<i>Spirulina major</i> OBB22S09	% 92
AM259270.1	<i>Microcystis</i> sp. 1tu31s06	% 91
AF139318.1	<i>Microcystis aeruginosa</i> UWOC M4	% 91

4.2. İzolatların Canlılığına ve Gelişimine Cr(VI) ve Cd(II)'nin Etkisi

Hücre yoğunlukları eşit olan ($OD_{664}=1,8$) toplam 15 adet siyanobakter izolatı 12 gün boyunca 5–50 ppm arası dozlarda Cr(VI) ve Cd(II) ağır metallerine maruz bırakılmıştır. Yapılan denemelerde 12 gün boyunca Cr(VI) ve Cd(II) için 48 saat aralıklarda numune alınıp klorofil-a miktarları ölçülmüştür. Elde edilen verilere göre Cr(VI) ve Cd(II)'ye maruz kalan hücrelerde kontrol grubuna göre canlılıklarında azalma gözlenmiştir. Bu sonuçlardan aynı zamanda probit analizi ile EC_{50} değerleri hesaplanarak izolatların canlılıklarını etkileyen metal konsantrasyonları belirlenmiştir. EC_{50} değeri, siyanobakter izolatlarının altıncı günde % 50'sini öldüren metal konsantrasyonu olarak hesaplanmıştır.

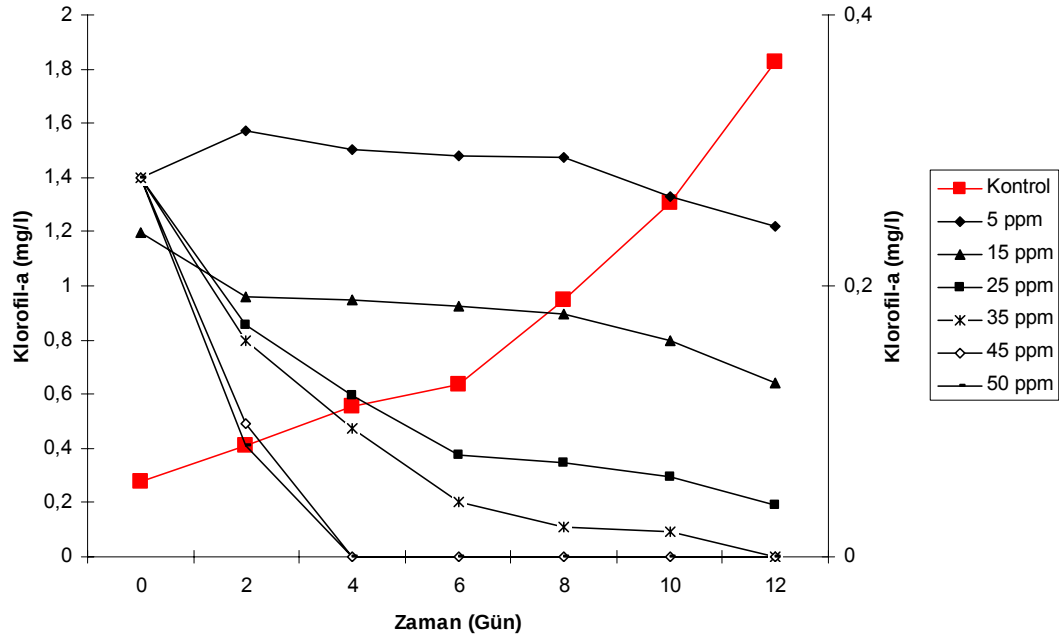
4.2.1. İzolatların canlılığına Cr(VI)'nin etkisi

15 izolatın Cr(VI) ortamında 12 gün boyunca gelişimi ve canlılığı klorofil-a miktarları ile tespit edilmiştir (Şekil 4.1-4.15). Tüm izolatların kontrole göre metalli ortamdaki kültürlerinin canlılığının ve gelişiminin önemli oranda etkilendiği tespit edilmiştir. Tüm izolatların kontrol kültürlerinde 12 gün boyunca canlılıklarında artış gözlenirken, kontrole göre metal ortamındaki kültürlerin canlılığında bir artış olmamıştır. Bu etkinin artan metal konsantrasyonuna göre arttığı dikkat çekmiştir. İzolatlar içinde yapılan değerlendirmede denenen tüm Cr(VI) konsantrasyonlarında, *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının diğer izolatlara göre Cr(VI)'ya biraz daha dayanıklılık gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.1). Ayrıca 50 ppm Cr(VI) konsantrasyonunda *Synechocystis* sp. BASO670 izolatı hariç diğer hiçbir izolatın 12. güne kadar canlılığını korumadığı dikkati çekmiştir. Diğer izolatlarda tüm metal konsantrasyonlarında 0. günden itibaren canlılıkta azalma gözlenirken *Synechocystis* sp. BASO670 izolatında, 5, 15, 25, 35 ve 45 ppm Cr(VI) konsantrasyonlarında az da olsa biyokütlede 0. güne göre bir artış olduğu belirlenmiştir.

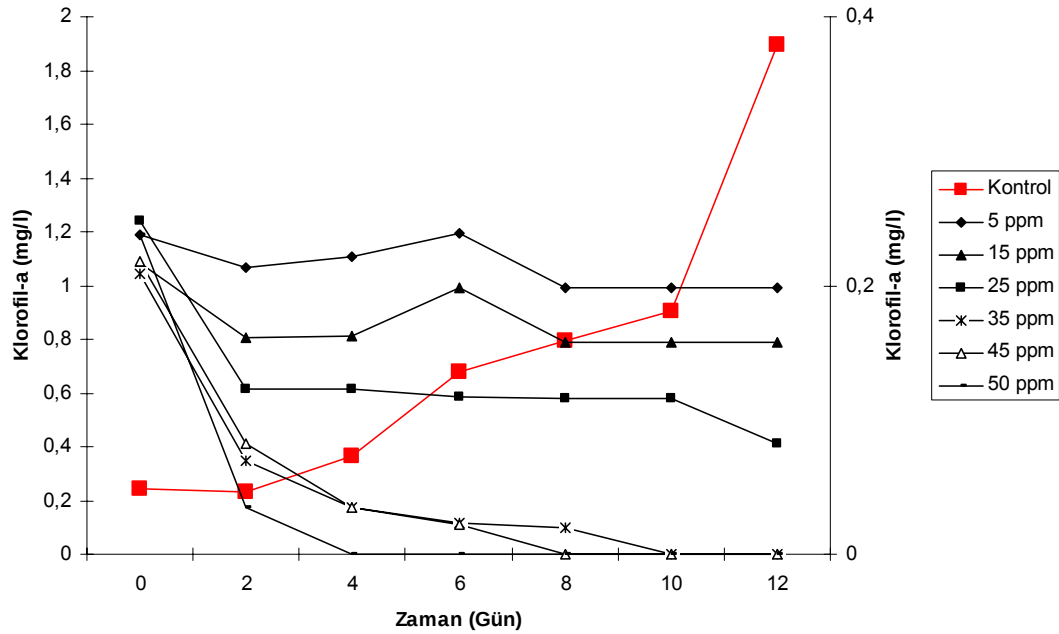


Şekil 4.1. *Synechocystis* sp. BASO670'in 12 gün boyunca canlılığına Cr(VI)'nın etkisi (sol Y eksenini kontrol, sağ Y eksenini metale maruz kalan hücreler)

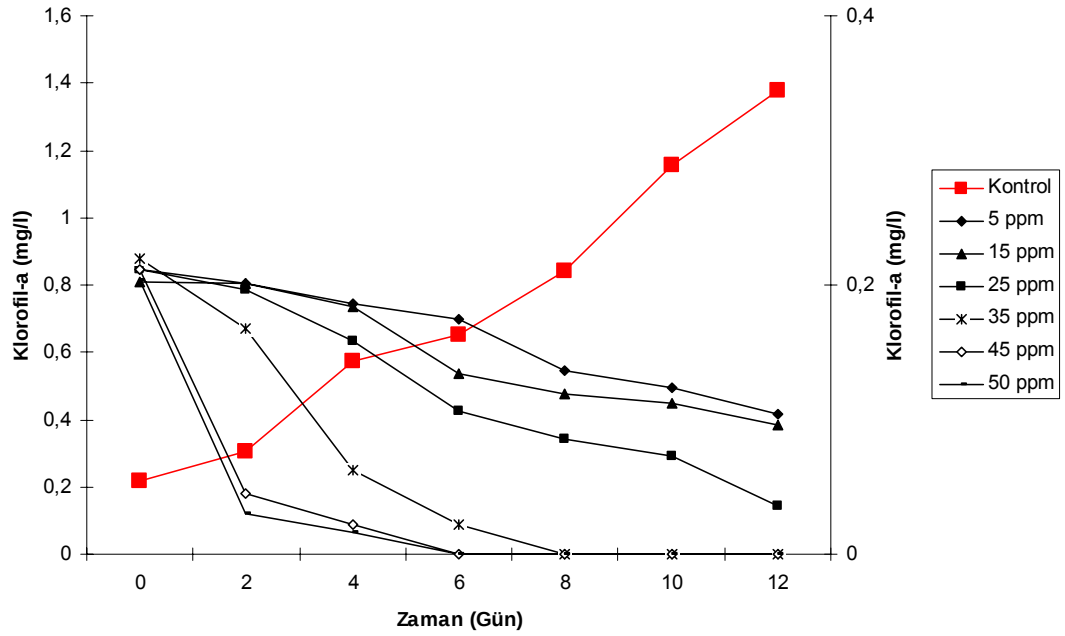
Diğer izolatlarda ise Cr(VI) konsantrasyonlarının canlılıklarında farklılıklar göstermiştir. *Synechocystis* sp. BASO506, BASO509 ve BASO672 izolatları 2. günden itibaren 50 ppm Cr(VI) konsantrasyonunda canlılığını kaybederken, *Synechocystis* sp. BASO444 ve BASO500 izolatları 4.gün, *Synechocystis* sp. BASO501, BASO502 ve BASO503 izolatları 6.gün, *Synechocystis* sp. BASO504, BASO507, BASO508, BASO511 ve BASO671 izolatları 8.gün, *Synechocystis* sp. BASO510 izolatı ise 12. günden itibaren canlılığını tamamen kaybetmiştir. *Synechocystis* sp. BASO506 izolatı 50 ve 45 ppm Cr(VI) konsantrasyonlarında 2. günden itibaren, 35 ppm Cr(VI) konsantrasyonunda 4. günden itibaren, 25 ppm Cr(VI) konsantrasyonunda ise 6. günden itibaren canlılığını kaybetmiştir. Bu nedenle bütün izolatlar içerisinde Cr(VI)'dan en çok etkilenen izolatın *Synechocystis* sp. BASO506 olduğu görülmüştür.



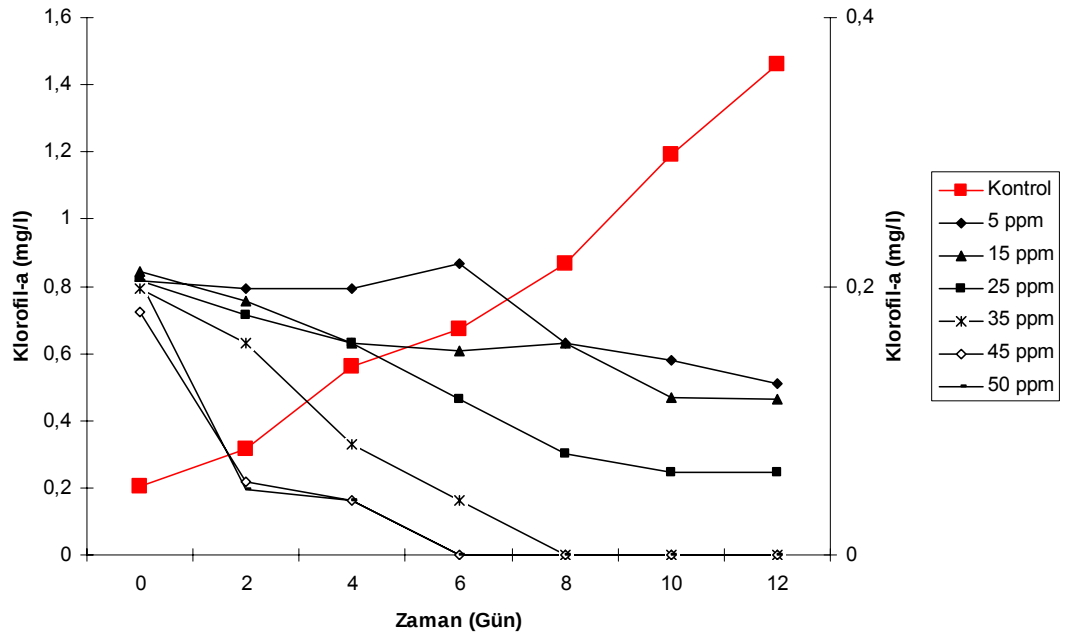
Şekil 4.2. *Synechocystis* sp. BASO444'ün 12 gün boyunca canlılığına Cr(VI)'nın etkisi (sol Y eksenini kontrol, sağ Y eksenini metale maruz kalan hücreler)



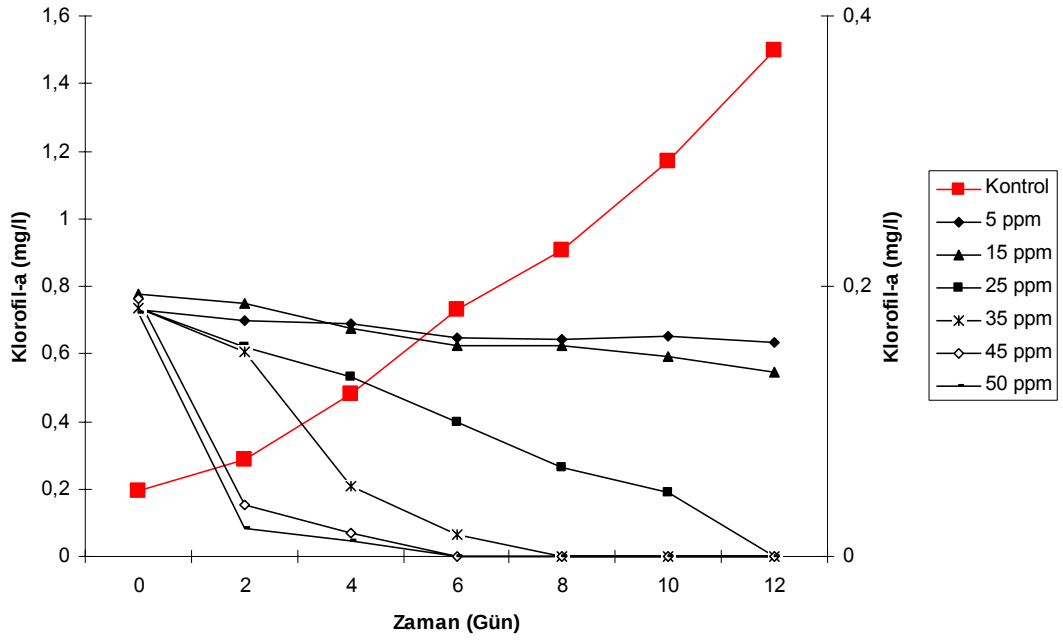
Şekil 4.3. *Synechocystis* sp. BASO500'ün 12 gün boyunca canlılığına Cr(VI)'nın etkisi (sol Y eksenini kontrol, sağ Y eksenini metale maruz kalan hücreler)



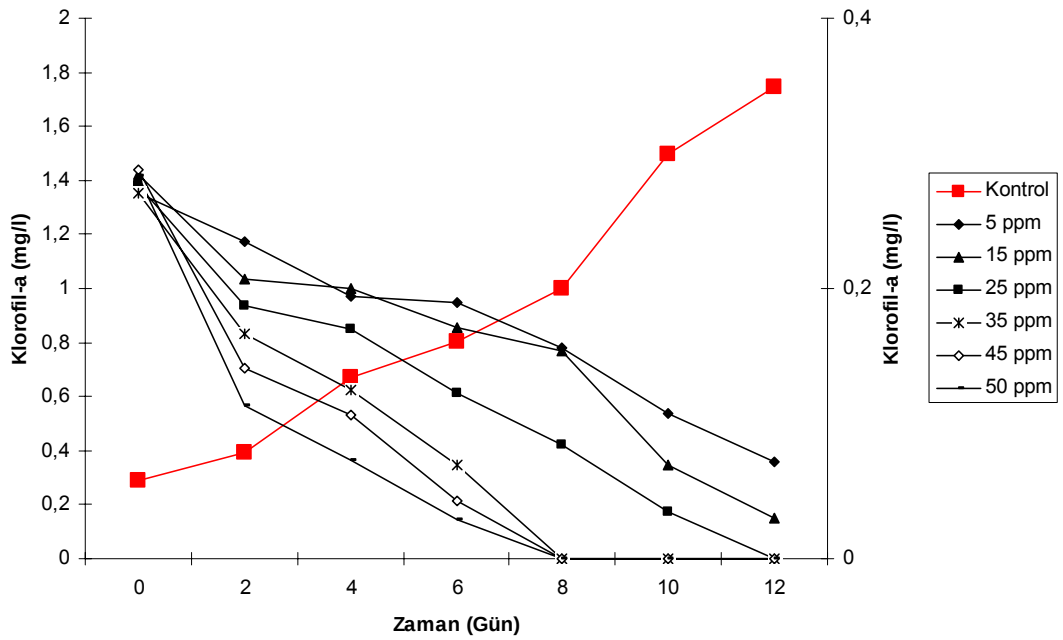
Şekil 4.4. *Synechocystis* sp. BASO501'in 12 gün boyunca canlılığına Cr(VI)'nın etkisi (sol Y eksenini kontrol, sağ Y eksenini metale maruz kalan hücreler)



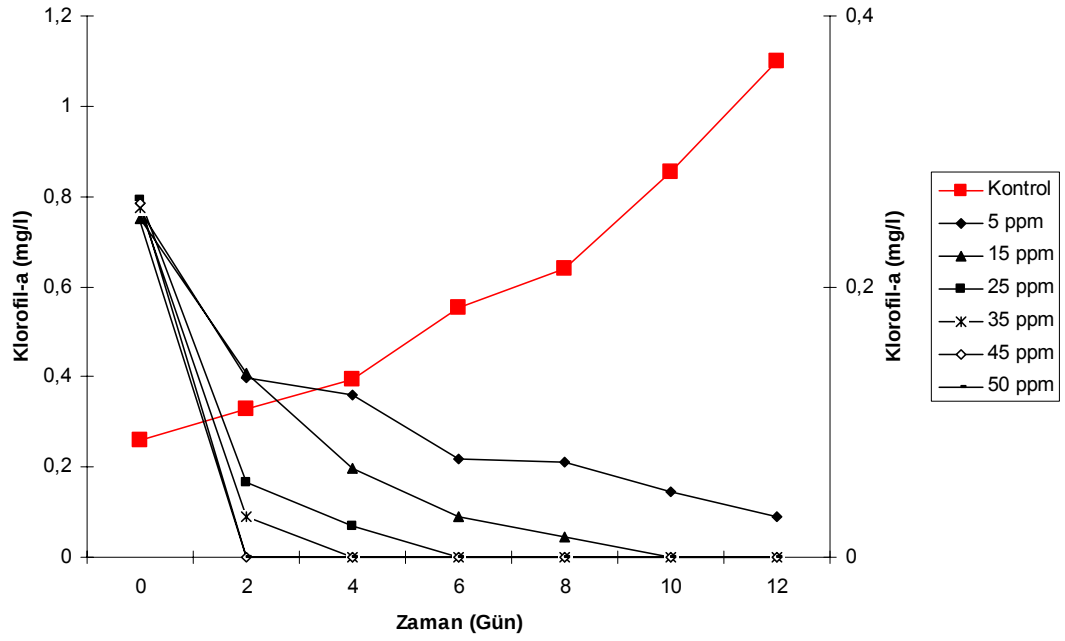
Şekil 4.5. *Synechocystis* sp. BASO502'nin 12 gün boyunca canlılığına Cr(VI)'nın etkisi (sol Y eksenini kontrol, sağ Y eksenini metale maruz kalan hücreler)



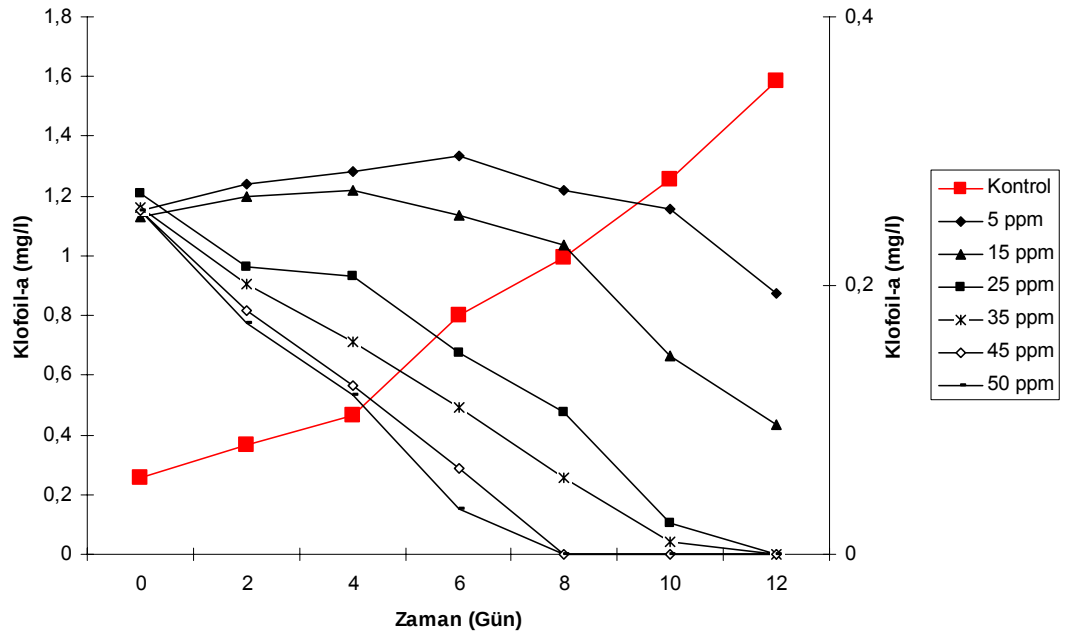
Şekil 4.6. *Synechocystis* sp. BASO503'ün 12 gün boyunca canlılığına Cr(VI)'nın etkisi (sol Y eksenı kontrol, sağ Y eksenı metale maruz kalan hücreler)



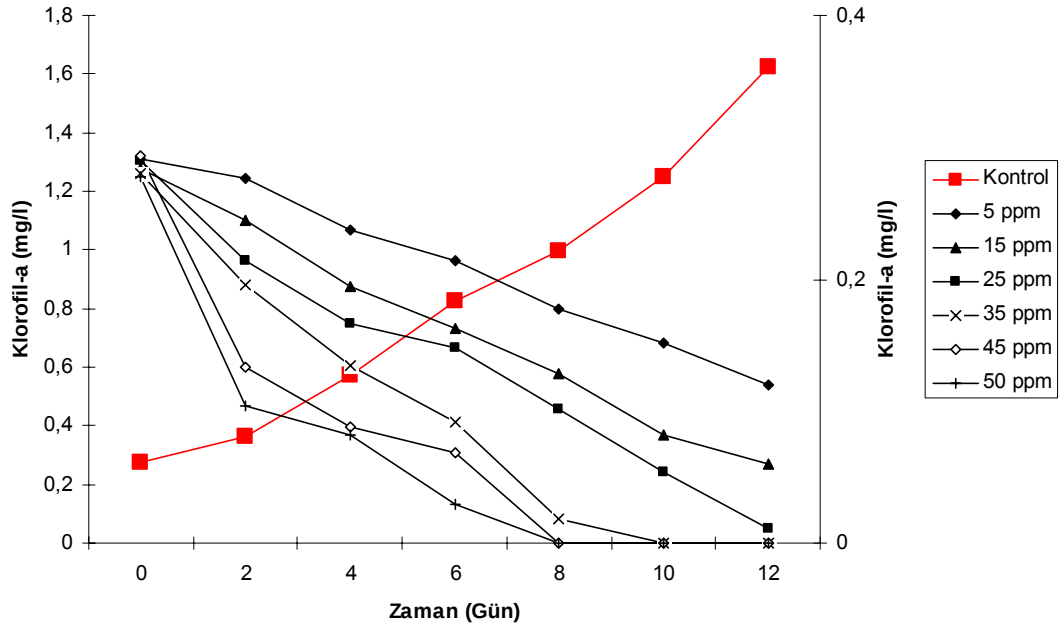
Şekil 4.7. *Synechocystis* sp. BASO504'ün 12 gün boyunca canlılığına Cr(VI)'nın etkisi (sol Y eksenı kontrol, sağ Y eksenı metale maruz kalan hücreler)



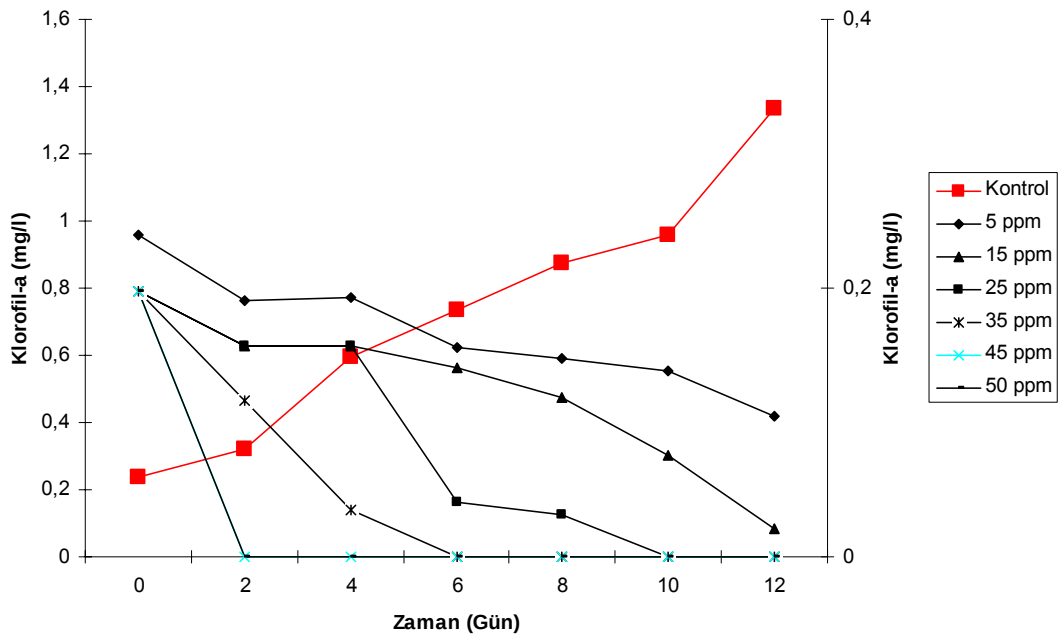
Şekil 4.8. *Synechocystis* sp. BASO506'nın 12 gün boyunca canlılığına Cr(VI)'nın etkisi (sol Y eksenini kontrol, sağ Y eksenini metale maruz kalan hücreler)



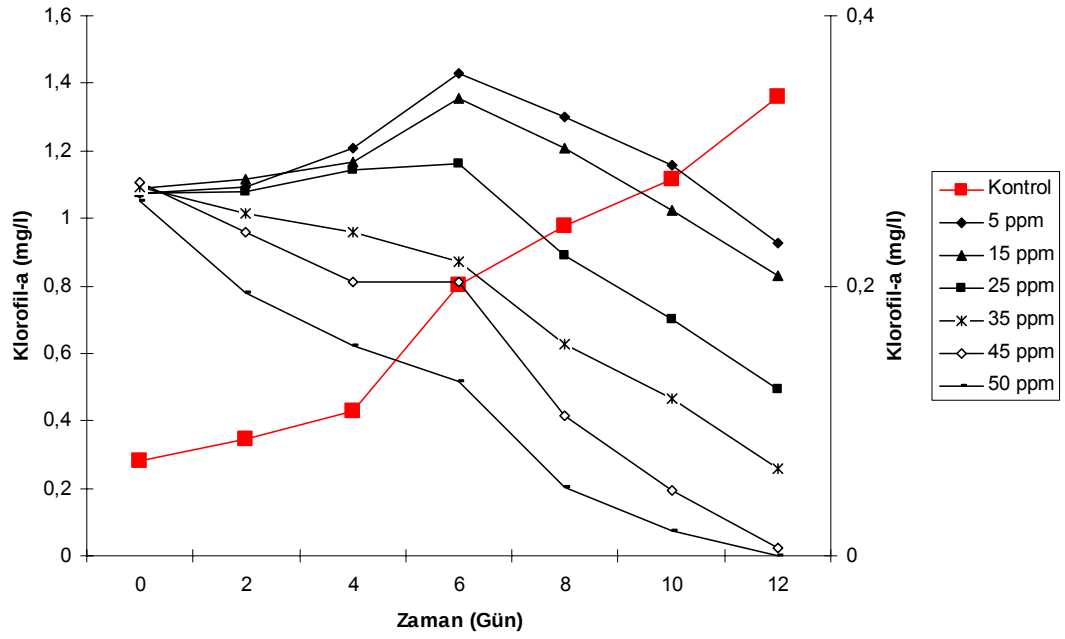
Şekil 4.9. *Synechocystis* sp. BASO507'nin 12 gün boyunca canlılığına Cr(VI)'nın etkisi (sol Y eksenini kontrol, sağ Y eksenini metale maruz kalan hücreler)



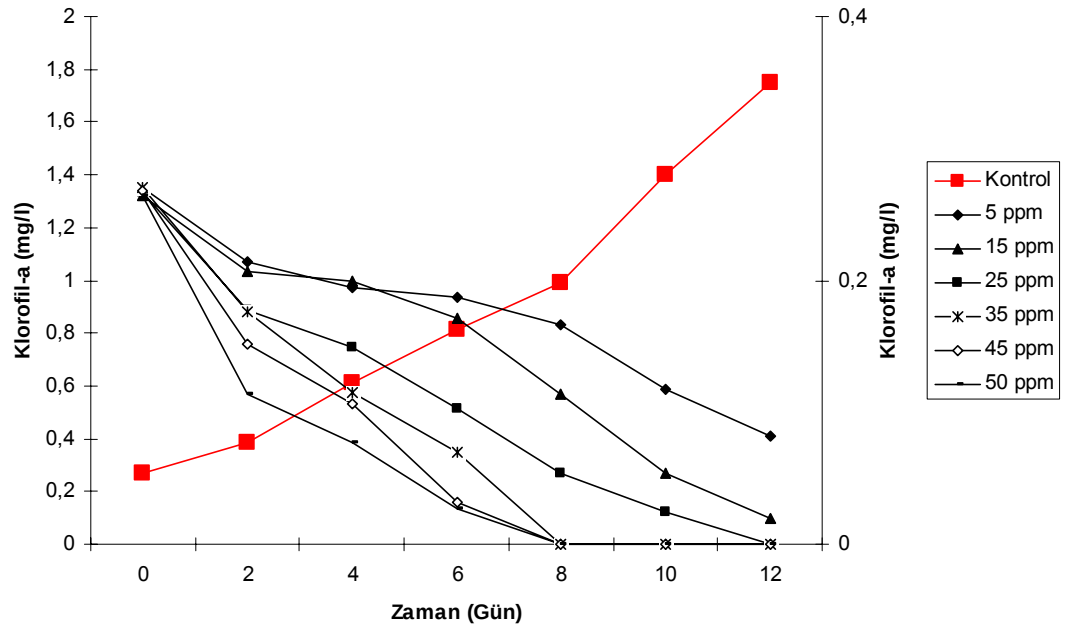
Şekil 4.10. *Synechocystis* sp. BASO508'in 12 gün boyunca canlılığına Cr(VI)'nın etkisi (sol Y eksenini kontrol, sağ Y eksenini metale maruz kalan hücreler)



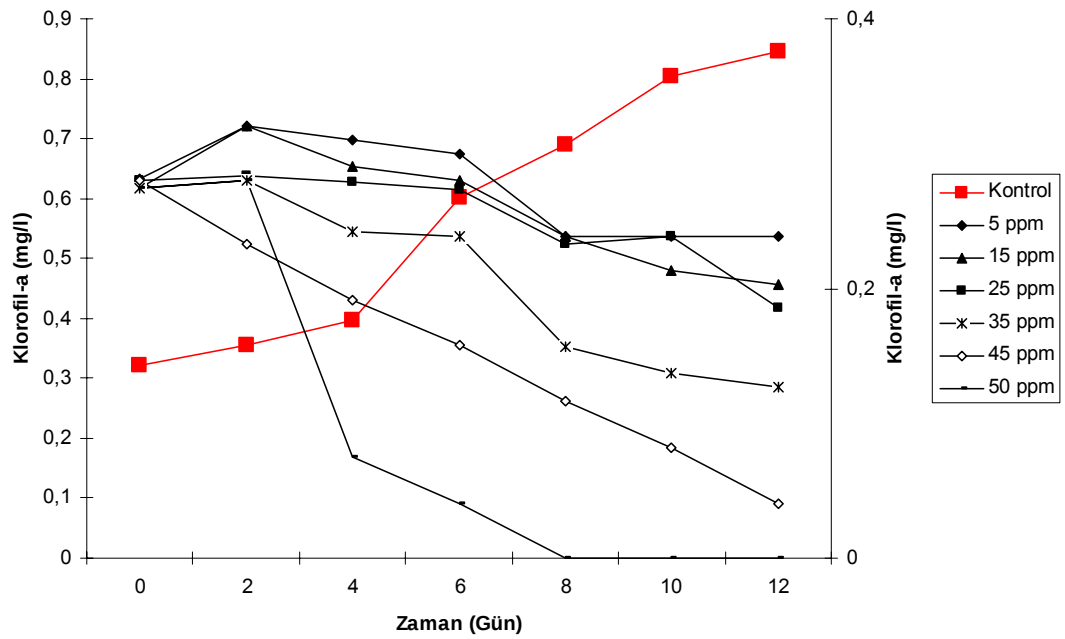
Şekil 4.11. *Synechocystis* sp. BASO509'un 12 gün boyunca canlılığına Cr(VI)'nın etkisi (sol Y eksenini kontrol, sağ Y eksenini metale maruz kalan hücreler)



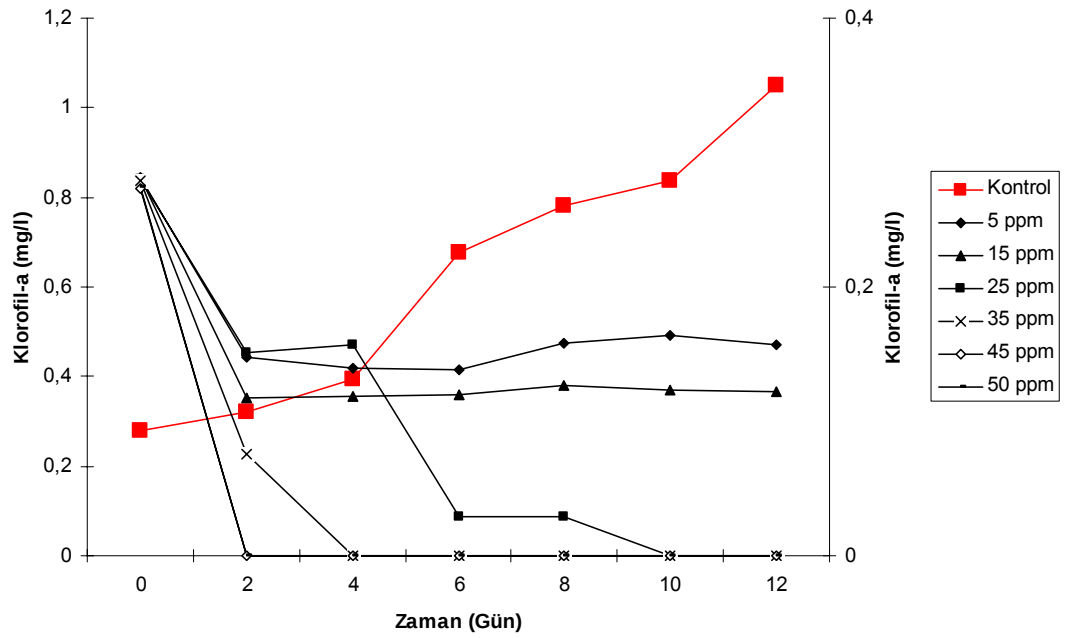
Şekil 4.12. *Synechocystis* sp. BASO510'un 12 gün boyunca canlılığına Cr(VI)'nın etkisi (sol Y eksenini kontrol, sağ Y eksenini metale maruz kalan hücreler)



Şekil 4.13. *Synechocystis* sp. BASO511'in 12 gün boyunca canlılığına Cr(VI)'nın etkisi (sol Y eksenini kontrol, sağ Y eksenini metale maruz kalan hücreler)



Şekil 4.14. *Synechocystis* sp. BASO671'in 12 gün boyunca canlılığına Cr(VI)'nın etkisi (sol Y eksenini kontrol, sağ Y eksenini metale maruz kalan hücreler)

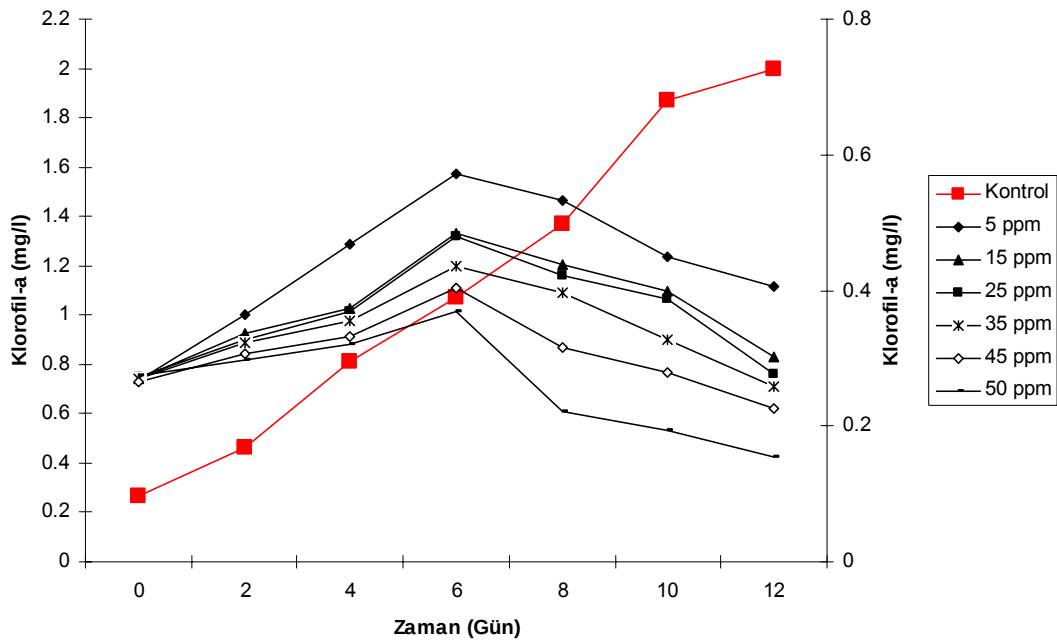


Şekil 4.15. *Synechocystis* sp. BASO672'nin 12 gün boyunca canlılığına Cr(VI)'nin etkisi (sol Y eksenini kontrol, sağ Y eksenini metale maruz kalan hücreler)

4.2.2. İzolatların canlılığına Cd(II)'nin etkisi

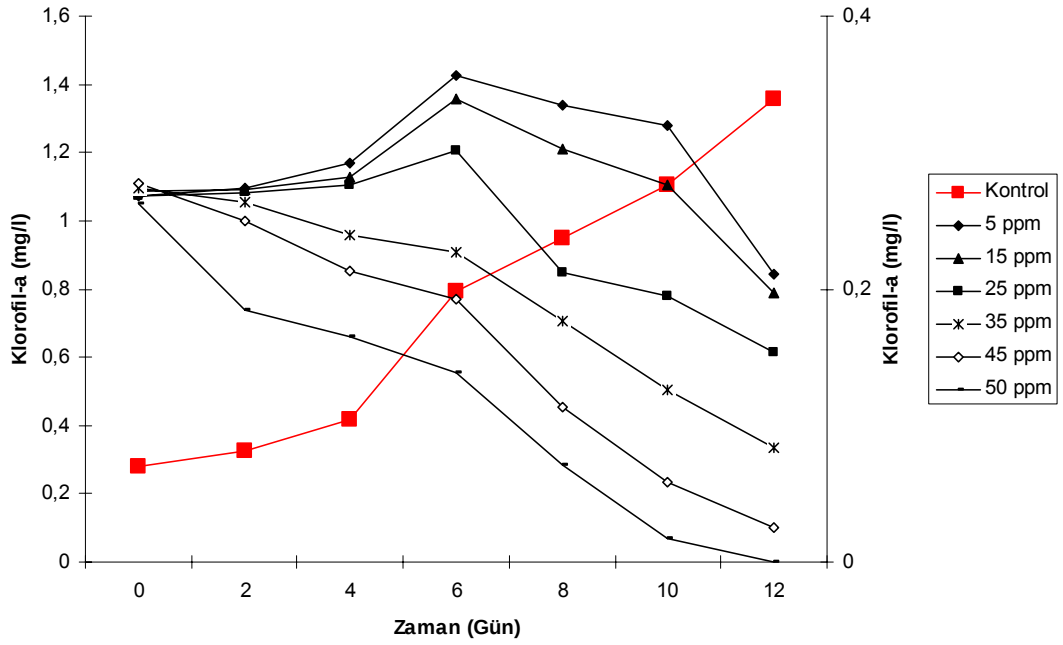
12 gün boyunca 5-50 ppm Cd(II) konsantrasyonlarına maruz kalan siyanobakter izolatlarından ve kontrol kültürlerinden her 48 saatte bir örnek alınarak canlılıkları tespit edilmiş ve 6. günde EC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

15 izolatın Cd(II) ortamında 12 gün boyunca gelişimi ve canlılığı klorofil-a miktarları ile tespit edilmiştir (Şekil 4.16-4.30). Tüm izolatların kontrole göre metalli ortamdaki kültürlerinin canlılığının ve gelişiminin önemli oranda etkilendiği tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının diğer izolatlara göre Cd(II)'ye biraz daha dayanıklılık gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.16). *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının Cd(II)'ye maruz kalan hücrelerinde kontrole göre azalma olduğu ancak, 5-50 ppm Cd(II) konsantrasyonlarına maruz kalan hücrelerin 12. gün de dahil olmak üzere canlılıklarını korudukları tespit edilmiştir. Aynı izolat Cr(VI)'ya benzer sonucu göstermiştir. İzolatının Cd(II) konsantrasyonlarına maruz kalan kültürlerinde canlılıkları, kontrole göre altıncı güne kadar az miktarda arttığı, 6. günden itibaren ise giderek azaldığı belirlenmiştir. Cd(II) konsantrasyonu arttıkça bu izolatın klorofil-a miktarında da düşüş gözlenmiştir. (Şekil 4.16).

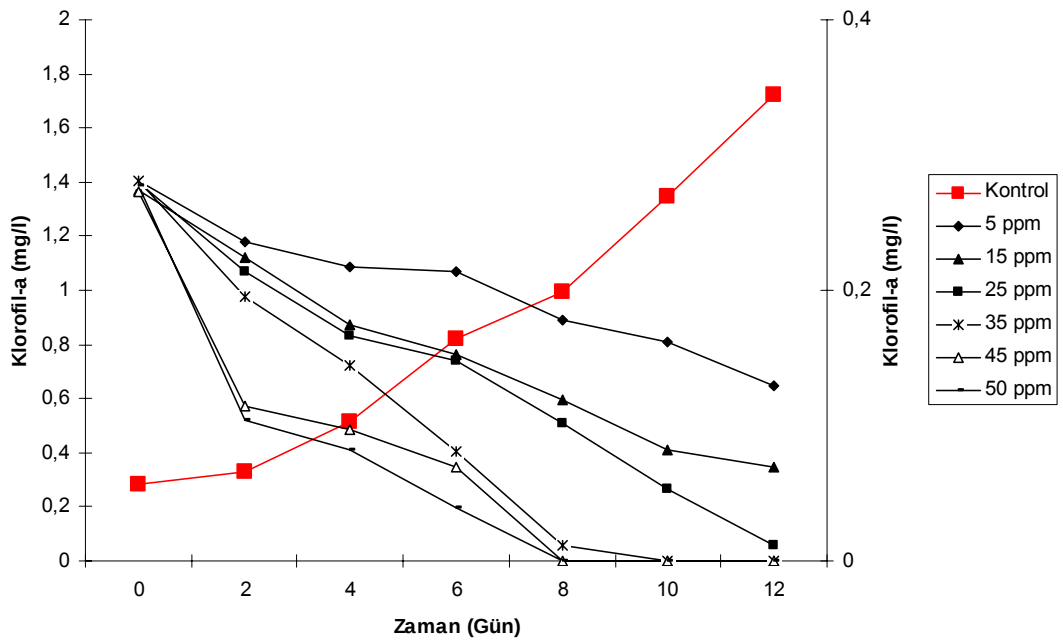


Şekil 4.16. *Synechocystis* sp. BASO670'nin 12 gün boyunca canlılığına Cd(II)'nin etkisi (sol Y eksenini kontrol, sağ Y eksenini metale maruz kalan hücreler)

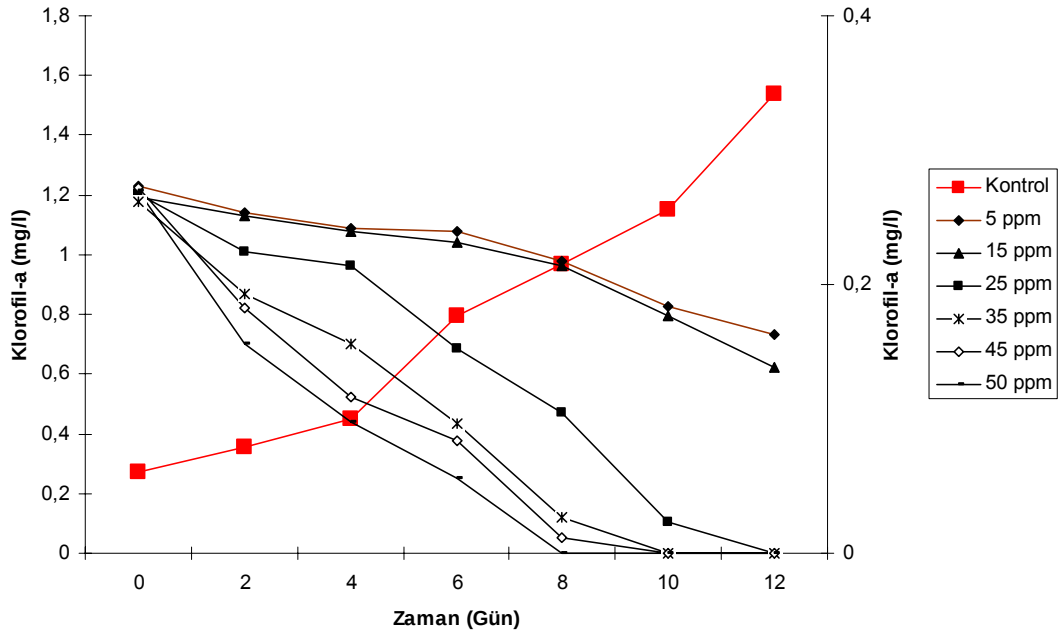
5-50 ppm Cd(II) konsantrasyonlarına maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO444, BASO500, BASO501, BASO502, BASO503, BASO504, BASO506, BASO507, BASO508, BASO509, BASO510, BASO511, BASO671, BASO672, izolatlarının kontrole göre canlılıklarının denenen metal konsantrasyonlarında ciddi bir azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.17-4.30). 50 ppm'lik Cd(II)'ye maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO444 izolatının 12. günden itibaren, *Synechocystis* sp. BASO502 ve BASO671 izolatlarının 10. günden itibaren, BASO500, BASO501, BASO504, BASO508, BASO509 ve BASO510 izolatlarının 8. günden itibaren, *Synechocystis* sp. BASO503, BASO507, BASO511 ve BASO672 izolatlarının 6. günden itibaren ve *Synechocystis* sp. BASO506 izolatının (Şekil 4.23) 2. günden itibaren canlılıklarını kaybettikleri tespit edilmiştir. *Synechocystis* sp. BASO506 izolatı 50 ve 45 ppm Cd(II) konsantrasyonlarında 2. günden itibaren, 35 ppm Cd(II) konsantrasyonunda 6. günden itibaren, 15 ve 25 ppm Cd(II) konsantrasyonunda ise 8. günden itibaren canlılığını kaybetmiştir. Bu nedenle bütün izolatlar içerisinde Cd(II)'den en çok etkilenen izolatın *Synechocystis* sp. BASO506 olduğu görülmüştür.



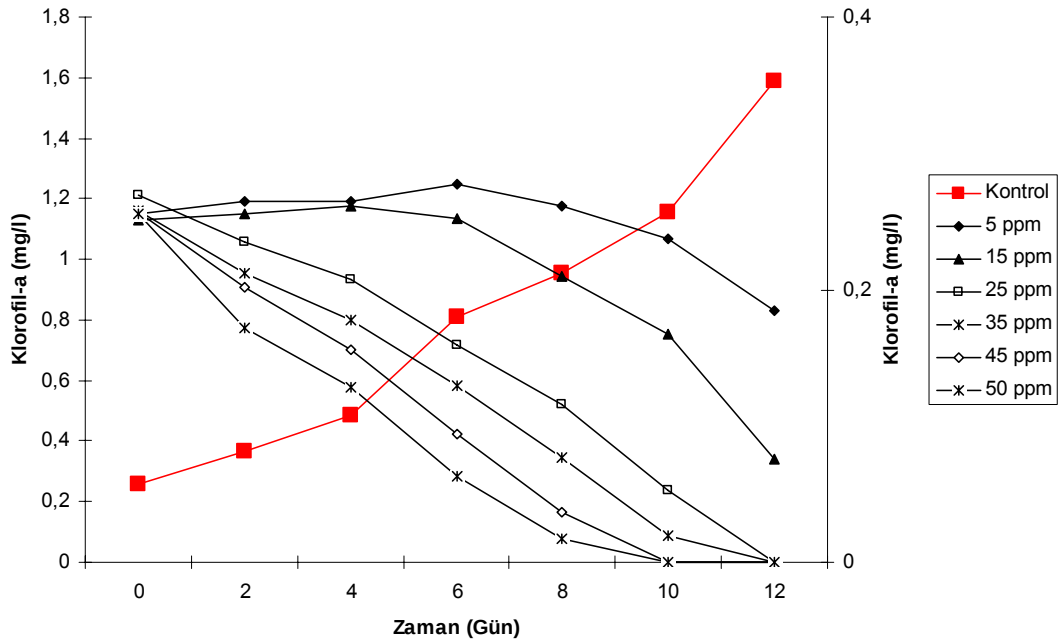
Şekil 4.17. *Synechocystis* sp. BASO444'ün 12 gün boyunca canlılığına Cd(II)'nin etkisi (sol Y eksenini kontrol, sağ Y eksenini metale maruz kalan hücreler)



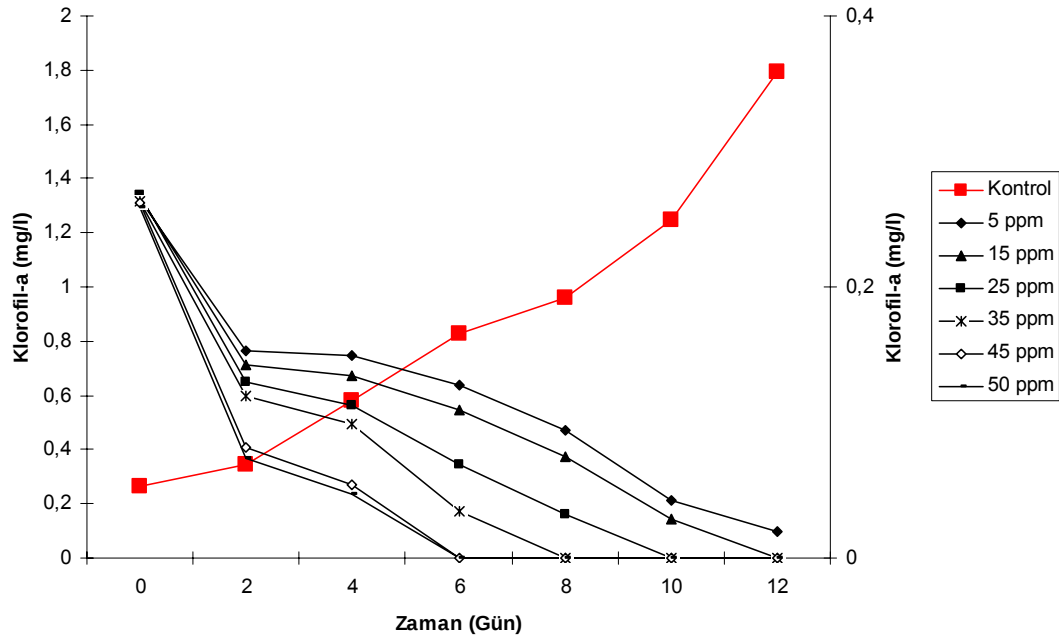
Şekil 4.18. *Synechocystis* sp. BASO500'ün 12 gün boyunca canlılığına Cd(II)'nin etkisi (sol Y eksenini kontrol, sağ Y eksenini metale maruz kalan hücreler)



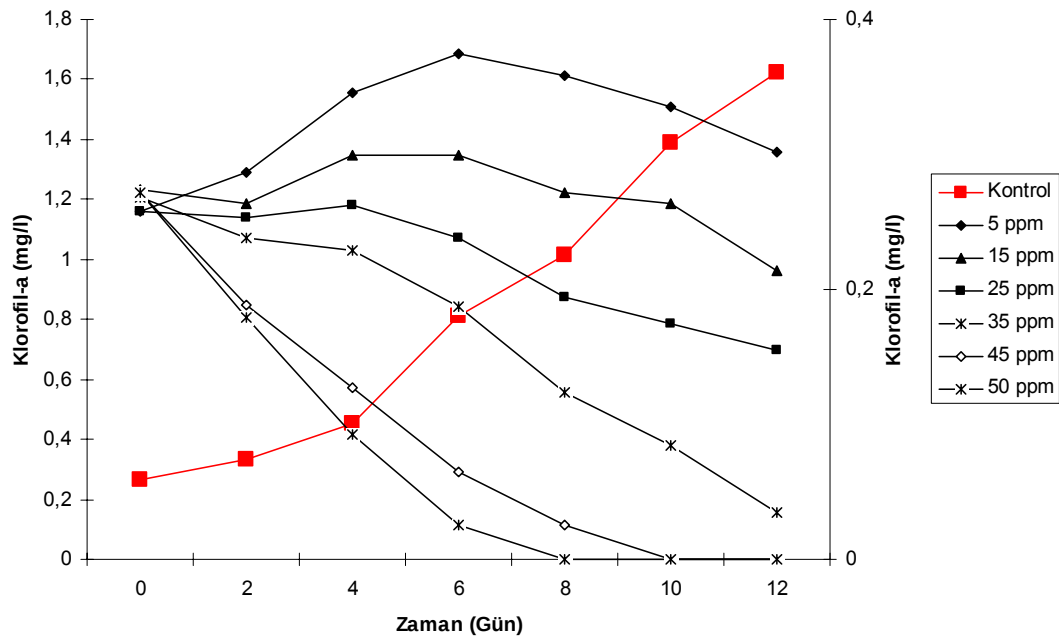
Şekil 4.19. *Synechocystis* sp. BASO501'in 12 gün boyunca canlılığına Cd(II)'nin etkisi (sol Y eksenini kontrol, sağ Y eksenini metale maruz kalan hücreler)



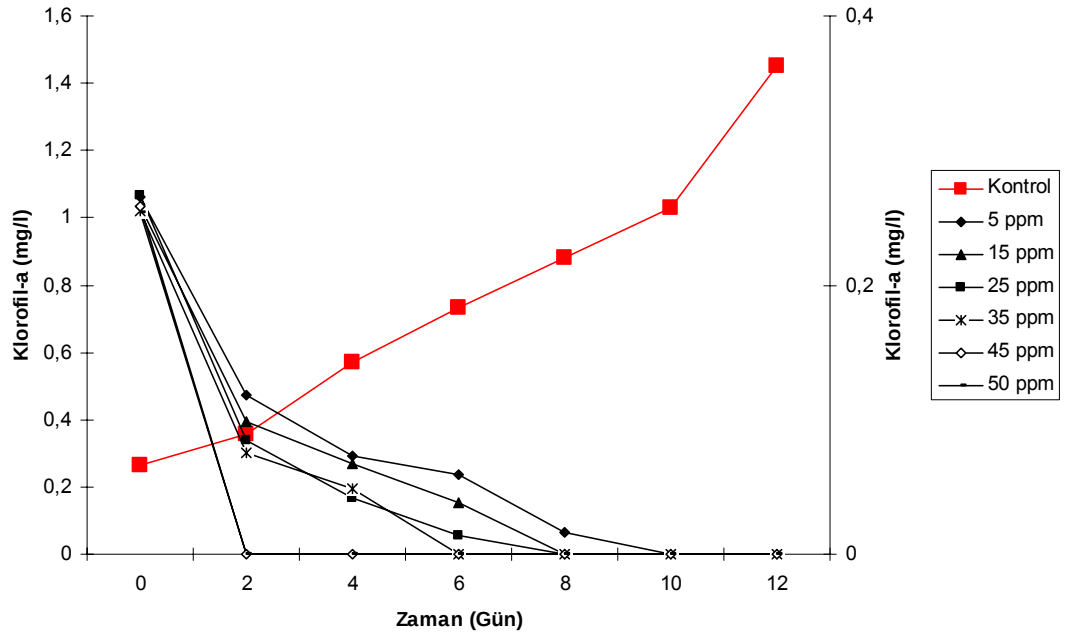
Şekil 4.20. *Synechocystis* sp. BASO502'nin 12 gün boyunca canlılığına Cd(II)'nin etkisi (sol Y eksenini kontrol, sağ Y eksenini metale maruz kalan hücreler)



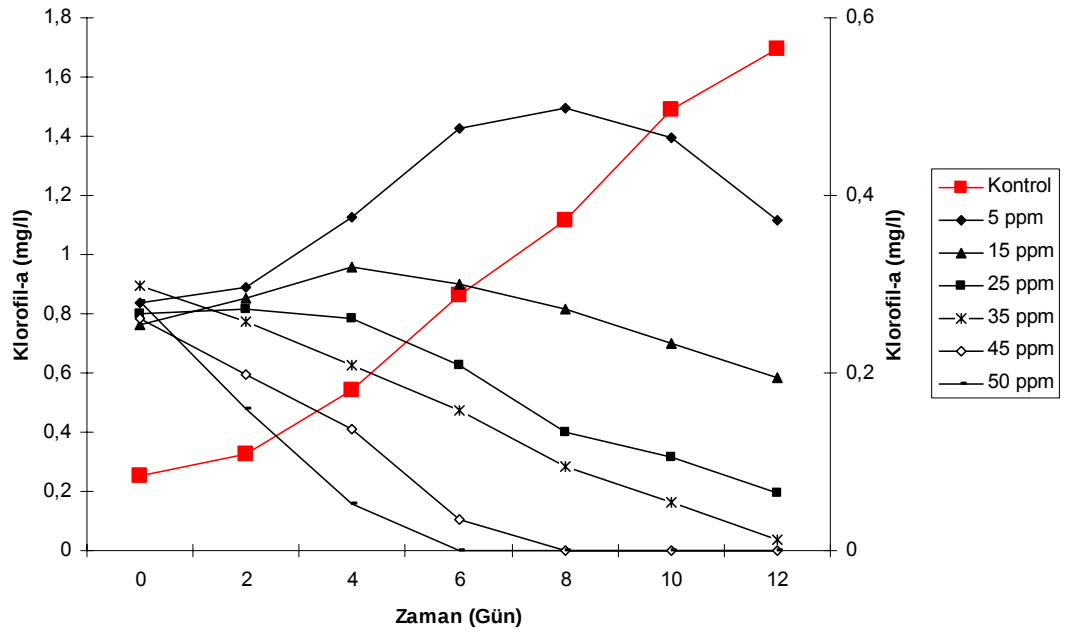
Şekil 4.21. *Synechocystis* sp. BASO503'ün 12 gün boyunca canlılığına Cd(II)'nin etkisi (sol Y eksenini kontrol, sağ Y eksenini metale maruz kalan hücreler)



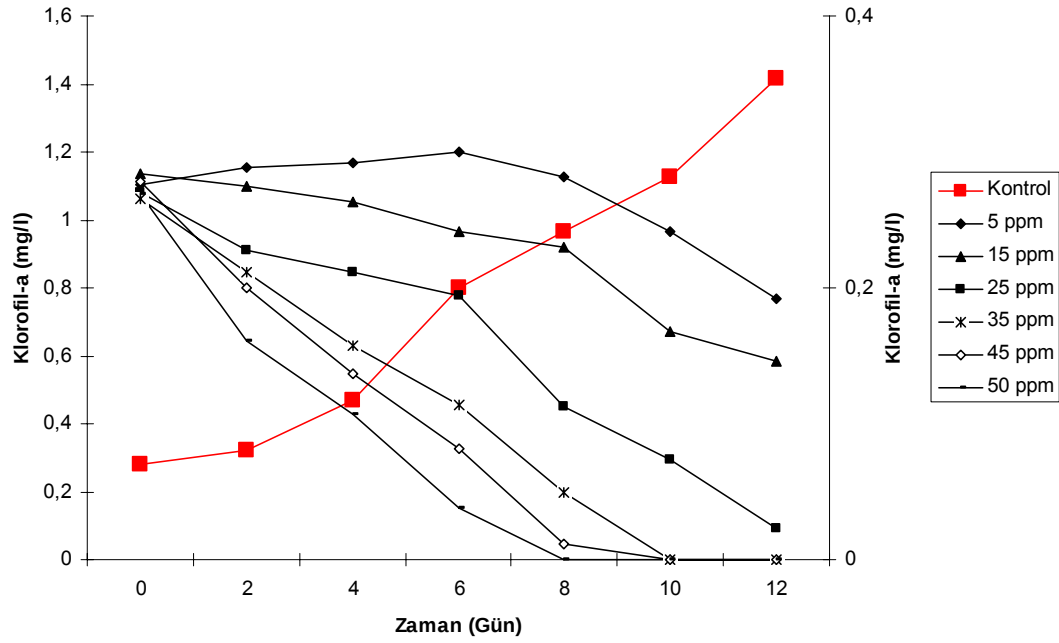
Şekil 4.22. *Synechocystis* sp. BASO504'ün 12 gün boyunca canlılığına Cd(II)'nin etkisi (sol Y eksenini kontrol, sağ Y eksenini metale maruz kalan hücreler)



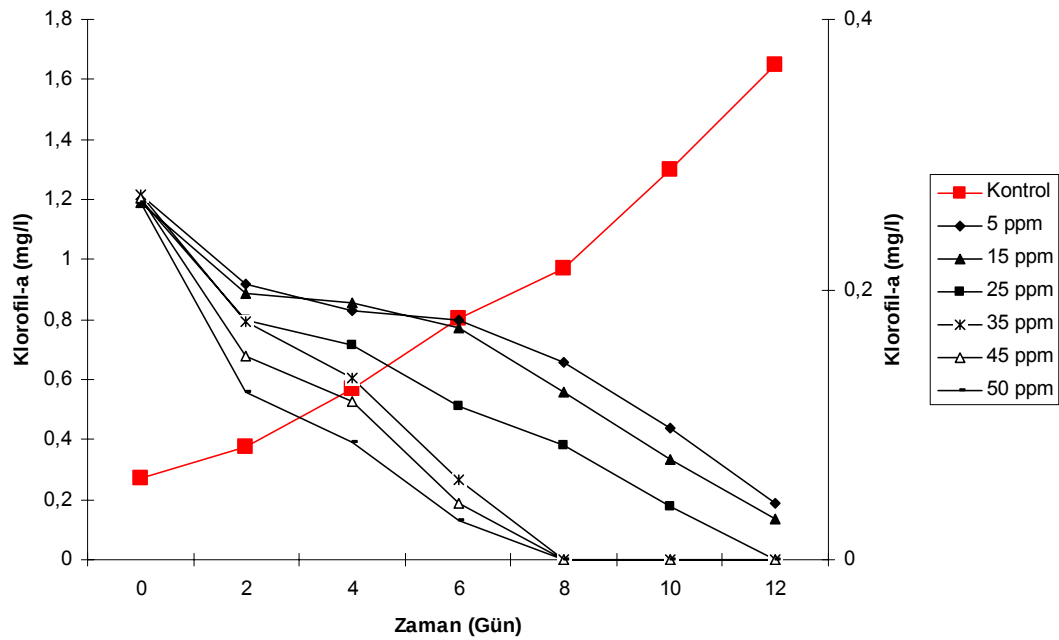
Şekil 4.23. *Synechocystis* sp. BASO506'nın 12 gün boyunca canlılığına Cd(II)'nin etkisi (sol Y eksenini kontrol, sağ Y eksenini metale maruz kalan hücreler)



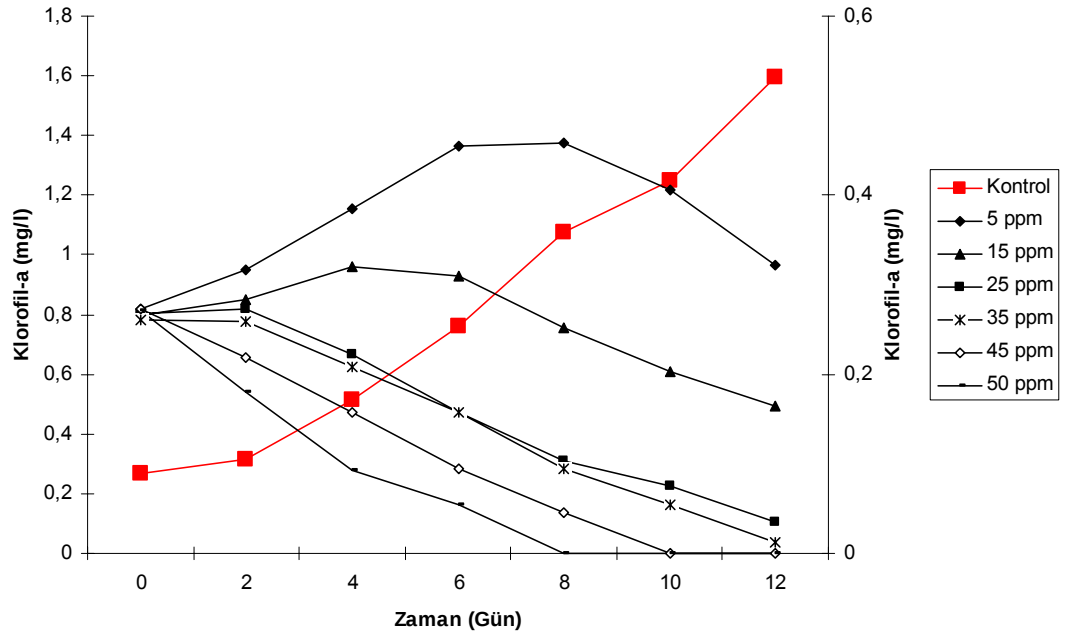
Şekil 4.24. *Synechocystis* sp. BASO507'nin 12 gün boyunca canlılığına Cd(II)'nin etkisi (sol Y eksenini kontrol, sağ Y eksenini metale maruz kalan hücreler)



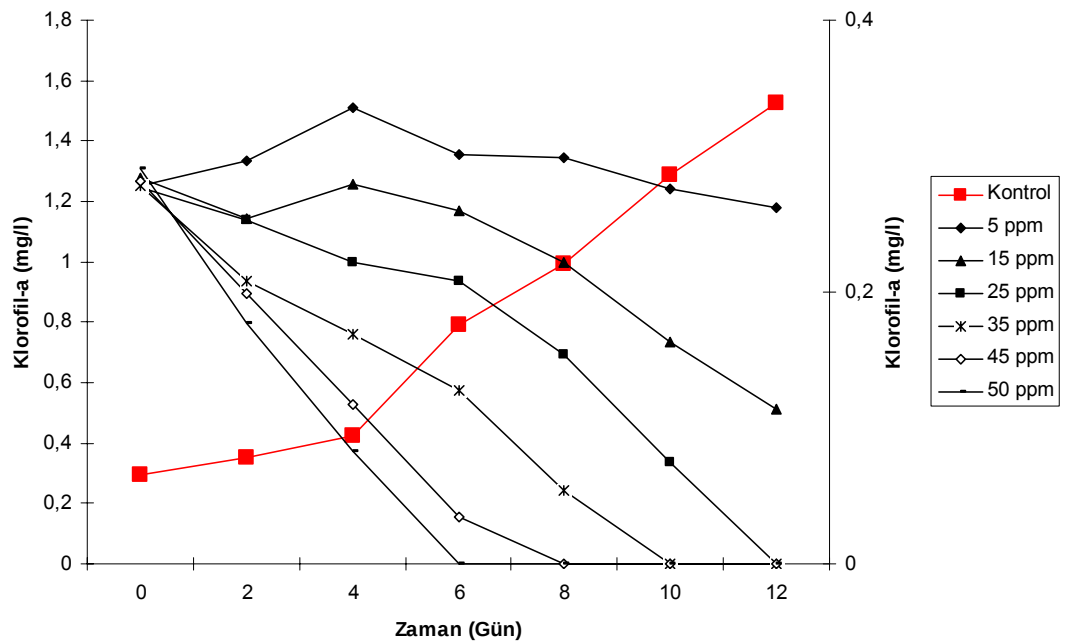
Şekil 4.25. *Synechocystis* sp. BASO508'in 12 gün boyunca canlılığına Cd(II)'nin etkisi (sol Y eksenini kontrol, sağ Y eksenini metale maruz kalan hücreler)



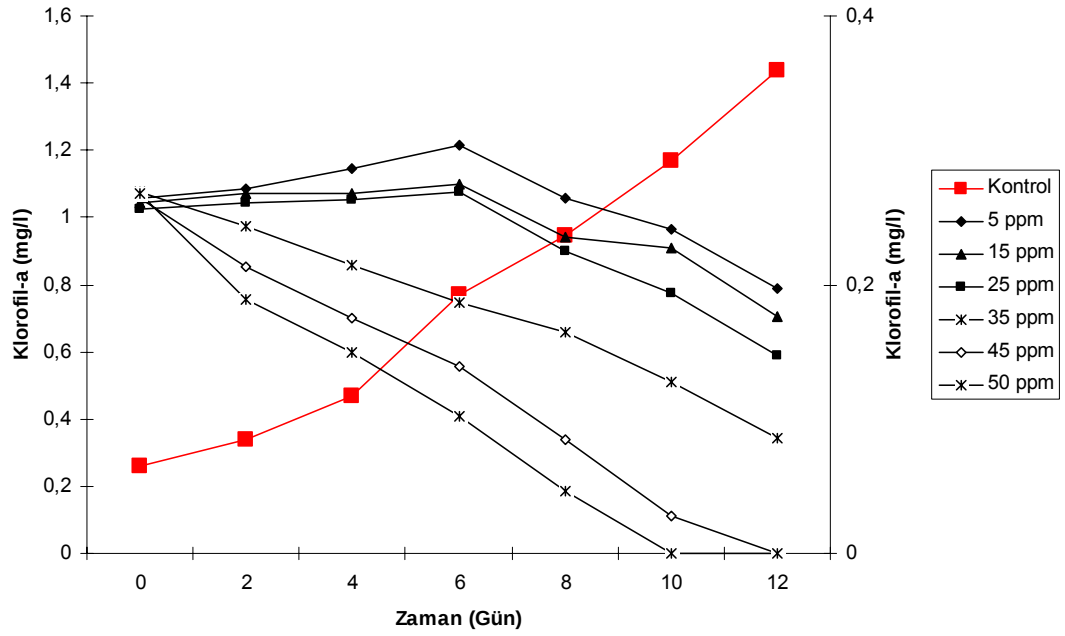
Şekil 4.26. *Synechocystis* sp. BASO509'un 12 gün boyunca canlılığına Cd(II)'nin etkisi (sol Y eksenini kontrol, sağ Y eksenini metale maruz kalan hücreler)



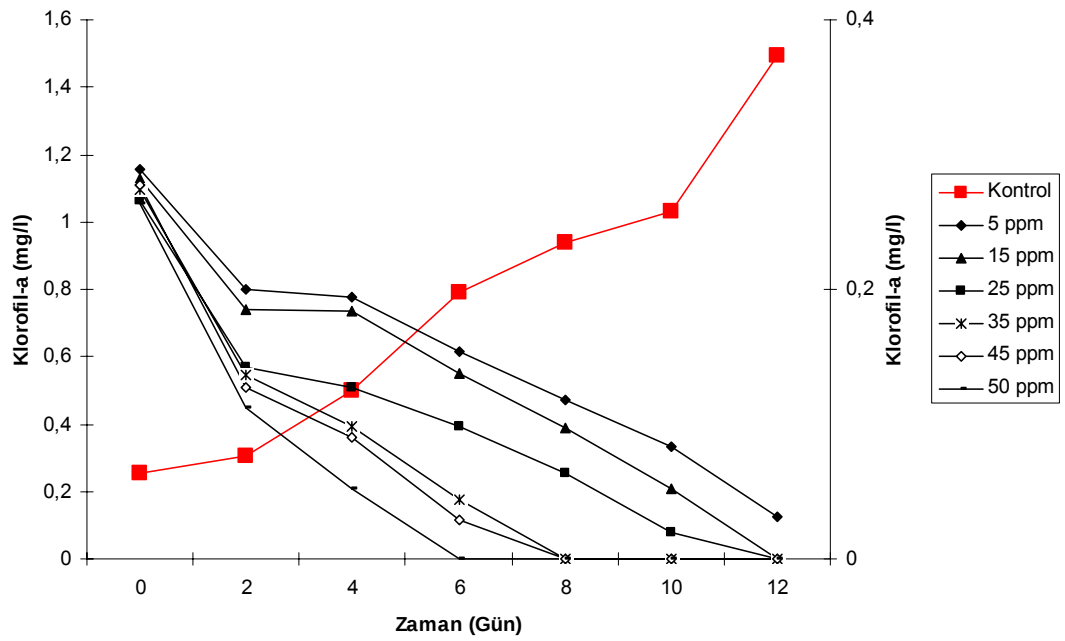
Şekil 4.27. *Synechocystis* sp. BASO510'un 12 gün boyunca canlılığına Cd(II)'nin etkisi (sol Y eksenini kontrol, sağ Y eksenini metale maruz kalan hücreler)



Şekil 4.28. *Synechocystis* sp. BASO511'in 12 gün boyunca canlılığına Cd(II)'nin etkisi (sol Y eksenini kontrol, sağ Y eksenini metale maruz kalan hücreler)



Şekil 4.29. *Synechocystis* sp. BASO671'in 12 gün boyunca canlılığına Cd(II)'nin etkisi (sol Y eksenini kontrol, sağ Y eksenini metale maruz kalan hücreler)



Şekil 4.30. *Synechocystis* sp. BASO672'nin 12 gün boyunca canlılığına Cd(II)'nin etkisi (sol Y eksenini kontrol, sağ Y eksenini metale maruz kalan hücreler)

15 izolatın Cr(VI) ve Cd(II) ortamında 12 gün boyunca gelişimi ve canlılığı incelendiğinde *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının her iki metale de diğer izolatlara göre daha çok dayanıklılık gösterdiği tespit edilmiştir. 50 ppm Cr(VI) konsantrasyonuna maruz kalan 15 izolatın 3'ü 2. günden itibaren, 2'si 4. günden itibaren, 3'ü ise 6. günden itibaren canlılıklarını kaybetmiştir. Ancak, 50 ppm Cd(II) konsantrasyonuna maruz kalan izolatların 1'i 2. günden itibaren, 4'ü ise 6. günden itibaren canlılıklarını kaybetmiştir. Bu nedenle 12 gün boyunca Cr(VI) ve Cd(II)'ye maruz kalan izolatların gelişimine ve canlılığına en çok etki gösteren metalin Cr(VI), en az etki gösteren metalin ise Cd(II) olduğu belirlenmiştir.

4.2.3. Probit analizi ile Cr(VI) ve Cd(II)'nin EC₅₀ (% 50'sini öldüren tahmini metal konsantrasyonu) değerleri

Klorofil-a ve EC₅₀ (% 50'sini öldüren tahmini metal konsantrasyonu) sonuçları değerlendirildiğinde 5-50 ppm Cr(VI) konsantrasyonlarına maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatı 12 gün boyunca canlılığını korumuş ve 6. güne ait EC₅₀ değeri 11,5 ppm olarak tespit edilmiştir. EC₅₀ değeri en yüksek olan bu izolat Cr(VI)'dan diğer izolatlara nazaran en az etkilenmiştir. Cr(VI)'dan en çok etkilenen *Synechocystis* sp. BASO506 izolatında ise 5-50 ppm Cr(VI) konsantrasyonlarında ilk itibaren günden kontrole göre canlılıklarında azalma meydana gelmiş ve 6. gün EC₅₀ değeri 1,0 ppm olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.4).

Diğer izolatlarda 50 ppm gibi yüksek konsantrasyonlarda genellikle canlılığın 6-8. güne kadar dayanırken, 5-50 ppm Cd(II) konsantrasyonlarına maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatı kontrole karşılaştırıldığında canlılığında azalma olsa dahi 12 gün boyunca canlılığını korumuştur. İzolatın 6. güne ait EC₅₀ değeri 15,3 ppm olarak tespit edilmiştir. *Synechocystis* sp. BASO506 izolatında ise 5-50 ppm Cd(II) konsantrasyonlarında ilk günden itibaren canlılıklarında azalma meydana gelmiş ve 6. gün EC₅₀ değeri 1,3 ppm olarak tespit edilmiştir.

5-50 ppm Cr(VI) ve Cd(II)'ye maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO506'nın klorofil-a miktarları kontrol hücrelerin klorofil-a miktarları ile karşılaştırıldığında, her iki metal açısından da canlılıklarının en çok etkilenen izolatlar olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen EC₅₀ değerleri de hem Cr(VI)'ya (EC₅₀ 1,0 ppm) hem de Cd(II)'ye (EC₅₀ 1,3 ppm) maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO506 izolatın klorofil-a sonuçları ile örtüşmektedir.

Çalışmada kullanılan izolatlar içersinde EC₅₀ değerlerine göre *Synechocystis* sp. BASO670 hem Cr(VI) (EC₅₀ 11,5 ppm) hem de Cd(II)'den (EC₅₀ 15,3 ppm) en az etkilenen izolat olarak belirlenmiş ve biyosorpsiyon, biyobirikim, SEM, protein ve sülfidril deneyleri bu izolat ile yapılmıştır. Klorofil-a miktarlarına bağlı canlılık grafikleri ile karşılaştırıldığında Cr(VI)'nın, *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının canlılığına Cd(II)'den daha çok etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar EC₅₀ sonuçlarını doğrulamaktadır.

Çizelge 4.4. Siyanobakter izolatlarının EC₅₀* değerleri

İzolatlar	Cr(VI) EC ₅₀ (ppm)	Cd(II) EC ₅₀ (ppm)
<i>Synechocystis</i> sp. BASO444	6,0	7,2
<i>Synechocystis</i> sp. BASO500	4,0	2,6
<i>Synechocystis</i> sp. BASO501	3,5	2,4
<i>Synechocystis</i> sp. BASO502	3,5	3,1
<i>Synechocystis</i> sp. BASO503	2,9	2,1
<i>Synechocystis</i> sp. BASO504	3,6	5,8
<i>Synechocystis</i> sp. BASO506	1,0	1,3
<i>Synechocystis</i> sp. BASO507	3,8	7,5
<i>Synechocystis</i> sp. BASO508	2,8	5,4
<i>Synechocystis</i> sp. BASO509	2,0	2,2
<i>Synechocystis</i> sp. BASO510	6,2	10,4
<i>Synechocystis</i> sp. BASO511	2,1	5,8
<i>Synechocystis</i> sp. BASO670	11,5	15,3
<i>Synechocystis</i> sp. BASO671	10,5	10,9
<i>Synechocystis</i> sp. BASO672	2,0	2,5

*Cr(VI) ve Cd(II) ağır metallerine maruz kalan siyanobakter izolatlarının % 50'sini öldüren tahmini metal dozları

EC₅₀ değerleri ve metalli ortamda gelişim grafik sonuçlarına göre diğer çalışmalarda denenecek izolat ve metal konsantrasyonları belirlenmiştir.

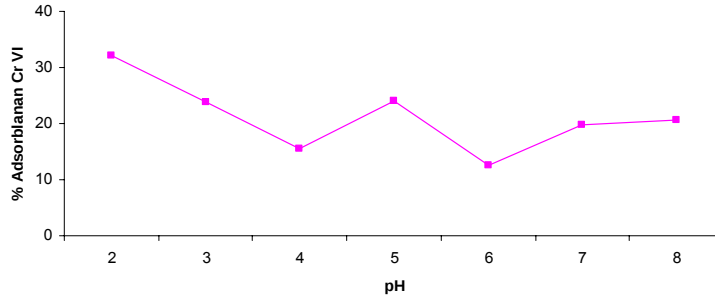
4.3. Biyosorpsiyon Sonuçları

4.3.1. Cr(VI) biyosorpsiyonu

Biyosorpsiyon denemelerinde biyosorbent olarak Cr(VI)'dan en az etkilenen *Synechocystis* sp. BASO670 izolatı seçilerek, cansız, tutuklanmış canlı ve tutuklanmış cansız hücrelerinin metal adsorblama kapasitesi üzerine pH, biyokütle, sıcaklık, Cr(VI) konsantrasyonları ve zaman gibi değişkenlerin etkisi incelenmiştir. Deneyler üç paralelli olarak düzenlenmiş ve biyosorpsiyon sonuçları ortalama değer olarak verilmiştir.

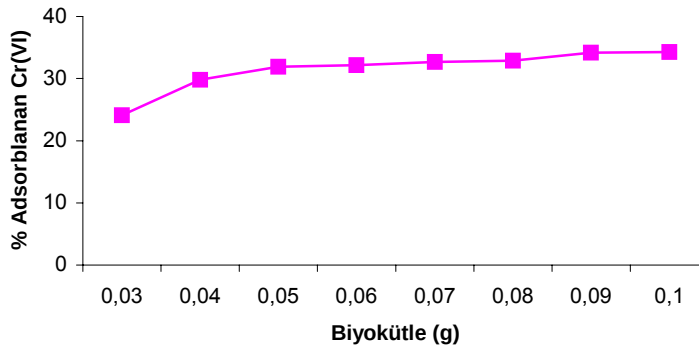
Cansız Hücrelerle Cr(VI) Biyosorpsiyonu

Atık suların pH'ları değişkenlik göstermekte olup, değişen pH'larda metal biyosorpsiyonunun farklı etkilendiği düşünülerek Cr(VI)'ya dayanıklı siyanobakter izolatının cansız formuna Cr(VI) biyosorpsiyonunda pH'nın etkisi incelenmiştir. Denemeler literatür araştırmalarına göre 100 ppm Cr(VI) ve 0,05 g biyokütle ile düzenlenmiştir. Deney sonuçlarına göre, cansız haldeki *Synechocystis* sp. BASO670 izolatı Cr(VI)'yı en yüksek pH 2'de (Şekil 4.31), 100 ppm Cr(VI)'nın % 32'sini adsorbe etmiştir. Daha sonraki biyosorpsiyon deney setleri de bu pH'ya göre ayarlanmıştır. SS (standart sapma) $\pm 1-3$ arasında değişmektedir.



Şekil 4.31. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının cansız örneklerinin pH'ya bağlı Cr(VI) biyosorpsiyonu (0,05 g biyokütle; 25 °C; 100 ppm Cr(VI); 60 dak)

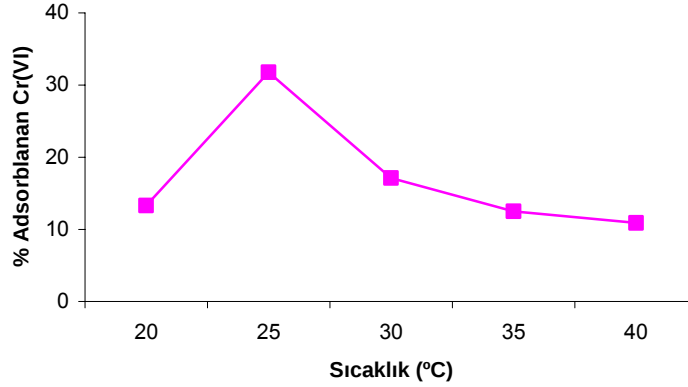
Cansız *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının farklı biyokütle miktarlarının (0,03-0,1 g) Cr(VI) (100 ppm) biyosorpsiyonuna etkisi incelenmiştir. 0,05 g biyokütlede Cr(VI)'nın yaklaşık % 32'si adsorbe edilmiştir. Ancak, 0,05 g biyokütleden sonra biyosorpsiyonun sabitlendiği tespit edilmiştir (Şekil 4.32). SS $\pm 1-2$ arasında değişmektedir.



Şekil 4.32. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının cansız örneklerinin biyokütle miktarına bağlı Cr(VI) biyosorpsiyonu (pH 2; 25 °C; 100 ppm Cr(VI); 60 dak)

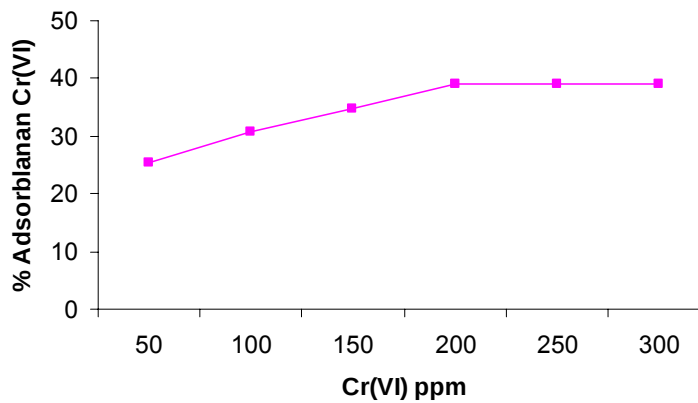
Cansız *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının Cr(VI) (100 ppm) biyosorpsiyonunda sıcaklığın etkisi incelenmiş ve farklı sıcaklıklarda (20-40 °C) optimum biyosorpsiyonunun 25 °C'de gerçekleştiği, 25 °C üzeri sıcaklıklarda ise düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.33). 20 °C'de adsorplanan Cr(VI) miktarı % 13 iken, 25 °C'de adsorplanan Cr(VI) miktarı % 32 olarak belirlenmiştir. Ancak, 25 °C'nin

üzerindeki sıcaklıklarda ise adsorplanan Cr(VI) miktarı giderek düşmüş ve 40 °C’de Cr(VI)’un % 11’inin adsorplandığı tespit edilmiştir. SS $\pm$ 1-4 arasında değişmektedir.



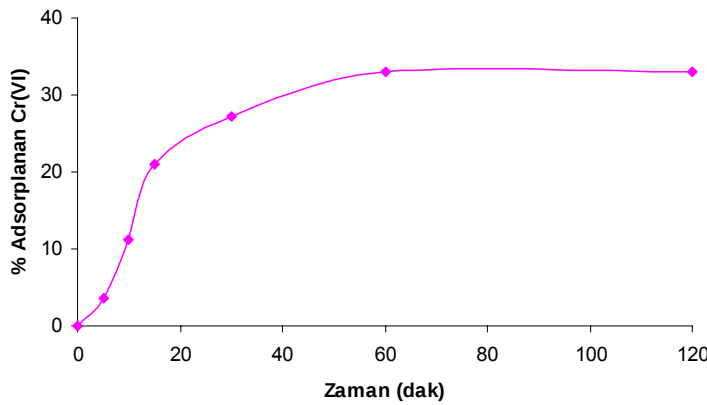
Şekil 4.33. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının cansız örneklerinin sıcaklığa bağlı Cr(VI) biyosorpsiyonu (pH 2; 0,05 g biyokütle; 100 ppm Cr(VI); 60 dak)

Cr(VI)’nın farklı konsantrasyonlarında ise, *Synechocystis* sp. BASO670 izolatında 50 ppm’den (% 25) 200 ppm’e (% 39) kadar adsorplanan Cr(VI) miktarı artmış, bu konsantrasyondan itibaren sabitlendiği gözlenmiştir (Şekil 4.34). SS $\pm$ 1-2 arasında değişmektedir.



Şekil 4.34. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının cansız örneklerinin Cr(VI) konsantrasyonlarına bağlı Cr(VI) biyosorpsiyonu (pH 2; 0,05 g biyokütle; 25 °C; 60 dak)

Zamana bağılı olarak *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının cansız hücrelerinin Cr(VI) biyosorpsiyonunda, ilk 60 dak'da 100 ppm Cr(VI)'nın % 33'ü adsorplanmıştır. 60. dak'dan itibaren en son denenen 24. saate kadar Cr(VI) biyosorpsiyonunun dengeye ulaştığı tespit edilmiştir. Bu nedenle 120. dak'dan 24. saate kadar olan sonuçlarda bir değişiklik olmadığı için şekilde verilmemiştir (Şekil 4.35). $SS \pm 1-3$ arasında değişmektedir.

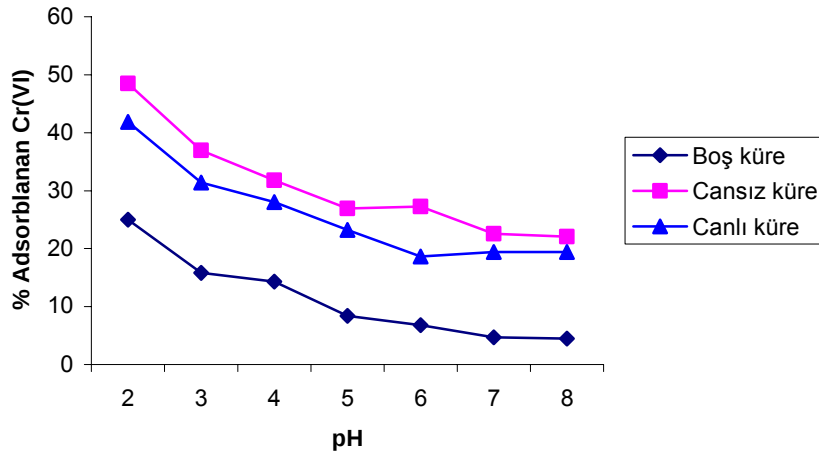


Şekil 4.35. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının cansız örneklerinin zamana bağılı Cr(VI) biyosorpsiyonu (pH 2; 0,05 g biyokütle; 25 °C; 100 ppm Cr(VI))

Tutuklanmış hücrelerde Cr(VI) biyosorpsiyonu

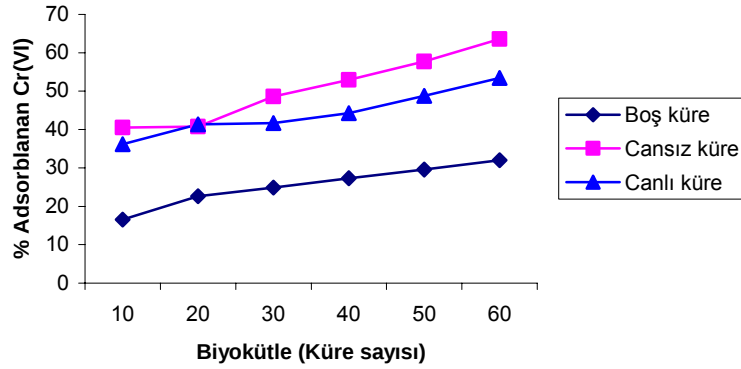
Cr(VI)'ya en dayanıklı *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının canlı ve cansız hücreleri Ca-aljinat ile tutuklanarak Cr(VI) biyosorpsiyon kapasitesi belirlenmiştir. Kontrol için ayrıca, boş küreler kullanılmış ve tüm denemeler boş kürelerle de yapılmıştır. Tutuklanmış materyallerin Cr(VI) biyosorpsiyonunda; aynı şekilde hazırlanan metal ortamlarına, ayrı olarak, cansız, canlı ve boş (mikroorganizma içermeyen) kürelerden 30'ar tane konulmuştur. Deneylerde 0,95 g tutuklanmış cansız ve 0,99 g tutuklanmış canlı biyokütleler kullanılmıştır. Tutuklanmış *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının Cr(VI) biyosorpsiyonunda farklı pH, biyokütle miktarları, sıcaklık, metal konsantrasyonları ve zamanın etkisi incelenmiştir.

Cansız ve canlı hücre içeren kürelerde adsorplama kapasitesi en iyi pH 2’de belirlenirken, artan pH’ya bağlı olarak her iki örnekte de adsorplama kapasitesinde düşme tespit edilmiştir. pH 2’de % 49’luk adsorpsiyonla en iyi adsorpsiyonu cansız hücre içeren küreler gösterirken, canlı hücre içeren kürelerde adsorplama kapasitesi % 42 olarak belirlenmiştir. Hücre içermeyen kontrol kürelerinin de bir miktar Cr(VI) adsorplama kapasitesi gösterdiği dikkati çekmiştir (pH 2’de % 25) (Şekil 4.36). SS $\pm 1-4$ arasında değişmektedir.



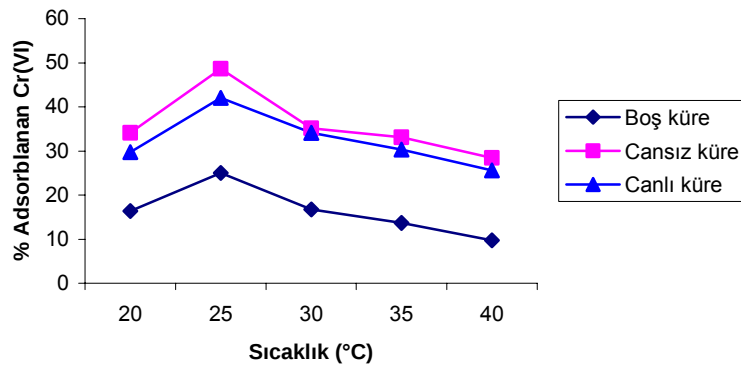
Şekil 4.36. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının tutuklanmış canlı ve cansız örneklerinin pH’ya bağlı Cr(VI) biyosorpsiyonu (30’ar küre; 25 °C; 100 ppm Cr(VI); 60 dak)

Canlı ve cansız hücreler içeren küreler Cr(VI) adsorblanması bakımından mukayese edildiğinde biyokütledeki artışa ile birlikte her ikisinin de adsorblanma kapasitelerinin arttığı belirlenmiştir. En yüksek alınımla 60 küre ile yapılan denemelerde elde edilmiş ve tutuklanmış cansız hücreler 100 ppm Cr(VI)’nın % 64’ünü, tutuklanmış canlı hücreler % 54’ünü, boş küreler ise % 32’sini adsorbe etmiştir (Şekil 4.37). SS $\pm 1-4$ arasında değişmektedir.



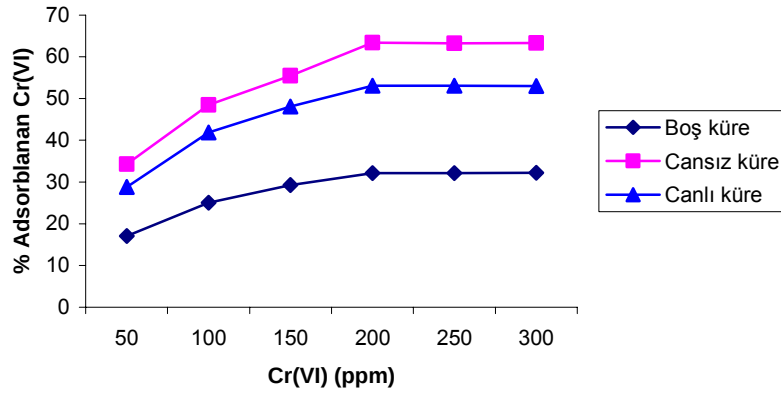
Şekil 4.37. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının tutuklanmış canlı ve cansız örneklerinin biyokütle miktarlarına bağlı Cr(VI) biyosorpsiyonu (pH 2; 25 °C; 100 ppm Cr(VI); 60 dak)

20-40 °C arasındaki sıcaklıklarda ise cansız ve canlı tutuklanmış hücrelerde en yüksek biyosorpsiyonun 25 °C’de gerçekleştiği tespit edilmiştir. Canlı ve cansız hücreler içeren küreler Cr(VI) adsorblanması bakımından mukayese edildiğinde 25 °C sıcaklıkta her ikisinin de adsorblanma kapasitelerinin arttığı belirlenmiş ve tutuklanmış cansız hücrelerin Cr(VI) adsorpsiyonunun daha yüksek olduğu görülmüştür (% 49). En iyi adsorplanmanın gerçekleştiği 25 °C’de tutuklanmış cansız hücrelerin Cr(VI) adsorpsiyonu, tutuklanmış canlı hücrelerden % 7 oranında daha fazla olduğu görülmektedir (Şekil 4.38). SS $\pm$ 1-3 arasında değişmektedir.



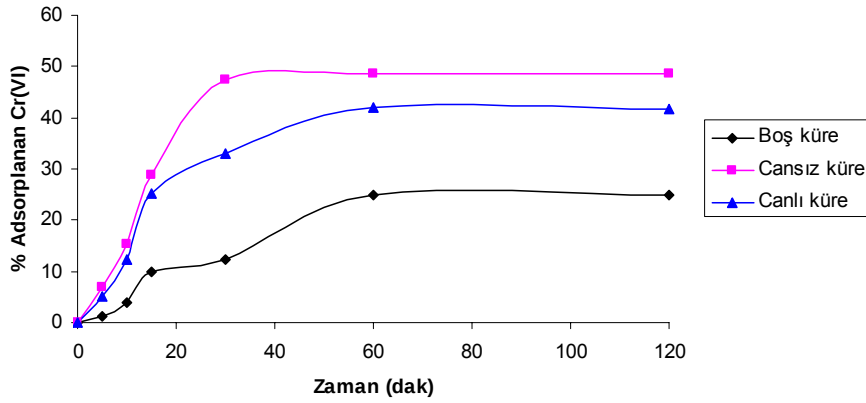
Şekil 4.38. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının tutuklanmış canlı ve cansız örneklerinin sıcaklığa bağlı Cr(VI) biyosorpsiyonu (pH 2; 30’ar küre; 100 ppm Cr(VI); 60 dak)

Synechocystis sp. BASO670 izolatının tutuklanmış canlı ve tutuklanmış cansız örneklerinin 50-300 ppm başlangıç konsantrasyonlarına bağlı Cr(VI) biyosorpsiyonunda, 200 ppm'e kadar biyosorpsiyonun arttığı, 200 ppm'de tutuklanmış canlı hücrelerin % 53, tutuklanmış cansız hücrelerin ise % 63 oranında Cr(VI) adsorpladığı tespit edilmiştir. 200 ppm'den itibaren ise her iki örnek için Cr(VI) adsorpsiyonunun sabit kaldığı görülmüştür (Şekil 4.39). SS $\pm 1-5$ arasında değişmektedir.



Şekil 4.39. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının tutuklanmış canlı ve cansız hücrelerinin Cr(VI) konsantrasyonlarına bağlı Cr(VI) biyosorpsiyonu (pH 2; 30'ar küre; 25 °C; 60 dak)

Synechocystis sp. BASO670 izolatının tutuklanmış cansız hücrelerinin ve tutuklanmış canlı hücrelerinin zamana bağlı Cr(VI) biyosorpsiyonunda örnekler toplam 24 saat 100 ppm Cr(VI)'ya maruz bırakılmış, tutuklanmış cansız hücrelerin 30. dak'dan, tutuklanmış canlı hücrelerin ise 60. dak'dan itibaren Cr(VI) adsorpsiyonlarının sabit kaldığı görülmüştür. Tutuklanmış cansız hücreler ilk 30. dak'da 100 ppm Cr(VI)'nın % 47'sini, tutuklanmış canlı hücreler ise 60. dak'da % 42'sini adsorpladığı tespit edilmiştir. 120. dak'dan 24. saate kadar olan sonuçlarda bir değişiklik olmadığı için şekilde verilmemiştir (Şekil 4.40). SS $\pm 1-4$ arasında değişmektedir.



Şekil 4.40. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının tutuklanmış canlı ve cansız örneklerinin zamana bağlı Cr(VI) biyosorpsiyonu (pH 2; 30'ar küre; 25 °C; 100 ppm Cr(VI))

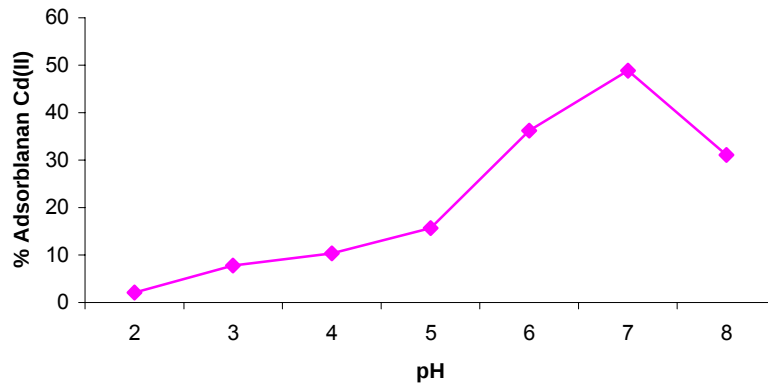
Deneylerde uygulanan optimum şartlarda tutuklanmış cansız hücreler 100 ppm Cr(VI)'nın yaklaşık % 49'unu, tutuklanmış canlı hücreler % 42'sini, cansız hücreler ise % 32'sini adsorpladığı görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının tutuklanmış cansız örnekleri tutuklanmış canlı örneklerden daha çok Cr(VI) adsorpladığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada tutuklama ajanı olarak Na-ajinat kullanılmıştır. Cr(VI) adsorpsiyonuna katkısını belirlemek için kontrol olarak boş Ca-aljinat küreleri kullanılarak mukayese edilmiştir. Yapılan her denemede boş kürelerin de Cr(VI)'yı adsorpladığı görülmüştür.

4.3.2. Cd(II) biyosorpsiyonu

Cd(II)'ye en dayanıklı ve EC₅₀ değeri en yüksek olan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatı biyosorbent olarak seçilmiş, cansız, tutuklanmış cansız ve tutuklanmış canlı hücrelerinin Cd(II) biyosorpsiyonuna pH, biyokütle, sıcaklık, metal konsantrasyonları ve zaman gibi değişkenlerin etkisi incelenmiştir. Deneyler üç paralelli olarak düzenlenmiş ve biyosorpsiyon sonuçları ortalama değer olarak verilmiştir.

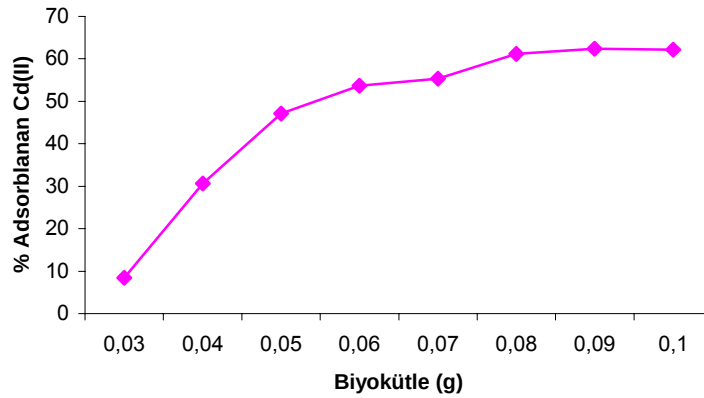
Cansız Hücrelerde Cd(II) Biyosorpsiyonu

Synechocystis sp. BASO670 izolatının metal sorpsiyonunda pH'nın etkisini incelemek üzere farklı pH'lardaki (pH 2-8) Cd(II) çözeltileri hazırlanmıştır. Denemeler literatür araştırmalarına göre 100 ppm Cd(II) ve 0,05 g biyokütle ile düzenlenmiştir. Deney sonuçlarına göre cansız formdaki *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının Cd(II)'yi en düşük asidik pH'larda adsorpladığı, en yüksek de pH 7'de; 100 ppm Cd(II)'nin % 49'unu adsorbe ettiği belirlenmiştir. SS $\pm 1-2$ arasında değişmektedir. Daha sonraki biyosorpsiyon deney setleri de bu pH'ya göre ayarlanmıştır.



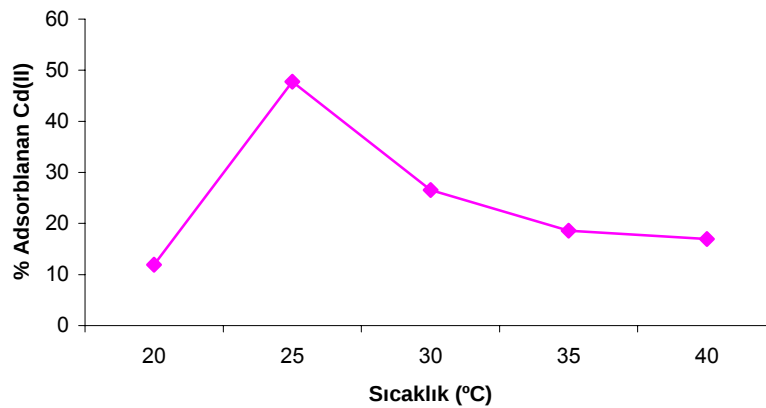
Şekil 4.41. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının cansız örneklerinin pH'ya bağlı Cd(II) biyosorpsiyonu (0,05 g biyokütle; 25 °C; 100 ppm Cd(II); 60 dak)

Cansız *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının biyokütlesindeki artışa paralel (0,03-0,1 g) Cd(II) biyosorpsiyonunun da arttığı gözlenmiştir. 0,05 g biyokütlede Cr(VI)'nın yaklaşık % 47'si adsorbe edilirken, maksimum Cd(II) adsorpsiyonu 0,08 g biyokütlede, % 62 olarak belirlenmiştir. Bu biyokütleden sonra kullanılan 0,1 g biyokütlede biyosorpsiyonun sabitlendiği tespit edilmiştir (Şekil 4.42). SS $\pm 1-4$ arasında değişmektedir.



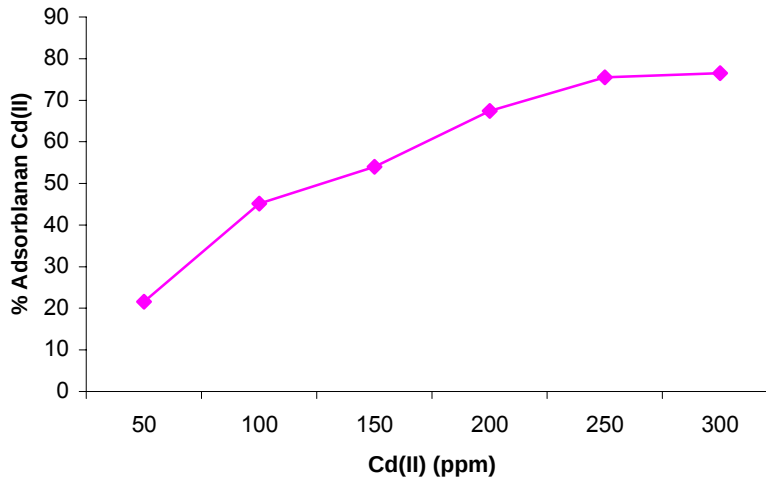
Şekil 4.42. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının cansız örneklerinin biyokütle miktarına bağlı Cd(II) biyosorpsiyonu (pH 7; 25 °C; 100 ppm Cd(II); 60 dak)

Farklı sıcaklıkların Cd(II) biyosorpsiyona etkisi incelendiğinde, *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının 20-40 °C arasındaki sıcaklıklarda maksimum biyosorpsiyonun (% 48) 25 °C’de gerçekleştiği gözlenmiştir (Şekil 4.43). *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının cansız hücrelerinde, sıcaklık 20 °C’den (% 12) 25 °C’ye (% 48) çıktığında Cd(II) adsorpsiyonu % 36 oranında artmıştır. 25 °C’den 40 °C’ye kadar Cd(II) adsorpsiyonunda azalma olduğu tespit edilmiştir. 40 °C’de 100 ppm Cd(II)’nin % 17’si adsorplanmıştır. SS $\pm$ 1-4 arasında değişmektedir.



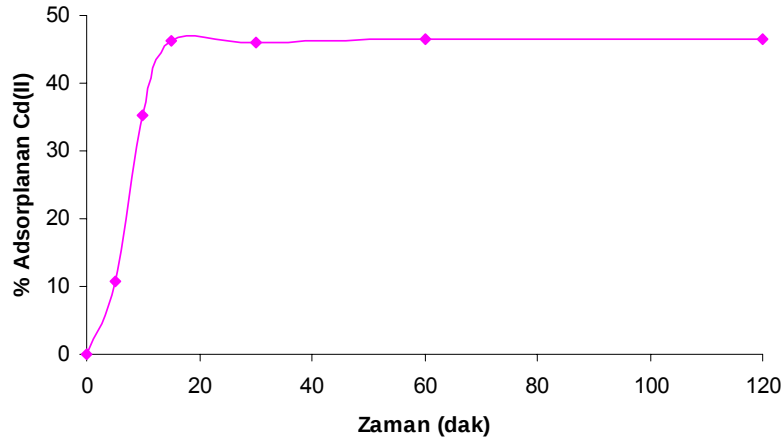
Şekil 4.43. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının cansız örneklerinin sıcaklığa bağlı Cd(II) biyosorpsiyonu (pH 7; 0,05 g biyokütle; 100 ppm Cd(II); 60 dak)

Cd(II)'nin çeşitli başlangıç konsantrasyonlarında ise *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının cansız hücreleri 50 ppm'den (% 22) 250 ppm'e (% 76) kadar adsorplanan Cd(II) miktarı artmış, bu konsantrasyondan itibaren sabitlendiği gözlenmiştir. Maksimum Cd(II) adsorpsiyonunun 250 ppm'de % 76 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.44). SS $\pm 1-3$ arasında değişmektedir.



Şekil 4.44. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının cansız örneklerinin Cd(II) konsantrasyonlarına bağlı Cd(II) biyosorpsiyonu (pH 7; 0,05 g biyokütle; 25 °C; 60 dak)

Synechocystis sp. BASO670 izolatının cansız hücrelerinin zamana bağlı Cd(II) biyosorpsiyonunda ilk 15 dak boyunca biyosorpsiyonun arttığı, bu dak'dan itibaren alınının sabitlendiği tespit edilmiştir. İlk 15 dak'da cansız *Synechocystis* sp. BASO670 izolatı 100 ppm'lik Cd(II)'nin % 46'sını adsorbe etmiştir (Şekil 4.45). SS $\pm 1-2$ arasında değişmektedir.

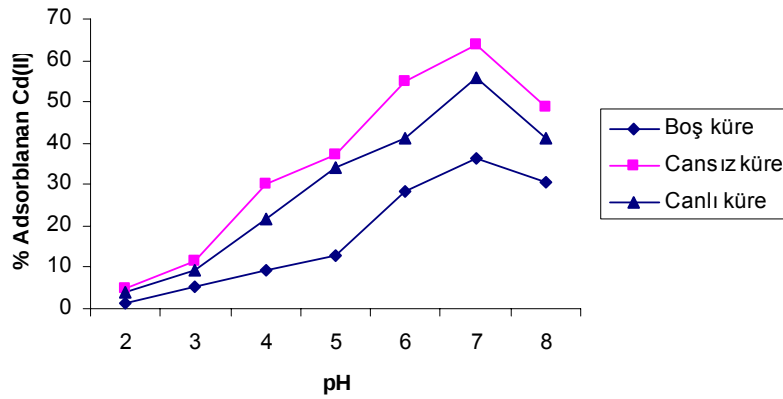


Şekil 4.45. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının cansız örneklerinin zamana bağlı Cd(II) biyosorpsiyonu (pH 7; 0,05 g biyokütle; 25 °C; 100 ppm Cd(II))

Tutuklanmış Hücrelerde Cd(II) Biyosorpsiyonu

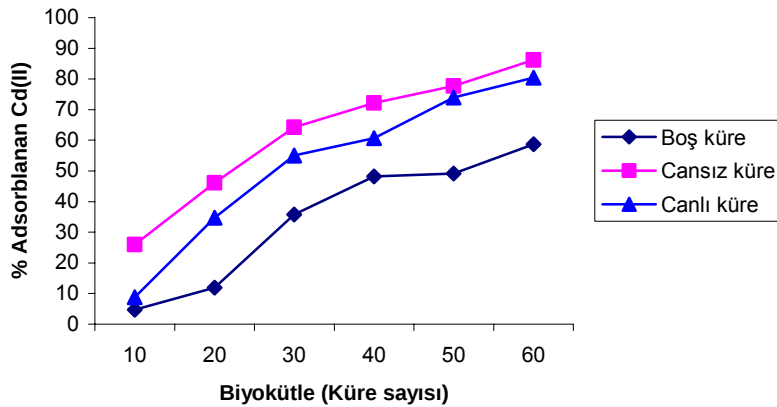
Cd(II)'ye en çok dayanıklılık gösteren *Synechocystis* sp. BASO670 izolatı Ca-aljinat ile canlı ve cansız halde tutuklanarak Cd(II) biyosorpsiyon kapasiteleri belirlenmiştir. Kontrol için ayrıca, boş küreler kullanılmış ve tüm denemeler boş kürelerle de yapılmıştır. İzolatın tutuklanmış canlı ve cansız hücrelerinin pH'ya, biyokütle miktarına, sıcaklığa, metal konsantrasyonlarına ve zamana bağlı Cd(II) biyosorpsiyonu incelenmiştir.

Tutuklanmış canlı ve cansız *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının 100 ppm'lik Cd(II)'yi maksimum pH 7'de adsorbe ettiği tespit edilmiştir. Canlı ve cansız hücreler içeren küreler pH'ya bağlı Cd(II) adsorblanması mukayese edildiğinde pH 7'ye kadar her ikisinin de adsorblanma kapasitelerinin arttığı belirlenmiştir. Tüm pH'larda tutuklanmış cansız hücrelerin, tutuklanmış canlı hücrelere göre daha fazla Cd(II) adsorpladığı dikkati çekmiştir. Aynı zamanda boş kürelerle (kontrol) yapılan denemelerde bunların metali adsorplama kapasitesinin olduğu görülmüştür. En iyi sonuç alınan tutuklanmış cansız hücrelerin, pH 7'de Cd(II)'yi adsorplama kapasitesi % 64 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.46). SS $\pm 1-5$ arasında değişmektedir.



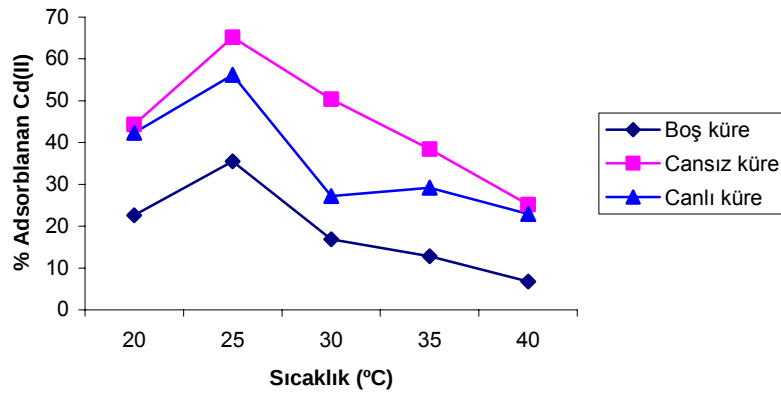
Şekil 4.46. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının tutuklanmış canlı ve cansız örneklerinin pH'ya bağlı Cd(II) biyosorpsiyonu (30'ar küre; 25 °C; 100 ppm Cd(II); 60 dak)

Canlı ve cansız hücreler içeren küreler Cd(II) adsorblanması bakımından mukayese edildiğinde, biyokütlerdeki artış ile birlikte her ikisinin de adsorblanma kapasitelerinin arttığı belirlenmiştir. En yüksek Cd(II) alınımı 60 küre ile yapılan denemelerde elde edilmiş ve *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının tutuklanmış cansız hücreleri 100 ppm Cd(II)'nin % 86'sını, tutuklanmış canlı hücreleri % 80'ini, boş küreler ise % 59'unu adsorbe etmiştir (Şekil 4.47). SS $\pm 1-6$ arasında değişmektedir.



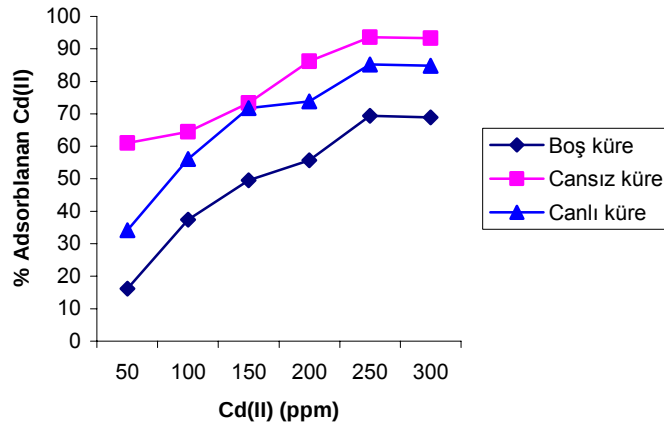
Şekil 4.47. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının tutuklanmış canlı ve cansız örneklerinin biyokütle miktarına bağlı Cd(II) biyosorpsiyonu (pH 7; 25 °C; 100 ppm Cd(II); 60 dak)

20-40 °C arasındaki sıcaklıklarda canlı ve cansız hücreler içeren küreler Cd(II) adsorblanması bakımından mukayese edildiğinde, 25 °C sıcaklıkta her ikisinin de adsorblanma kapasitelerinin arttığı belirlenmiş ve tutuklanmış cansız hücrelerin Cd(II) adsorpsiyonunun daha yüksek olduğu görülmüştür (% 65). En iyi adsorplanmanın gerçekleştiği 25 °C’de tutuklanmış cansız hücrelerin Cd(II) adsorpsiyonu, tutuklanmış canlı hücrelerden (% 56) % 9 oranında daha fazla olduğu görülmektedir (Şekil 4.48). $SS \pm 1-4$ arasında değişmektedir.



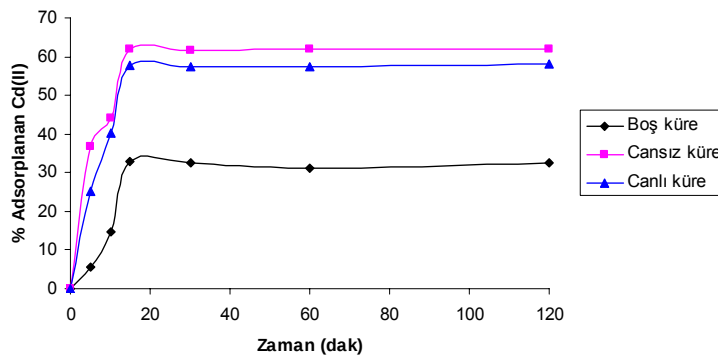
Şekil 4.48. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının tutuklanmış canlı ve cansız örneklerinin sıcaklığa bağlı Cd(II) biyosorpsiyonu (pH 7; 30’ar küre; 100 ppm Cd(II); 60 dak)

Synechocystis sp. BASO670 izolatının tutuklanmış canlı ve cansız örnekleri Cd(II)’nin 50-300 ppm konsantrasyonlarında, 250 ppm’e kadar biyosorpsiyonun arttığı belirlenmiştir. 250 ppm’de tutuklanmış canlı hücrelerin % 85, tutuklanmış cansız hücrelerin ise % 94 oranında Cd(II) adsorpladığı, 250 ppm’den itibaren ise her iki örnek için Cd(II) adsorpsiyonunun sabit kaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.49). $SS \pm 1-4$ arasında değişmektedir.



Şekil 4.49. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının tutuklanmış canlı ve cansız örneklerinin Cd(II) konsantrasyonlarına bağlı Cd(II) biyosorpsiyonu (pH 7; 30'ar küre; 25 °C; 100 ppm Cd(II); 60 dak)

Synechocystis sp. BASO670 izolatının tutuklanmış cansız hücrelerinin ve tutuklanmış canlı hücrelerinin zamana bağlı Cd(II) biyosorpsiyonunda örnekler 24 saat boyunca 100 ppm Cd(II)'ye maruz bırakılmış, tutuklanmış canlı ve cansız hücrelerin 15. dak'da Cd(II)'yi maksimum düzeyde adsorbe ettiği, bu dak'dan sonra adsorpsiyonun sabit kaldığı görülmüştür. Tutuklanmış cansız hücrelerin ilk 15. dak'da 100 ppm Cd(II)'nin % 62'sini, canlı hücrelerin ise % 58'ini adsorpladığı tespit edilmiştir (Şekil 4.50). SS $\pm 1-5$ arasında değişmektedir.



Şekil 4.50. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının tutuklanmış canlı ve cansız örneklerinin zamana bağlı Cd(II) biyosorpsiyonu (pH 7; 30'ar küre; 25 °C; 100 ppm Cd(II))

Elde edilen bütün sonuçlara göre Cr(VI) ve Cd(II) ağır metallerinin biyosorpsiyonunda siyanobakter izolatlarından *Synechocystis* sp. BASO670'ün tutuklanmış cansız hücreleri, cansız hücrelerine ve tutuklanmış canlı hücrelerine göre her iki metali daha çok adsorpladığı tespit edilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda Cd(II) ağır metalinin gideriminin tüm denemelerde, Cr(VI) gideriminden daha yüksek olduğu görülmektedir.

4.4. Biyosorpsiyon-Desorpsiyon Döngüsü ve Biyokütlelerin Tekrar Kullanımı

Biyosorpsiyonun endüstriyel uygulamalara uygun olabilmesi için kullanılan biyokütlenin metal biyosorpsiyon ve desorpsiyon yeteneğinin bilinmesi gerekmektedir. Biyokütleyle tutunan metaller, çeşitli çözeltiler kullanılarak geri kazanılabilmektedir. Kullanılan biyokütlenin cinsi ve büyüklüğüne göre birçok biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüsü uygulanarak biyokütle tekrarlı kullanılarak biyoteknolojik açıdan avantaj sağlamaktadır.

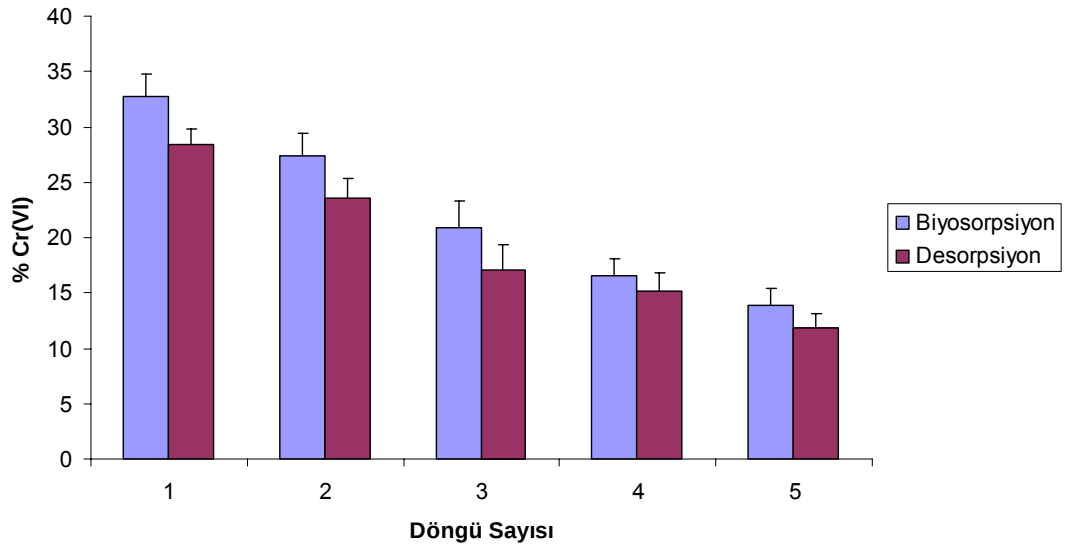
Bu çalışmada, *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının cansız, tutuklanmış cansız ve tutuklanmış canlı hücrelerinin Cr(VI) ve Cd(II) biyosorpsiyonu için Bölüm 4.3'te belirlenen uygun biyosorpsiyon şartlarında tekrar biyosorpsiyonları çalışılmış ve hemen ardından her iki metalin desorpsiyonları denenmiş ve kullanılan biyokütlelerin çoklu kullanılabilirlik potansiyeli belirlenmiştir.

4.4.1. Cr(VI) desorpsiyonu ve biyokütlelerin tekrar kullanılabilirliği

Synechocystis sp. BASO670 izolatının cansız, tutuklanmış canlı ve cansız biyokütleleri ile kontrol olarak kullanılan boş kürelerin Cr(VI) gideriminde belirlenen, optimum şartlarda 5 defa biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüsüne tabi tutulmuştur. Desorpsiyon için 50 mL 0,1 mol/L HCl çözeltisi kullanılarak tutunan Cr(VI)'nın serbest kalması sağlanmıştır. Deneyler üç paralelli olarak yapılmıştır.

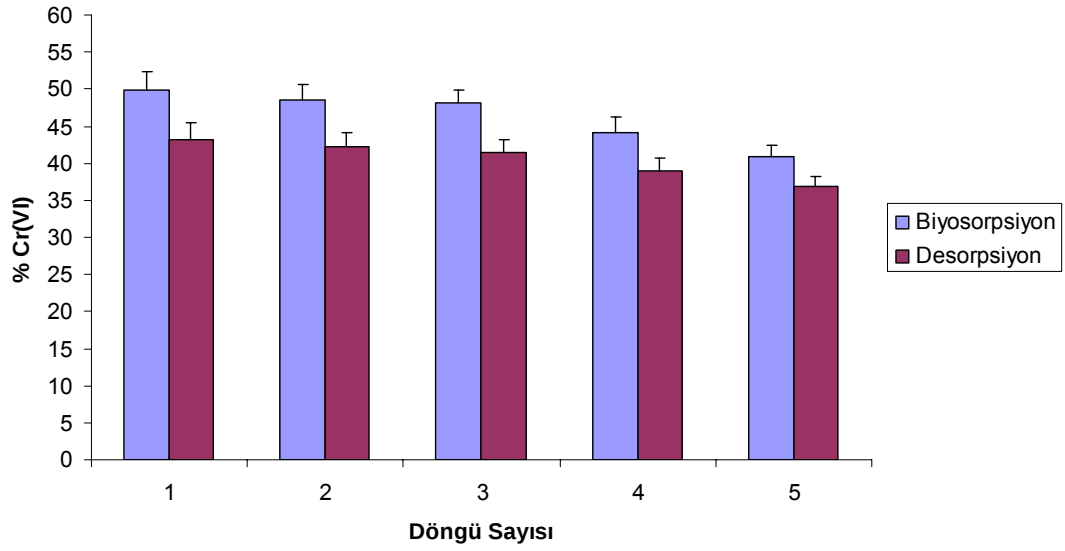
Synechocystis sp. BASO670 izolatının cansız hücreleri için 5 biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüsü denenmiştir. İlk döngüde Cr(VI)'nın % 33'ünü tutan cansız

hücreler, tutunan Cr(VI)'nın % 28'ini desorbe etmiştir. Denenen 2., 3., 4. ve 5. döngülerde biyosorpsiyon ve desorpsiyon miktarları azalmıştır. 5. döngüde tutulan Cr(VI) miktarı % 14 iken, desorpsiyon miktarının % 12 olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, 5 döngüde cansız biyokütlede tutunan Cr(VI)'nın % 86-92'si geri kazanılmıştır (Şekil 4.51). $SS \pm 1-3$ arasında değişmektedir.



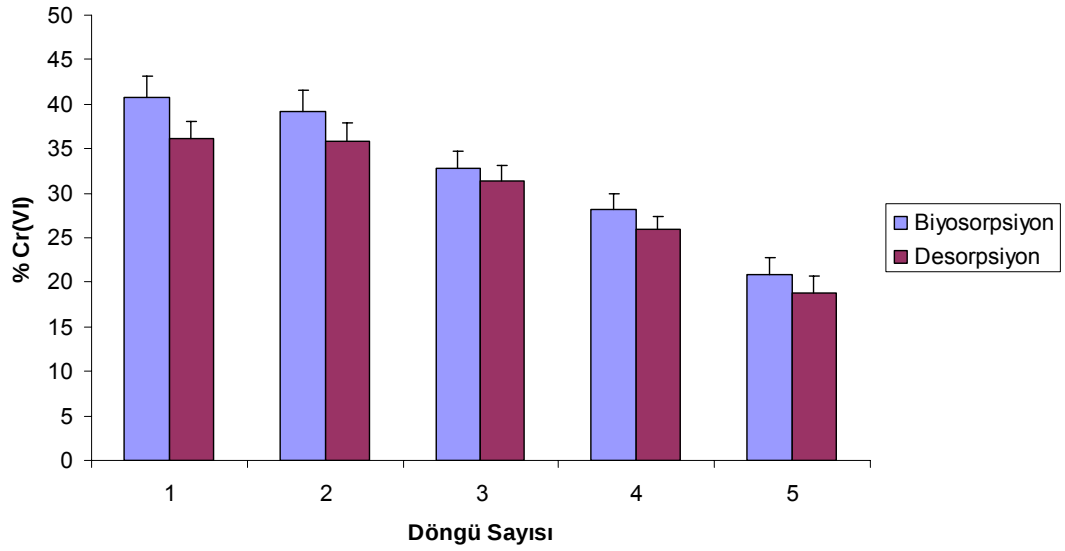
Şekil 4.51. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının cansız hücrelerinin Cr(VI) biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüleri (pH 2; 0,05 g biyokütle; 25 °C; 100 ppm Cr(VI), 60 dak).

Synechocystis sp. BASO670 izolatının tutuklanmış cansız hücreleri ile 5 biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüsü denenmiştir. Tutuklanmış cansız hücreler, ilk döngüde Cr(VI)'nın % 50'sini tutmuş ve tutunan Cr(VI)'nın % 43'ünü desorbe etmiştir. 1., 2. ve 3., döngülerde biyosorpsiyon ve desorpsiyon miktarlarının sabit kaldığı, 4. ve 5. döngülerde ise azaldığı görülmüştür. 5. döngüde tutulan Cr(VI) miktarı % 41 iken desorpsiyon miktarının % 37 olduğu tespit edilmiştir. 5 döngüde tutuklanmış cansız biyokütlede tutunan Cr(VI)'nın % 86-90'ı geri kazanılmıştır (Şekil 4.52). $SS \pm 1-3$ arasında değişmektedir.



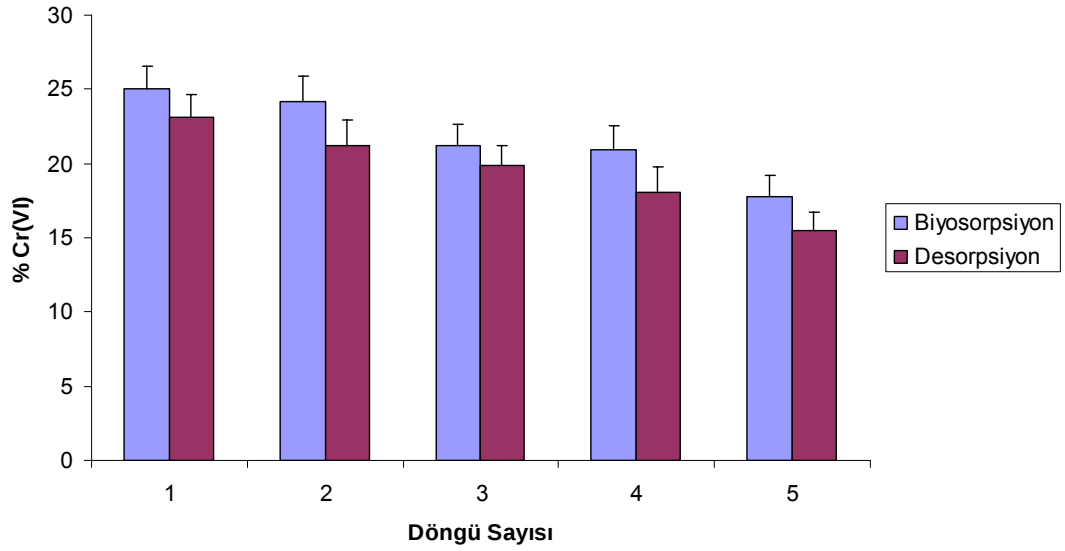
Şekil 4.52. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının tutuklanmış cansız hücrelerinin Cr(VI) biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüleri (pH 2; 30 küre; 25 °C; 100 ppm Cr(VI), 60 dak).

Synechocystis sp. BASO670 izolatının tutuklanmış canlı hücreleri ile 5 biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüsü denenmiştir. İlk döngüde Cr(VI)'nın % 41'ini tutan tutuklanmış canlı hücreler, tutunan Cr(VI)'nın % 36'sını desorbe etmiştir. biyosorpsiyon ve desorpsiyon miktarlarının 1. ve 2. döngülerde sabit kaldığı, 3., 4. ve 5. döngülerde ise azaldığı belirlenmiştir. 5. döngüde ise tutulan Cr(VI) miktarı % 21 iken desorpsiyon miktarının % 19 olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 5 döngüde tutuklanmış canlı biyokütlede tutunan Cr(VI)'nın % 89-96'sı geri kazanılmıştır (Şekil 4.53). SS $\pm$ 2-3 arasında değişmektedir.



Şekil 4.53. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının tutuklanmış canlı hücrelerinin Cr(VI) biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüleri (pH 2; 30 küre; 25 °C; 100 ppm Cr(VI), 60 dak).

Kontrol olarak denemelerde boş küreler kullanılmış ve boş küreler ile diğer denemelerde olduğu gibi 5 biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüsü denenmiştir. İlk döngüde Cr(VI)'nın % 25'ini tutan boş küreler, tutunan Cr(VI)'nın % 23'ünü desorbe etmiştir. 1. ve 2. döngülerde biyosorpsiyon ve desorpsiyon miktarları sabit kalmış, 3., 4. ve 5. döngülerde ise biyosorpsiyon ve desorpsiyon miktarları azalmıştır. 5. döngüde tutulan Cr(VI) miktarı % 18 iken desorpsiyon miktarının % 16 olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 5 döngüde boş kürelere tutunan Cr(VI)'nın % 86-94'ü geri kazanılmıştır (Şekil 4.54). SS $\pm 1-2$ arasında değişmektedir.



Şekil 4.54. Boş kürelerin Cr(VI) biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüleri (pH 2; 30 küre; 25 °C; 100 ppm Cr(VI), 60 dak).

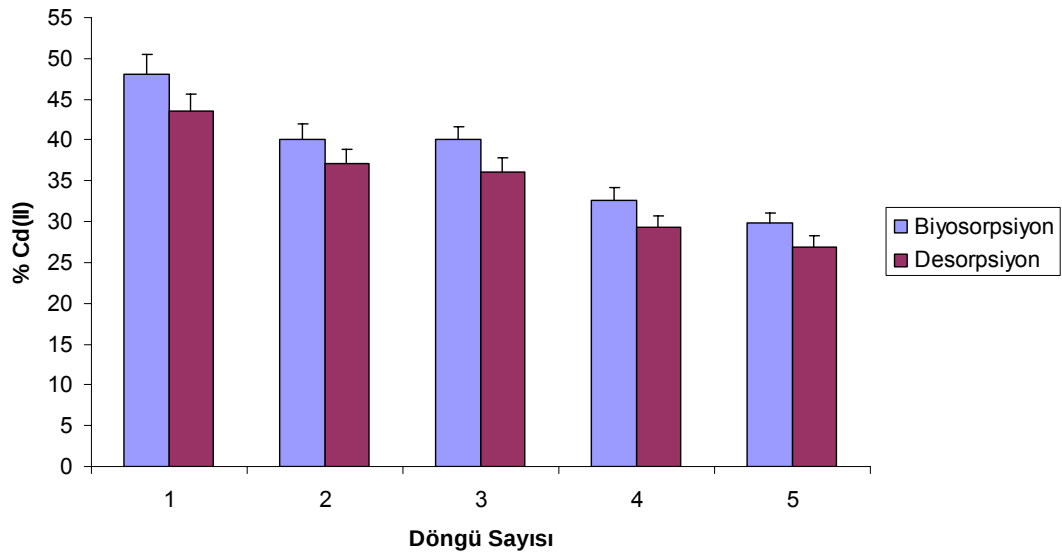
Synechocystis sp. BASO670 izolatının Cr(VI) biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüleri genel olarak değerlendirildiğinde 5. döngüde tutuklanmış cansız hücrelerin biyosorpsiyon ve desorpsiyon miktarları, cansız ve tutuklanmış canlı hücrelerden daha yüksek olduğu görülmüştür. Özellikle cansız hücrelerinde biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüsünde döngü sayısı arttıkça metal alınımı ve geri kazanımı azalmaktadır. Bu azalmanın nedeni her döngüde yıkama işleminden sonra biyokütle kaybından kaynaklanmaktadır. Beşinci döngüden sonra biyokütlelerde deformasyonlar meydana gelmiştir. Elde edilen sonuçlara göre bütün denemelerde 5 döngüde kullanılan her biyokütle tutunan Cr(VI)'nın % 86-96'sı geri kazanılmıştır.

4.4.2. Cd(II) desorpsiyonu ve biyokütlelerin tekrar kullanılabilirliği

Synechocystis sp. BASO670 izolatının cansız, tutuklanmış cansız, tutuklanmış canlı biyokütleleri ve boş küreler daha önce Cd(II) gideriminde belirlenen optimum şartlarda 5 defa biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüsüne tabi tutulmuştur. Desorpsiyon için 50 mL 0.1 mol/L HCl çözeltisi kullanılarak tutunan Cd(II)'nin serbest kalması sağlanmıştır. Deneyler üç paralelli olarak düzenlenmiş, biyosorpsiyon ve

desorpsiyon sonuçları ortalama değer olarak verilmiştir. SS $\pm 1-5$ arasında değişmektedir.

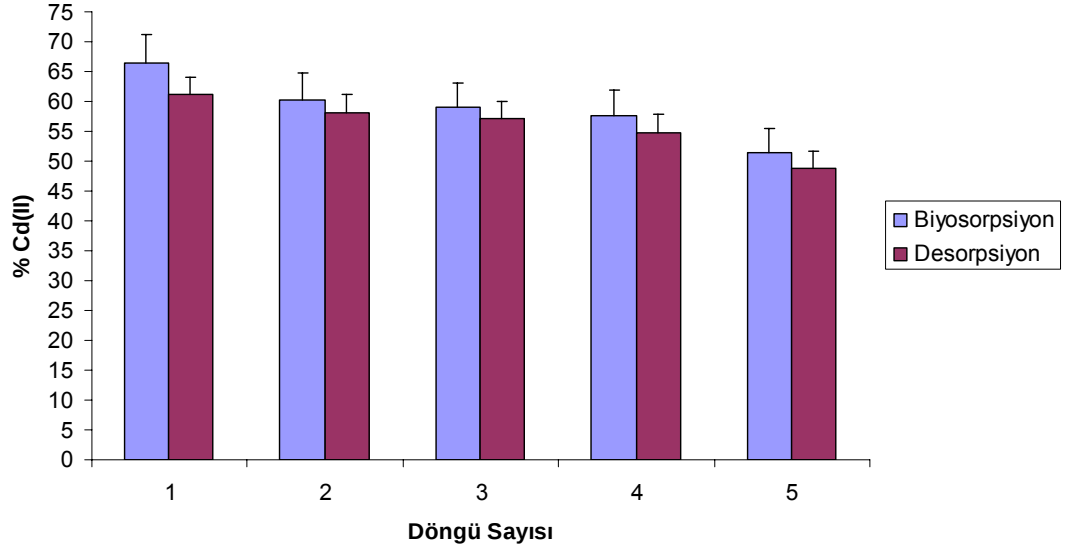
Synechocystis sp. BASO670 izolatının cansız hücreleri ile 5 biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüsü denenmiştir. İlk döngüde, cansız hücrelerin Cd(II)'nin % 48'ini tuttuğu ve tutunan Cd(II)'nin % 44'ünü desorbe ettiği belirlenmiştir. 1. döngüden 5. döngüye kadar biyosorpsiyon ve desorpsiyon miktarlarının azaldığı görülmüştür. 5. döngüde tutulan Cd(II) miktarı % 30 iken desorpsiyon miktarının % 27 olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 5 döngüde cansız biyokütlede tutunan Cd(II)'nin % 90-93'ü geri kazanılmıştır (Şekil 4.55). SS $\pm 1-2$ arasında değişmektedir.



Şekil 4.55. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının cansız hücrelerinin Cd(II) biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüleri (pH 7; 0,05 g biyokütle; 25 °C; 100 ppm Cd(II), 60 dak).

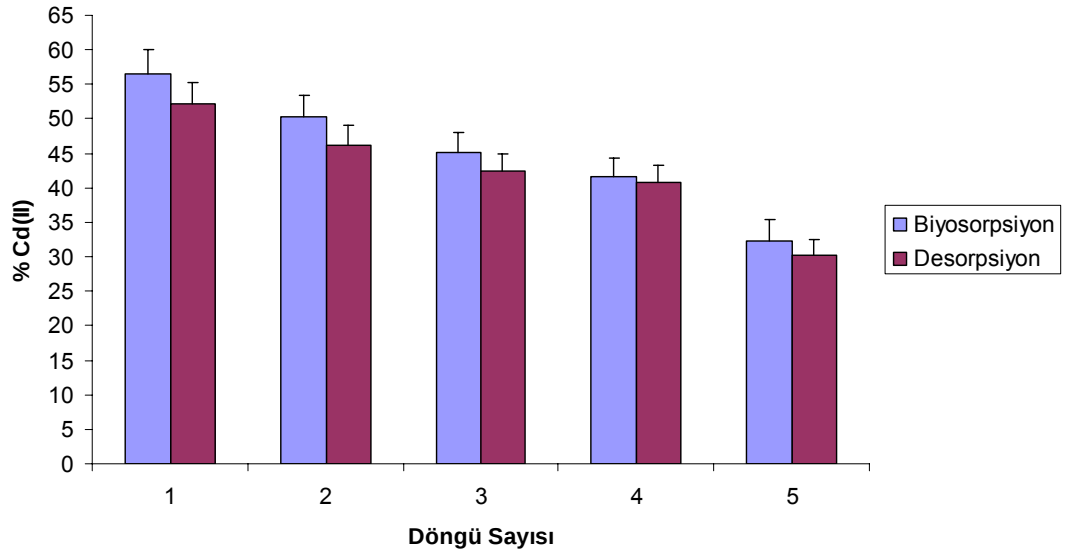
Synechocystis sp. BASO670 izolatının tutuklanmış cansız hücreleri ile 5 biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüsü denenmiş ve ilk döngüde Cd(II)'nin % 67'sini tutan tutuklanmış cansız hücreler, tutunan Cd(II)'nin % 61'ini desorbe etmiştir. 1. döngüden 5. döngüye kadar biyosorpsiyon ve desorpsiyon miktarları azalmıştır. 5. döngüde tutulan Cd(II) miktarı % 51 iken desorpsiyon miktarının % 49 olduğu tespit

edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 5 döngüde tutunan Cd(II)'nin % 92-97'si geri kazanılmıştır (Şekil 4.56). SS $\pm 3-5$ arasında değişmektedir.



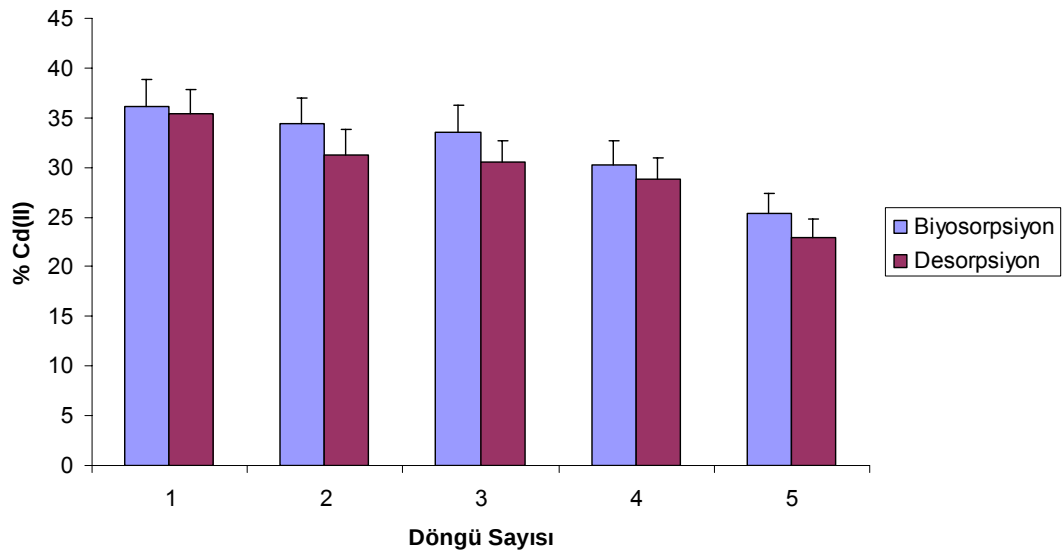
Şekil 4.56. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının tutuklanmış cansız hücrelerinin Cd(II) biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüleri (pH 7; 30 küre; 25 °C; 100 ppm Cd(II), 60 dak).

Tutuklanmış canlı hücreleri ile 5 biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüsü denenmiştir. Tutuklanmış canlı hücrelerin ilk döngüde Cd(II)'nin % 57'sini tuttuğu ve tutunan Cd(II)'nin % 52'sini desorbe ettiği tespit edilmiştir. 1. döngüden 5. döngüye kadar biyosorpsiyon ve desorpsiyon miktarlarının azaldığı görülmüştür. 5. döngüde tutulan Cd(II) miktarı % 32 iken, desorpsiyon miktarının % 30 olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 5 döngüde tutuklanmış canlı biyokütlede tutunan Cd(II)'nin % 92-98'si geri kazanılmıştır (Şekil 4.57). SS $\pm 2-4$ arasında değişmektedir.



Şekil 4.57. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının tutuklanmış canlı hücrelerinin Cd(II) biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüleri (pH 7; 30 küre; 25 °C; 100 ppm Cd(II), 60 dak).

Kontrol amaçlı kullanılan boş küreler ile 5 biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüsü denenmiştir. Birinci döngüde Cd(II)'nin % 36'sını tutan boş küreler, tutunan Cd(II)'nin % 35'ini desorbe etmiştir. 1. döngüden 5. döngüye kadar biyosorpsiyon ve desorpsiyon miktarları azalmıştır. 5. döngüde tutulan Cd(II) miktarı % 25 iken desorpsiyon miktarının % 23 olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 5 döngüde boş kürelere tutunan Cd(II)'nin % 90-98'si geri kazanılmıştır (Şekil 4.58). SS $\pm 2-3$ arasında değişmektedir.



Şekil 4.58. Boş kürelerin Cd(II) biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüleri (pH 7; 30 küre; 25 °C; 100 ppm Cd(II), 60 dak).

Canlı, tutuklanmış canlı ve tutuklanmış cansız biyokütleleri kullanılan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının Cd(II) biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüleri genel olarak değerlendirildiğinde, tutuklanmış cansız hücrelerin çalışmada kullanılan diğer biyokütlelerle göre daha verimli olduğu tespit edilmiştir. Diğer biyokütleler ile mukayese edildiğinde, cansız hücrelerde döngü sayısı arttıkça Cd(II) alınımı ve geri kazanımının azaldığı dikkat çekmiştir. Bu azalmanın nedeni her döngüde yıkama işleminden sonra biyokütle kaybından kaynaklanmaktadır. Beşinci döngüden sonra kullanılan bütün biyokütlelerde deformasyonlar meydana gelmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 5 döngüde kullanılan her biyokütleyle tutunan Cd(II)'nin % 90-98'si geri kazanılmıştır.

Her iki metal (Cr(VI) ve Cd(II)) biyosorpsiyon-desorpsiyon ve tekrar kullanım açısından değerlendirildiğinde, *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının tutuklanmış cansız hücreleri kullanılan diğer biyokütlelerden daha yüksek oranda metali tutma ve geri bırakma kapasitesine sahip olduğu görülmektedir. Bu çalışmada kullanılan biyokütlelerin (canlı, tutuklanmış canlı ve tutuklanmış cansız) Cd(II) biyosorpsiyon ve desorpsiyon kapasitelerinin Cr(VI) biyosorpsiyon ve desorpsiyon kapasitelerinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

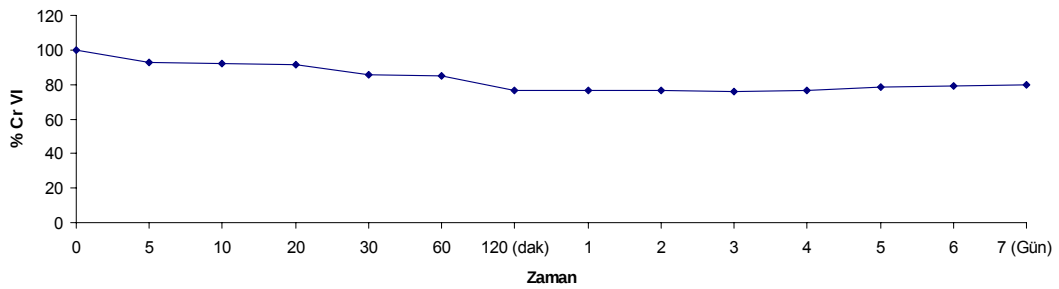
4.5. Biyobirikim

Bölüm 4.2.3’de *Synechocystis* sp. BASO670 izolatına Cr(VI) ve Cd(II)’nin EC_{50} değerleri sırasıyla 11,5 ve 15,3 ppm olarak belirlenmiş ve Çizelge 4.4’de verilmiştir. Bu sonuca göre *Synechocystis* sp. BASO670 diğer izolatlar arasında Cr(VI) ve Cd(II) metallerinden en az etkilenen izolatdır. Biyobirikim deneyleri için metal konsantrasyonları bu sonuçlar dikkate alınarak ayarlanmıştır (10 ppm Cr(VI), 10 ppm Cd(II) ve 10’ar ppm Cr(VI)+Cd(II)). Canlı kültür olarak kullanılan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının Cr(VI), Cd(II) ve Cr(VI)+Cd(II) uygulamalarındaki biyobirikim kapasitelerini belirlemek için 7 gün boyunca bu metallere maruz bırakılmışlardır.

4.5.1. Cr(VI) biyobirikimi

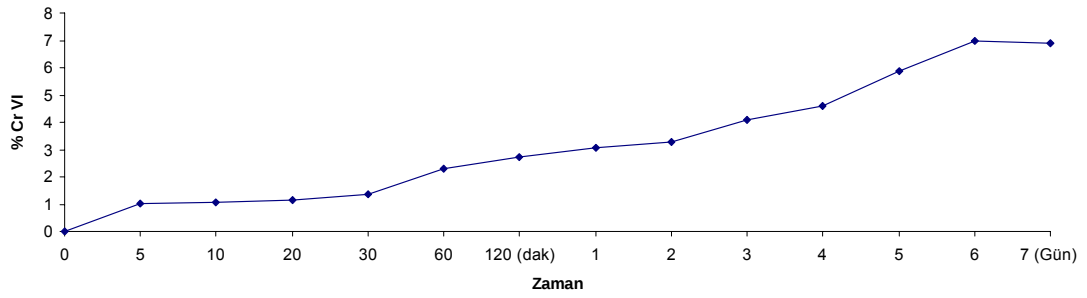
10 ppm Cr(VI) için 7 günlük süre içinde suda kalan, *Synechocystis* sp. BASO670 izolatı tarafından hücre yüzeyinde toplanan ve hücre içinde biriktirilen Cr(VI)’nın yüzde oranları Şekil 4.59-4.61’de gösterilmiştir.

Suda kalan Cr(VI) miktarında 120. dak’ya kadar azalma olduğu görülmektedir. 120. dak’dan itibaren ise Cr(VI) miktarı sabit kalmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 7. günün sonunda 10 ppm Cr(VI)’nın % 80’i suda kalmış, % 9’u izolat tarafından giderilmiştir (Şekil 4.59).



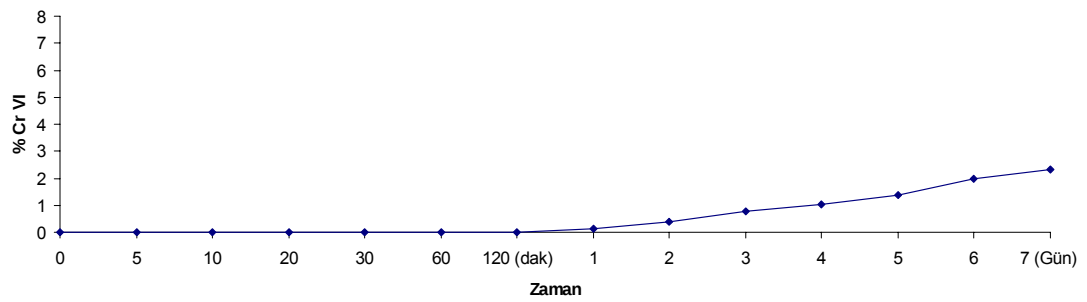
Şekil 4.59. Biyobirikim ile suda kalan % Cr(VI) miktarı

Synechocystis sp. BASO670 izolatının Cr(VI) alınımı hücre yüzeyine toplanma ve hücre içersine alınımlar şeklinde iki aşamada gerçekleşmiştir. Hücre yüzeyine toplanan Cr(VI) miktarı 0. dak'dan itibaren 6. güne kadar arttığı, 6. günden itibaren ise 7. güne kadar sabit kaldığı tespit edilmiştir. Yedinci günün sonunda 10 ppm Cr(VI)'nın % 7'si hücre yüzeyinde toplanmıştır (Şekil 4.60).



Şekil 4.60. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının hücre yüzeyinde toplanan % Cr(VI) miktarı

İlk 120 dak boyunca hücre içersine Cr(VI) alınımı olmamıştır. 120. dak'dan itibaren 7. güne kadar Cr(VI)'nın hücre içersine alındığı tespit edilmiştir. Yedinci günün sonunda 10 ppm Cr(VI)'nın % 2'si hücre içine almıştır (Şekil 4.61).

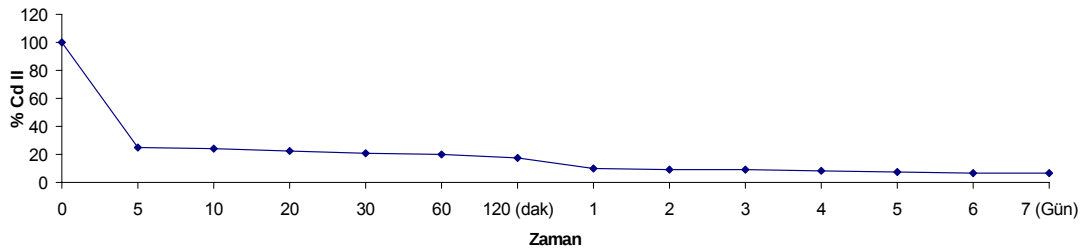


Şekil 4.61. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının hücre içine alınan % Cr(VI) miktarı

4.5.2. Cd(II) biyobirikimi

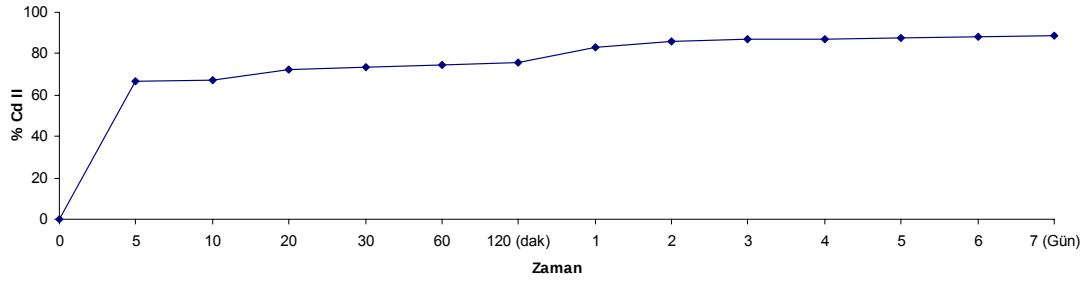
10 ppm Cd(II) için 7 günlük süre içinde suda kalan, *Synechocystis* sp. BASO670 izolatu tarafından hücre yüzeyinde toplanan ve hücre içinde biriktirilen Cd(II)'nin yüzde oranları Şekil 4.62-4.64'de gösterilmiştir.

Suda kalan Cd(II) miktarında 2. güne kadar azalma olduğu görülmektedir. 2. günden itibaren ise Cd(II) miktarı sabit kalmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 7. günün sonunda 10 ppm Cd(II)'nin % 7'si suda kalmış, % 93'ü izolat tarafından giderilmiştir (Şekil 4.62).



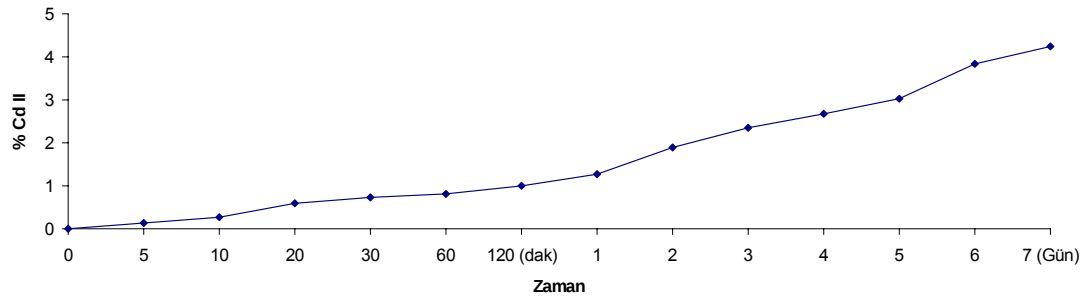
Şekil 4.62. Biyobirikim ile suda kalan % Cd(II) miktarı

Synechocystis sp. BASO670 izolatının Cd(II) alınımı hücre yüzeyine toplanma ve hücre içersine alım şeklinde iki aşamada gerçekleşmiştir. Hücre yüzeyine toplanan Cd(II) miktarı alınımı çok hızlı olup 0. dak'da 10 ppm Cd(II)'nin % 66'sı izolatının hücre yüzeyine tutunmuştur. Hücre yüzeyine alımının 0. dak'dan itibaren 2. güne kadar arttığı, 2. günden itibaren ise 7. güne kadar sabit kaldığı tespit edilmiştir. İzolat 10 ppm Cd(II)'nin % 89'unu hücre yüzeyine toplamıştır (Şekil 4.63).



Şekil 4.63. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının hücre yüzeyine toplanan % Cd(II) miktarı

Hücre içersine alınan Cd(II) miktarı 0. dak'dan itibaren 7. güne kadar arttığı tespit edilmiştir. Yedinci günün sonunda 10 ppm Cd(II)'nin % 4'ü hücre içine almıştır (Şekil 4.64).



Şekil 4.64. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının hücre içine alınan % Cd(II) miktarı

Elde edilen sonuçlara göre *Synechocystis* sp. BASO670 izolatı canlı olarak Cd(II)'yi Cr(VI)'ya nazaran daha çok tercih ederek çoğunu hücre yüzeyine ve çok azını hücre içersine almıştır. Her iki metal açısından bakıldığında hücre içine alınımlar eser miktardadır.

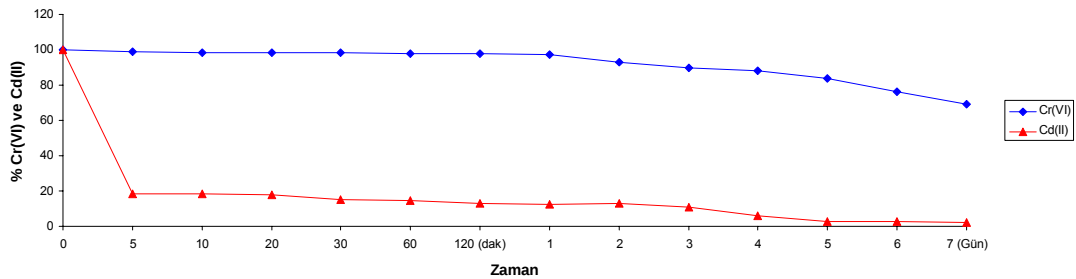
4.5.3. Cr(VI) ve Cd(II) metal karışımının biyobirikimi

Mikroorganizmalar çoğu zaman sanayi atıkları ile kirlenmiş sularda aynı anda birçok metale birden maruz kalmaktadırlar. Birden fazla metale maruz kalan hücrelerin tek

metale maruz kalan aynı hücrelerden alınının açısından farklı davranabildiği bilinmektedir. Bölüm 4.5.1 ve 4.5.2’de Cr(VI) ve Cd(II)’nin tek tek biyobirikim kapasiteleri verilen *Synechocystis* sp. BASO670 izolatı 10 ppm Cr(VI) ve 10 ppm Cd(II) metal karışımına maruz bırakılarak biyobirikimi incelenmiştir.

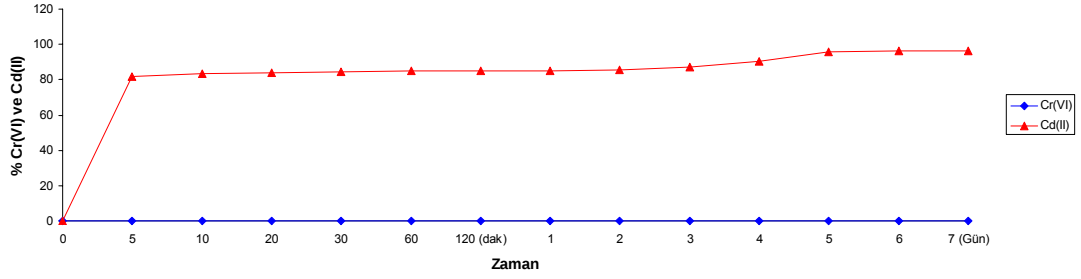
10 ppm Cr(VI) ve 10 ppm Cd(II) metal karışımı için 7 günlük süre içinde suda kalan, *Synechocystis* sp. BASO670 izolatı tarafından hücre yüzeyinde toplanan ve hücre içinde biriktirilen Cr(VI)+Cd(II)’nin yüzde oranları Şekil 4.65-4.67’de gösterilmiştir.

İkinci güne kadar suda kalan Cr(VI) miktarında bir değişiklik görülmemiş, 2. günden itibaren 7. güne kadar azalma olduğu tespit edilmiştir. Cd(II)’nin ise 5. dak’da dahi çok az miktarı suda kalmış, 7. güne kadar miktarı azalmaya devam etmiştir. 7. günün sonunda 10 ppm Cr(VI)’nin % 69’u suda kalmış, % 28’i izolat tarafından giderilmiştir. 7. günde 10 ppm Cd(II)’nin ise % 2’si suda kalmış, % 96’sı izolat tarafından giderilmiştir (Şekil 4.65).



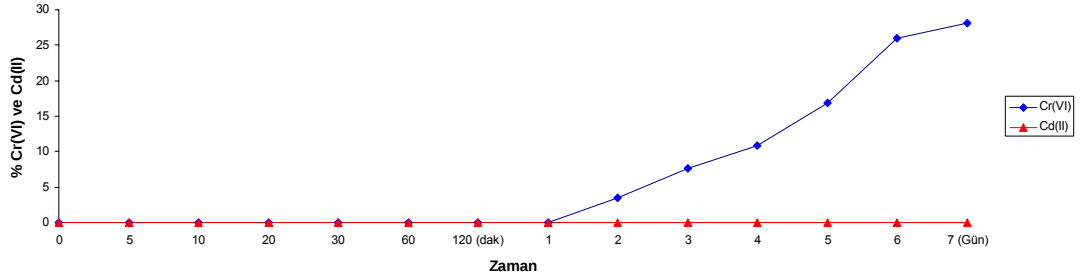
Şekil 4.65. Biyobirikim ile suda kalan % Cr(VI) ve Cd(II) miktarı

Hücre yüzeyine alınan metal miktarları incelendiğinde, 10’ar ppm Cr(VI) ve Cd(II)’ye maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının Cr(VI)’ya nazaran Cd(II)’yi tercih ettiği görülmektedir. 0. dak’dan 7. güne kadar Cr(VI) için hücre yüzeyinde toplanma görülmezken, 10 ppm Cd(II)’nin daha 5. dak’da % 82’si hücre yüzeyinde toplanmıştır. 7. günün sonunda 10 ppm Cd(II)’nin hemen hemen tamamına yakını (% 96) hücre yüzeyinde toplandığı tespit edilmiştir (Şekil 4.66).



Şekil 4.66. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının hücre yüzeyinde toplanan % Cr(VI) ve Cd(II) miktarı

Cr(VI) ve Cd(II)'ye maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının hücre içine alınan metal miktarı incelendiğinde Cd(II)'nin hücre içersine alınmadığı görülmüştür. 1. güne kadar Cr(VI) alınımı da görülmezken, 1. günden itibaren alınıma başlamış ve 7. güne kadar devam etmiştir. 7. günün sonunda 10 ppm Cr(VI)'nın % 28'i hücre içersine alınmıştır (Şekil 4.67).



Şekil 4.67. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının hücre içine alınan % Cr(VI) ve Cd(II) miktarı

Synechocystis sp. BASO670 izolatının biyobirikim çalışması sonuçları değerlendirildiğinde; Cr(VI) ve Cd(II) metalleri tek başına kullanıldıklarında Cd(II) gideriminin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Her iki metal açısından giderim daha çok hücre yüzeyinde toplanma şeklinde olmuştur. Ancak, hücre yüzeyine toplanan Cd(II) miktarının, yüzeye toplanan Cr(VI) miktarından daha fazla olduğu belirlenmiştir. Hücre içersine alınan metal miktarının, hücre yüzeyinde toplanan metal miktarından çok daha az olduğu dikkati çekmiştir.

4.6. SEM Analizi İle Cr(VI), Cd(II) Ve Cr(VI)+Cd(II)'nin *Synechocystis* sp. BASO670 İzolatına Etkilerinin İncelenmesi

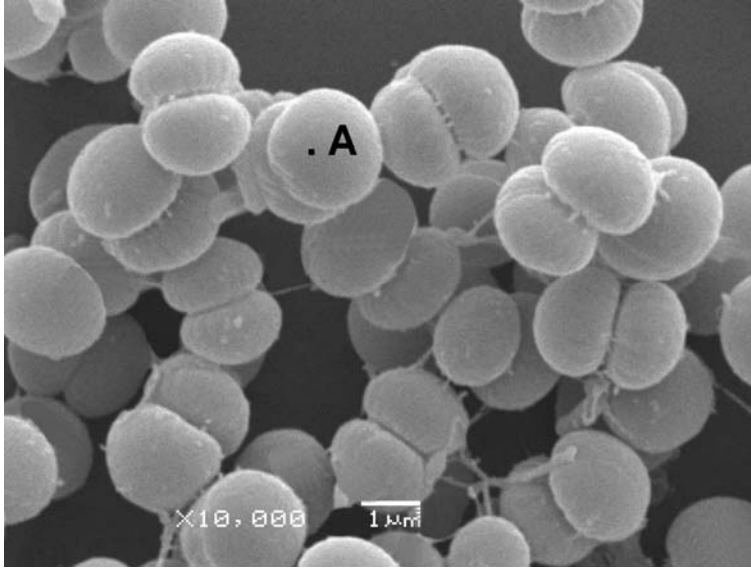
Biyobirikim çalışmaları ile aynı şartlarda inkübasyona bırakılmış, Cr(VI), Cd(II) ve metal karışımlarına maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının elektron mikroskobu görüntüleri ve görüntülerin elementel analiz sonuçları incelenmiştir.

Elektron mikroskobu çekimleri için; kontrol, 10 ppm Cr(VI), 10 ppm Cd(II) ve 10'ar ppm Cr(VI)+Cd(II) olmak üzere 4 farklı kültür hazırlanmıştır. Kontrol olarak kullanılan hücre kültürleri ağır metal içermemektedir. 7 gün inkübasyona bırakılan kültürlerde, siyanobakter hücrelerinin yapısında meydana gelen değişiklikler elektron mikroskobu ile görüntülenmiştir. Görüntüsü çekilen alanlardaki element dağılımları X-ışını analizörü (Energy dispersive X-ışını spectroscopy, EDS) ile belirlenmiştir.

4.6.1. Kontrol hücrelerinin elektron mikroskop görüntüleri

Kontrol olarak; ağır metal içermeyen BG11 besiyerinde 7 gün süre ile inkübasyona bırakılmış *Synechocystis* sp. BASO670 hücrelerinin taramalı elektron mikroskop çekimleri ve EDS ile elementel analizleri yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.3'de gösterilmiştir.

Taramalı elektron mikroskop kontrol hücrelere ait görüntüde normal gelişimini sürdüren bölünme durumundaki tipik *Synechocystis* sp. hücreleri görülmektedir (Resim 4.3).



Resim 4.3. Kontrol *Synechocystis* sp. BASO670 hücrelerinin SEM görüntüleri (X10 000)

Synechocystis sp. BASO670 izolatının kontrol hücrelerinin A (hücre yüzeyi) ile işaretlenmiş bölgelerden enerji dağıtımli X-ışını analizörü ile elementel analizleri yapılmıştır. Kontrol hücrelerinin EDS ile yapılan elementel analiz sonuçlarında, yüksek miktarda C ve O elementlerinin yanı sıra eser miktarlarda Na, Mg, K ve Ca elementlerine rastlanmıştır. Analiz sonuçlarına göre kontrol hücrelerde Cr(VI) ve Cd(II) ağır metallerine rastlanmamıştır (Çizelge 4.5).

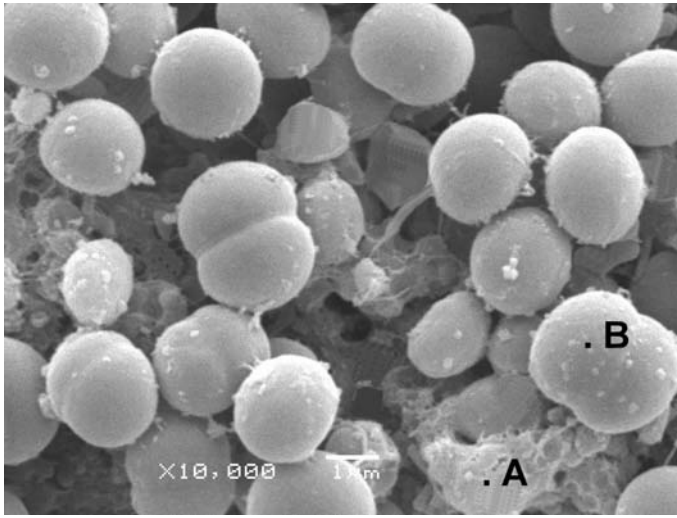
Çizelge 4.5. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının kontrol hücrelerinin, hücre yüzeyinin olduğu A bölgesinin EDS analizi

Elementler (%)								
C	O	Na	Mg	K	Ca	Cr	Cd	Toplam
69,51	26,62	0,86	0,95	0,43	1,63	0	0	100,00

4.6.2. SEM ile Cr(VI)'nın *Synechocystis* sp. BASO670 izolatına etkisinin belirlenmesi ve EDS analiz sonuçları

10 ppm Cr(VI)'ya maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 hücrelerinin taramalı elektron mikroskop görüntüleri incelendiğinde hücrelerin salgıladığı eksopolisakkarit

(EPS) yapıda kontrole göre (metale maruz kalmayan hücre kültürü) belirgin bir artış olduğu görülmektedir (Resim 4.4). Hücre yüzeyleri incelendiğinde kontrole nazaran daha pürüzlü yüzeye sahip hücrelerin sıklığı dikkati çekmektedir. Bu görüntüye sahip hücrelerin çevresinin EPS ile kaplı olduğu ve bu hücrelerin metali daha çok yüzeylerine tutacağı düşünülerek EDS analizleri yoğunlukla bu bölgelerde yapılmıştır.



Resim 4.4. Cr(VI)'ya maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 hücrelerinin SEM görüntüleri (X10 000)

Cr(VI)'ya maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının A (EPS'nin yoğun olduğu bölge) ve B (pürüzlü hücre yüzeyi) ile işaretlenmiş bölgelerden enerji dağıtım X-ışını analizörü ile elementel analizleri yapılmıştır. Analiz sonuçlarına göre EPS'nin yoğun olduğu A bölgesinde, görülen elementlerden % 0,41'inin; pürüzlü hücre yüzeyine sahip B bölgesinde ise % 0,38'inin Cr(VI) olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.6, 4.7). Dolayısıyla EPS'nin yoğun olduğu A bölgesinde B bölgesi analizine göre daha fazla Cr(VI) olduğu belirlenmiştir. A ve B bölgesinde yüksek miktarda C ve O elementlerinin yanı sıra eser miktarlarda Na, Mg, K ve Ca elementlerine rastlanmıştır. Her iki bölgede de Cd(II)'ye rastlanmamıştır.

Çizelge 4.6. Cr(VI)'ya maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının hücrelerinin EPS'nin yoğun olduğu A bölgesinin EDS analizi

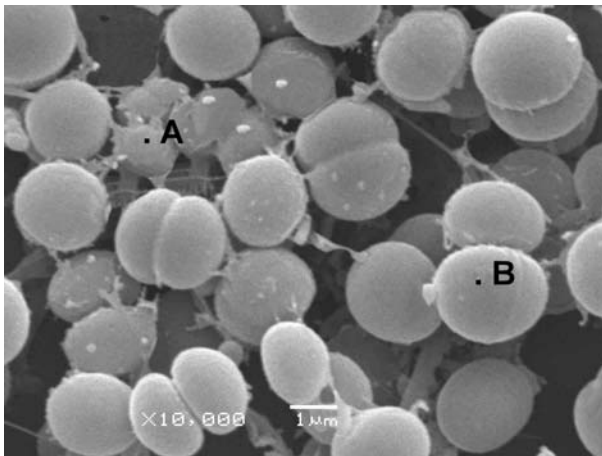
Elementler (%)								Toplam
C	O	Na	Mg	K	Ca	Cr	Cd	
69,47	25,36	0,81	1,73	0,83	1,39	0,41	0	100,00

Çizelge 4.7. Cr(VI)'ya maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının pürüzlü hücre yüzeyine sahip B bölgesinin EDS analizi

Elementler (%)								Toplam
C	O	Na	Mg	K	Ca	Cr	Cd	
74,29	19,80	0,82	1,51	0,75	2,45	0,38	0	100,00

4.6.3. SEM ile Cd(II)'nin *Synechocystis* sp. BASO670 izolatına etkisinin belirlenmesi ve EDS analiz sonuçları

10 ppm Cd(II)'ye maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 hücrelerinin taramalı elektron mikroskop görüntüleri incelendiğinde, kontrole nazaran hücrelerin salgıladığı EPS yapıda belirgin bir artış olduğu görülmektedir. Hücre yüzeyleri incelendiğinde kontrole nazaran daha pürüzlü yüzeye sahip hücrelerin sıklığı dikkati çekmektedir (Resim 4.5).



Resim 4.5. Cd(II)'ye maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 hücrelerinin SEM görüntüleri (X10 000)

Cd(II)'ye maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının EPS'nin yoğun olduğu A ve pürüzlü hücre yüzeyine sahip B ile işaretlenmiş bölgelerden EDS ile elementel analizleri yapılmıştır. Analiz sonuçlarına göre EPS' nin yoğun olduğu A bölgesinde, görülen elementlerden % 18,11'inin; pürüzlü hücre yüzeyine sahip B bölgesinde ise % 2,03'ünün Cd(II) olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.8, 4.9). SEM görüntüleri incelendiğinde A bölgesinin B'ye göre daha yoğun EPS ile kaplı olduğu dikkati çekmektedir. EPS'nin yoğun olduğu bu kısmın EDS analizinde daha yüksek oranda Cd(II) tuttuğunu göstermiştir. A ve B bölgesinde yüksek miktarda C ve O elementlerinin yanı sıra eser miktarlarda Na, Mg, K ve Ca elementlerine rastlanmıştır. Her iki bölgede de Cr(VI)'ya rastlanmamıştır. Elde edilen EDS sonuçlarına göre EPS' nin metal alınımındaki önemi kanıtlanmıştır.

Çizelge 4.8. Cd(II)'ye maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının hücrelerinin EPS'nin yoğun olduğu A bölgesinin EDS analizi

Elementler (%)								
C	O	Na	Mg	K	Ca	Cr	Cd	Toplam
36,18	39,32	2,24	1,26	1,00	1,89	0	18,11	100,00

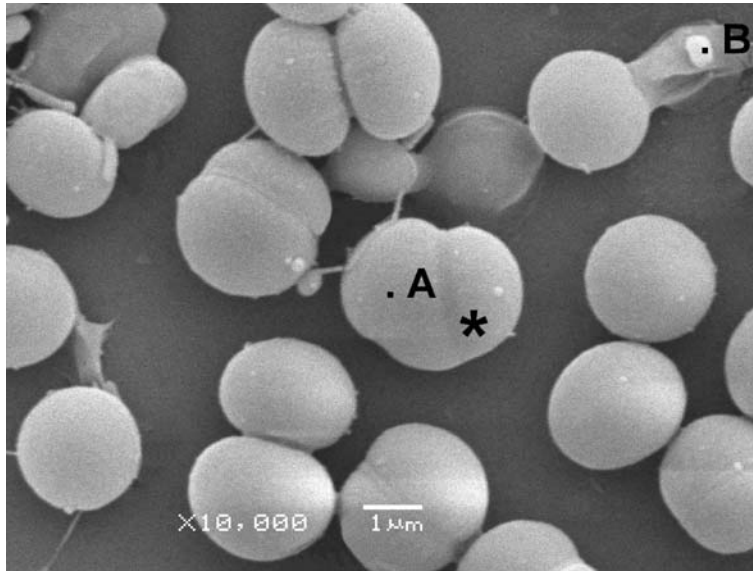
Çizelge 4.9. Cd(II)'ye maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının pürüzlü hücre yüzeyine sahip B bölgesinin EDS analizi

Elementler (%)								
C	O	Na	Mg	K	Ca	Cr	Cd	Toplam
61,06	31,20	2,66	1,01	1,00	1,04	0	2,03	100,00

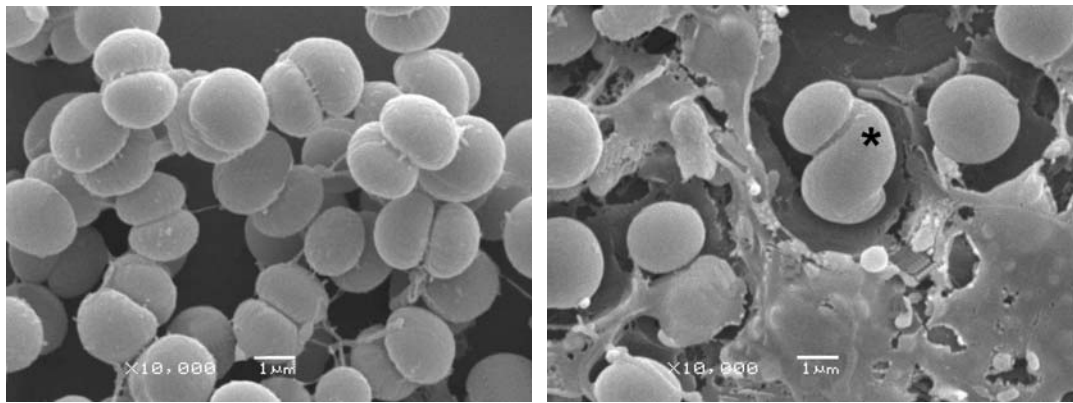
4.6.4. SEM ile Cr(VI) ve Cd(II) ağır metal karışımının *Synechocystis* sp. BASO670 izolatına etkisinin belirlenmesi ve EDS analiz sonuçları

10 ppm Cr(VI) ve 10 ppm Cd(II) metal karışımlarına maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 hücrelerinin taramalı elektron mikroskop görüntüleri incelendiğinde, hücre morfolojilerinde sarmal ve üçlü yapılar gibi belirgin anormalliklerin olduğu görülmektedir. Anormallikler, metallere bağlı olarak hücrelerin normal hücreler gibi

tam olarak bölünememesinden kaynaklanmıştır. Morfolojik anormalliklerin metallere kaynaklandığı düşünülerek EDS analizleri anormalliklerin olduğu ve EPS'nin yoğun olduğu bölgeden yapılmıştır. Resim 4.6 ve 4.7'de her iki anormallik de '*' ile işaretlenerek gösterilmiştir. Kontrole göre Cr(VI)+Cd(II) metal karışımına maruz kalan hücrelerin EPS miktarında artış görülmüştür (Resim 4.7).



Resim 4.6. Cr(VI) ve Cd(II)'ye maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 hücrelerinin SEM görüntüleri (X10 000)



Resim 4.7. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının Cr(VI) ve Cd(II)'ye maruz kalan hücrelerinin (sağ), kontrol hücrelere (sol) göre EPS miktarındaki artışa ait SEM görüntüleri (X10 000)

Metal karışımına maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının anormal hücre yüzeyine sahip A ve EPS'nin yoğun olduğu B ile işaretlenmiş bölgelerden enerji

dağıtımli X-ışını analizörü ile elementel analizleri yapılmıştır. Analiz sonuçlarına göre bölünme bozukluğundan kaynaklanan üçlü yapıya sahip A bölgesinde, görülen elementlerden % 0,18'inin Cr(VI) ve % 8,07'sinin Cd(II); B bölgesinde ise % 0,14'ünün Cr(VI) ve % 11,76'sının Cd(II) olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.10, 4.11). B bölgesinin EPS'nin yoğun olduğu kısım olduğu dikkati çekmektedir. EDS analizinde de bu kısmın daha fazla Cd(II) tuttuğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre metal karışımına maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatu Cd(II)'yi Cr(VI)'ya nazaran daha çok tercih etmiştir. A ve B bölgesinde yüksek miktarda C ve O elementlerinin yanı sıra eser miktarlarda Na, Mg, K ve Ca elementlerine rastlanmıştır. Biyobirikim sonuçlarında da izolata karışık metal uygulandığında Cd(II)'nin hücre yüzeyinde daha çok toplandığı tespit edilmişti (Şekil 4.66). EDS sonuçları biyobirikim sonuçlarını doğrulamaktadır.

Çizelge 4.10. A bölgesindeki morfolojik anormalliğe sahip hücrenin Cr(VI) ve Cd(II) metal karışımı bakımından EDS analiz sonuçları

Elementler (%)								Toplam
C	O	Na	Mg	K	Ca	Cr	Cd	
51,88	28,76	4,60	1,71	1,20	3,60	0,18	8,07	100,00

Çizelge 4.11. EPS'nin yoğun olduğu B bölgesinde Cr(VI) ve Cd(II) metal karışımı bakımından EDS analiz sonuçları

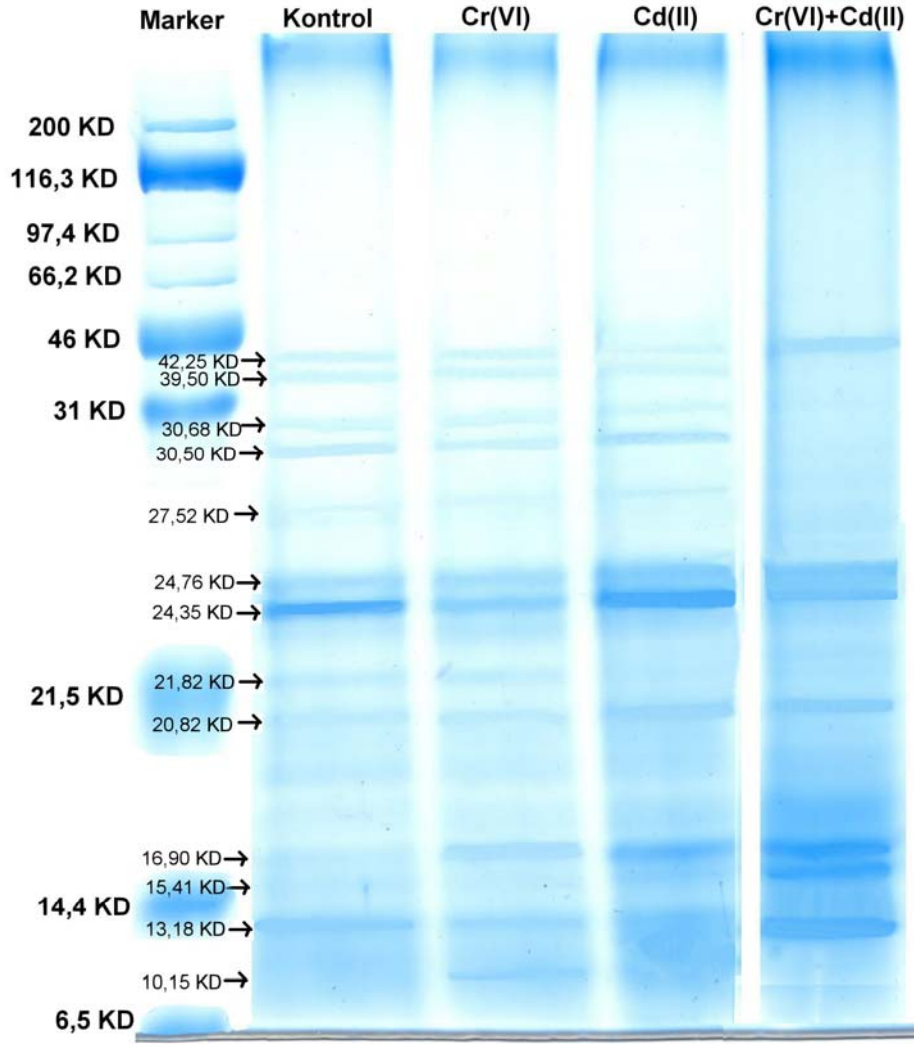
Elementler (%)								Toplam
C	O	Na	Mg	K	Ca	Cr	Cd	
42,19	32,38	5,61	1,99	0,47	5,46	0,14	11,76	100,00

4.7. Cr(VI), Cd(II) Ve Cr(VI)+Cd(II) Ağır Metallerine Maruz Kalan *Synechocystis* sp. BASO670 İzolatının Ve Kontrol Hücrelerinin Protein Profillerine Etkisi

Biyobirikim çalışmaları ile aynı şartlarda inkübasyona bırakılmış, Cr(VI), Cd(II) metallerine ve Cr(VI)+Cd(II) metal karışımlarına maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının protein profilleri incelenerek, kontrol hücrelerin protein profilleri ile mukayese edilmiştir.

Protein profilleri için; kontrol, 10 ppm Cr(VI), 10 ppm Cd(II) ve 10 ppm Cr(VI)+Cd(II) olmak üzere 4 farklı kültür hazırlanmıştır. Kontrol olarak kullanılan hücre kültürleri ağır metal içermemektedir. 7 gün inkübasyona bırakılan kültürlerde, *Synechocystis* sp. BASO670 hücrelerinin proteinleri çıkarılarak SDS-PAGE jeldeki protein profillerinde meydana gelen değişiklikler incelenmiştir.

Synechocystis sp. BASO670 izolatının Cr(VI)'ya maruz kalan hücrelerinin protein profilleri kontrol ile mukayese edildiğinde, 10,15 KD büyüklüğünde farklı bir protein sentezlendiği, 16,09 KD'luk proteinin miktarında artış, 24,35 KD'luk proteinin miktarında ise azalma olduğu dikkati çekmektedir. Cd(II)'ye maruz kalan hücrelerin protein profilleri kontrol ile mukayese edildiğinde, 16,09 ve 24,35 KD'luk proteinlerin miktarlarının arttığı, 21,82 KD'luk proteinin ise tamamen ortadan kaybolduğu görülmektedir. Cr(VI) ve Cd(II) metal karışımına maruz kalan hücrelerin protein profilleri kontrol ile mukayese edildiğinde ise, 13,18, 15,41, 16,09, 20,82 ve 42,25 KD'luk proteinlerin miktarlarında artış, 24,35 KD'luk proteinin miktarında azalma olduğu ve 21,82, 27,52, 30,50, 30,68 ve 39,50 KD'luk proteinlerin tamamen kaybolduğu tespit edilmiştir. Cr(VI)'ya maruz kalan hücrelerde olduğu gibi metal karışımına maruz kalan hücrelerde de 10,15 KD büyüklüğünde farklı bir protein sentezlendiği ancak miktarının Cr(VI)'dakinden daha az olduğu dikkati çekmektedir (Resim 4.8).



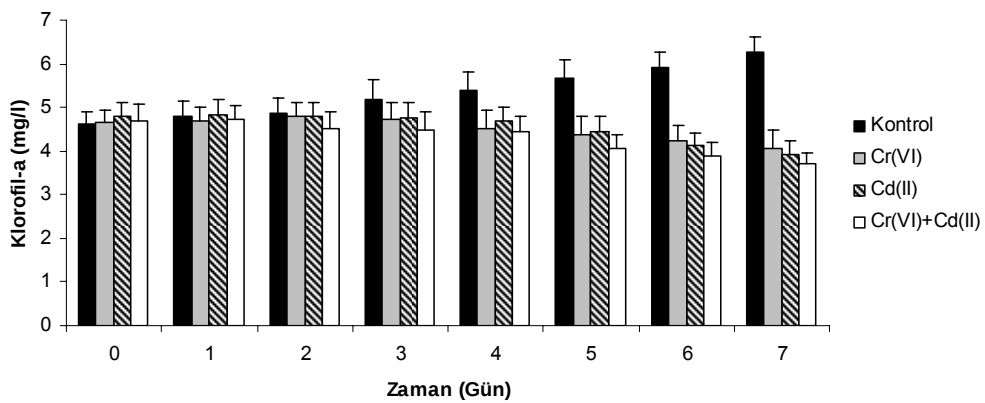
Resim 4.8. Cr(VI), Cd(II) ve Cr(VI)+Cd(II)'ye maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının ve kontrol hücrelerin toplam protein profillerinin SDS-PAGE jel görüntüleri

Synechocystis sp. BASO670 izolatının metallere maruz kalan hücrelerinin protein profilleri incelendiğinde, protein profillerine Cr(VI) ve Cd(II) metal karışımının tek başına Cr(VI) ve Cd(II)' den daha çok etki gösterdiği dikkati çekmektedir. Metal karışımına maruz kalan hücreler, kontrol hücreler ile karşılaştırıldığında bazı proteinlerinin kaybolduğu görülmektedir. Bununla birlikte kontrol hücrelerde olmayan ve sadece Cr(VI) ve metal karışımına maruz kalan hücrelerde farklı bir protein sentezlendiği tespit edilmiştir.

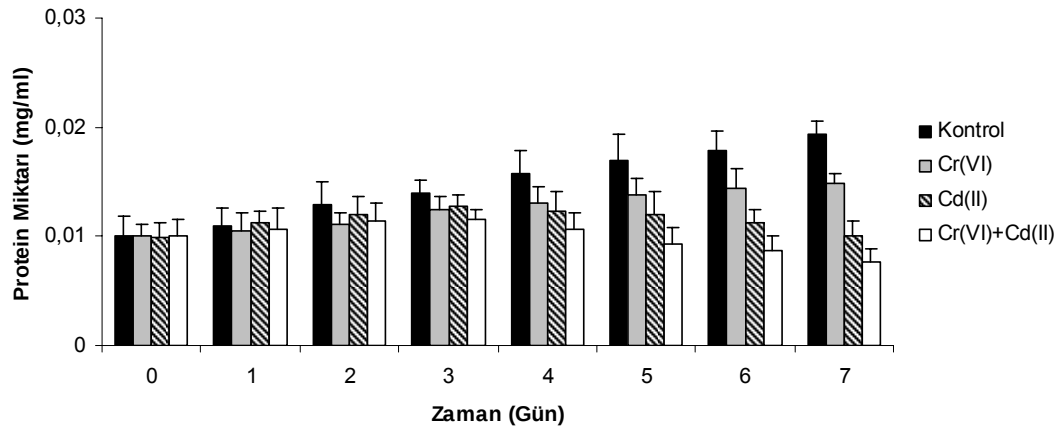
4.8. Metalli Ve Kontrol Ortamlarında Geliştirilmiş *Synechocystis* sp. BASO670 İzolatının Tiyol Miktarlarının Belirlenmesi

Kültürler biyobirikim çalışmaları ile aynı şartlarda 7 gün boyunca farklı metal ve karışımlarına (10 ppm Cr(VI), 10 ppm Cd(II) ve 10'ar ppm Cr(VI)+Cd(II)) maruz bırakılmışlardır. 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmış kültürlerden 24 saatte bir numune alınarak klorofil-a miktarı, protein miktarı ve sülfidril grubu içeren toplam tiyollerin (TT), proteine bağlı olan tiyollerin (PBT) ve proteine bağlı olmayan tiyollerin (PBOT) miktarları tespit edilerek kontrol hücreler ile mukayese edilmiştir. Klorofil-a ve protein miktarları canlılığı ve biyokütle miktarındaki değişikliği belirlemek için tespit edilmiştir. Deneyler üç paralelli olarak düzenlenmiş, sonuçlar ortalama değer olarak verilmiştir.

7. günün sonunda farklı metal ve karışımlarına maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının klorofil-a ve protein miktarlarında kontrole göre bir azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.68 ve 4.69). Klorofil-a miktarlarında standart sapma $SS \pm 0,3-0,4$ arasında ve protein miktarlarında ise $SS \pm 0,001-0,003$ arasında değişmektedir.

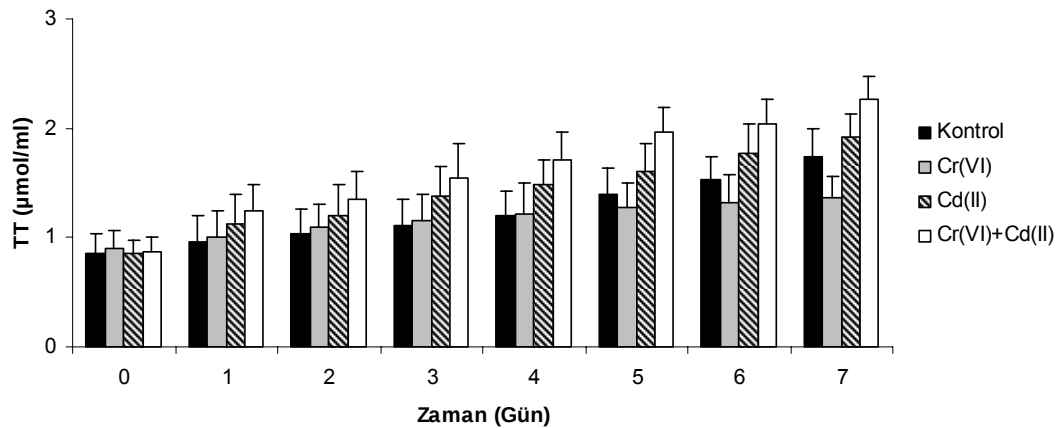


Şekil 4.68. Cr(VI), Cd(II) ve Cr(VI)+Cd(II) karışımına maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının ve kontrol hücrelerin klorofil-a miktarları



Şekil 4.69. Cr(VI), Cd(II) ve Cr(VI)+Cd(II) karışımına maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının ve kontrol hücrelerin protein miktarları

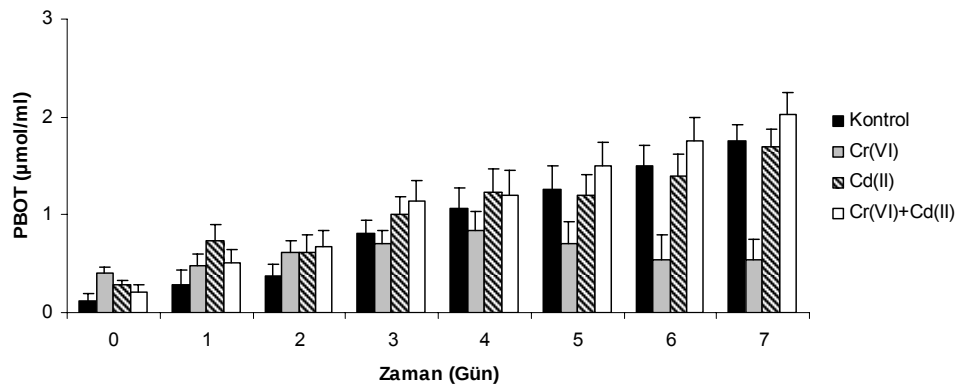
Farklı metaller ve karışımına maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının toplam tiyol miktarlarında 1. günden itibaren Cd(II) ve Cr(VI)+Cd(II) karışımında kontrole göre artış olduğu tespit edilmiştir. Cr(VI)'ya maruz kalan hücrelerin toplam tiyol miktarlarının kontrole göre 4. güne kadar arttığı, 4. günden itibaren ise azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.70). SS $\pm 0,1-0,3$ arasında değişmektedir.



Şekil 4.70. Cr(VI), Cd(II) ve Cr(VI)+Cd(II) karışımına maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının ve kontrol hücrelerin toplam tiyol miktarları

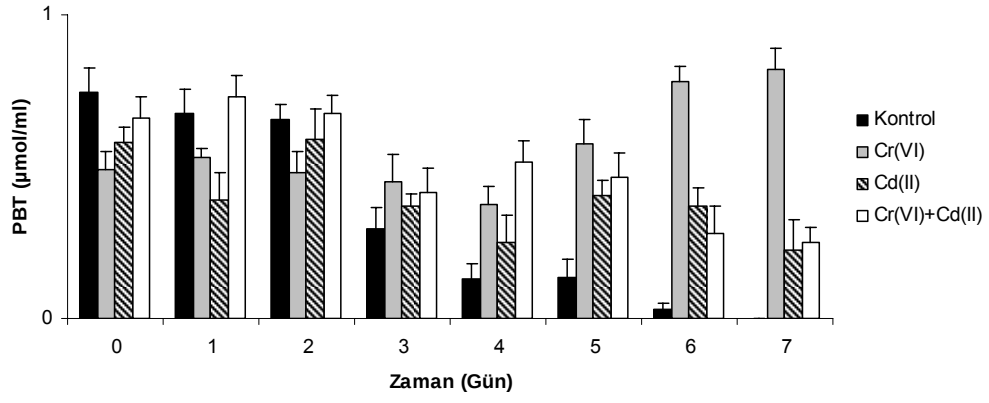
Farklı metaller ve karışımına maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının proteine bağlı olmayan tiyol miktarları kontrole karşılaştırıldığında, 3. güne kadar

artış olduğu gözlenmiştir. 3. günden itibaren Cr(VI) ve Cd(II) uygulanmış hücrelerde kontrole göre proteine bağlı olmayan tiyol miktarlarında kontrole göre dikkate değer bir artış belirlenmez iken, Cr(VI)'ya maruz kalan hücrelerde 5. günden itibaren proteine bağlı olmayan tiyol miktarlarında düşme görülmüştür. Cr(VI)+Cd(II) metal karışımına maruz kalan hücrelerde ise 1. günden 7. güne kadar kontrole göre belirgin bir artış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.71). $SS \pm 0,1-0,3$ arasında değişmektedir.



Şekil 4.71. Cr(VI), Cd(II) ve Cr(VI)+Cd(II) karışımına maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının ve kontrol hücrelerin proteine bağlı olmayan tiyol miktarları

Farklı metaller ve karışımına maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının proteine bağlı tiyol miktarları 3. günden itibaren 7. güne kadar kontrole göre proteine bağlı tiyol miktarlarında artış olduğu tespit edilmiştir. Kontrol hücrelerde bulunan proteine bağlı tiyol miktarları 1. günden itibaren 7. güne kadar azalmış, 7. günde tamamen kaybolmuştur. En yüksek artışın Cr(VI)'ya maruz kalan hücrelerde olduğu dikkati çekmektedir (Şekil 4.72). $SS \pm 0,02-0,1$ arasında değişmektedir.



Şekil 4.72. Cr(VI), Cd(II) ve Cr(VI)+Cd(II) karışımına maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının ve kontrol hücrelerin proteine bağlı tiyol miktarları

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllarda sanayinin gelişmesi ile birlikte çevreye bırakılan atıklar gün geçtikçe artmakta ve bu atıklar arasında çevreye ve çevrenin vazgeçilmez parçası olan canlılara yüksek oranda zarar veren ağır metaller bulunmaktadır. Bu metaller de çeşitli şekillerde hücrelerde birikmekte ve belirli dozların üzerinde toksik olup ölümlere yol açmaktadır. Bu nedenle, ağır metallerin bilinçsizce çevreye atılması engellenmeli veya kontrol altına alınmalıdır. İyon değişimi, kimyasal çöktürme ve ters ozmoz gibi geleneksel yöntemler pahalı ve etkisiz olup, ağır metallerin çok az bir miktarını gidermektedir. Ayrıca, bu yöntemler ağır metallerin tamamını gideremediği gibi, zararlı başka ikincil bileşikler meydana getirmektedirler. Ağır metal içeren atık sular, çevreye verilmeden önce arıtılmalı ve su standartlarına göre izin verilen kirlilik değerlerinin altına düşürülmelidir [Saeed ve Iqbal, 2003].

Günümüzde, daha önceden kullanılan klasik yöntemlere alternatif olarak daha ekonomik ve pratik, canlı (biyobirim) ve ölü (biyosorpsiyon) mikrobiyal biyokütle ile ağır metallerin giderimi önem kazanmıştır. Biyosorpsiyon ve biyobirikimle ile metallerin giderilmesi, hücre duvarı ile metal arasındaki etkileşimin sonucundan kaynaklandığı ileri sürülmektedir [Srinath ve ark., 2002]. Metal iyonları, hücre yüzeyindeki reaksiyon alanları (hücre duvarındaki proteinlerin fonksiyonel gruplarına ve peptid bağları) ile kompleks yaparak adsorblanabildikleri gibi bazı mikroorganizmalar ekzopolisakkarit yapıda polimerler sentezleyerek çözeltideki metal iyonlarını bağladığı bildirilmektedir [Liu ve ark., 2001]. Bazı mikroorganizmalar ise hem metali tutmak hem de toksik etkisini azaltmak için düşük moleküler ağırlığa sahip metallotiyonein proteinlerini sentezlendiği belirlenmiştir [İleri, 2000].

Ağır metallerin gideriminde en çok kullanılan mikroorganizmalar küfler, mayalar ve alglerdir [Gupta ve ark., 2001; Krheminska ve ark., 2005]. Siyanobakteriler, geniş hücre yüzeyine sahip olmaları, yoğun bir musilaj tabaka ile kaplı olmaları ve çok az besinle yetinebilmelerinden dolayı, ağır metal gideriminde ön plana çıkmaktadır [El-

Enany ve Issa 2000; Rangsayatorm ve ark., 2002; Chojnacka ve ark., 2004; El-Sheekh ve ark., 2005; Anjana ve ark., 2007].

Biyolojik materyaller ağır metal giderimi açısından seçici olup, bulunduğu ortam da önemli rol oynamaktadır [Prakasham ve ark., 1999]. Habitat olarak siyanobakteriler, diğer fotosentetik prokaryotlara göre su, tatlı su ve toprak gibi alglerin de gelişmesi için uygunluk gösteren çevrelerde ve aynı zamanda, fotosentetik ökaryotların hiç bulunmadığı ortamlarda da gelişebilme kabiliyeti sayesinde, daha geniş bir habitata sahiptirler. Ayrıca, çevre koşullarına çok dayanıklı olup, hemen hemen bütün sucul ve kuru çevrelerde bulunabilmektedir [Prescot, 1990]. Çok farklı çevre koşullarında gelişebilmesi ve ağır metal gideriminde de başarılı sonuçlar vermesi nedeni ile bu tez çalışmasında siyanobakterilerin çalışılması hedeflenmiştir.

Tatlısularda çok yoğun bulunması, kolay izole edilebilir olması ve daha hızlı üretilmesi açısından ipliksi siyanobakterilere nazaran tek hücreli siyanobakteriler tercih edilmiştir. Mogan Gölü, Kurtboğazı Barajı, Uncalı Deresi, Bafa Gölü, Hatim Çayı, Harikalar Diyarı Göleti ve Kızılırmak Nehri'nden alınan su örneklerinin tamamından 15 adet siyanobakter izolatı izole edilmiş, izolatlar morfolojileri ve bölünme fizyolojilerine göre tanımlanmış ve hepsinin *Synechocystis* cinsine ait olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan izolatlar 16S rDNA'larına göre de moleküler düzeyde tanımlanmış, NCBI Gen Bankası'ndaki sekanslarla karşılaştırma sonucunda hepsinin *Synechocystis* sp. PCC 6803 izolatına % 97-99 oranında benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. Kaneko ve ark. (1996), *Synechocystis* sp. PCC 6803 izolatının tüm genomu tanımlayarak, bu cinse ait izolatların tatlısularda çok yoğun olarak bulunduklarını bildirmişlerdir [Kaneko ve ark., 1996]. Fotosentez yapabilmeleri, çok az bir maliyetle yoğun olarak üreyebilmeleri, gelişebilmeleri için sadece ışık ve eser miktarda minerallere ihtiyaç duyulması, en önemlisi de bütün genomunun tanımlanmış olmalarından dolayı *Synechocystis* sp. biyoteknolojik çalışmalarda tercih edildikleri bildirilmiştir [Zang ve ark., 2007]. Bütün bu nedenlerden dolayı, bu tez çalışmasında *Synechocystis* sp. izolatları kullanılmıştır.

İzolatlar 12 gün boyunca 5-50 ppm konsantrasyonlardaki Cr(VI) ve Cd(II)'ye maruz bırakılmış, klorofil-a miktarları ve buna bağlı olarak EC₅₀ (mikroorganizmanın % 50'sini öldüren metal konsantrasyonu) değerleri hesaplanmıştır. Araştırmacılar siyanobakter hücrelerinin canlılığının ve biyokütlesinin belirlenmesinde kullanılan en önemli indikatörün klorofil-a miktarları olduğunu bildirmişlerdir [Frank, 2002; Ahn ve ark., 2007]. Ayrıca, stres faktörlerine maruz kalan siyanobakter hücrelerinin biyokütlelerinin ve canlılıklarının tespiti ve diğer çalışmalarla mukayesesi açısından EC₅₀ değerlerinin klorofil-a miktarlarına bağlı olarak hesaplanması daha doğru olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle stres faktörlerinin siyanobakter hücrelerine etkilerini belirlemek ve canlılıklarını tespit etmek için klorofil-a miktarlarına bağlı EC₅₀ değerleri biyoteknoloji çalışmalarında sıkça kullanılmaktadır (Gregor ve ark., 2008). Bu çalışmada Cr(VI) ve Cd(II) metalleri, hücrelerin canlılıkları açısından toksik etki oluşturduğu için kontrol hücrelere göre metallere maruz kalan hücrelerin klorofil-a miktarlarında azalma olduğu görülmüştür. Ancak, 5-50 ppm Cr(VI) ve Cd(II) konsantrasyonlarına maruz kalan siyanobakter izolatları arasında en yüksek doz olan 50 ppm'de her iki metalde de bir tek *Synechocystis* sp. BASO670 izolatı, 12 gün boyunca canlılığını korumuştur. Aynı cins olmasına rağmen izolatların EC₅₀ değerleri farklılık göstermiştir. Aynı cinse ait izolatlar normal besiyortamında dahi farklılıklar göstermektedirler. Metale maruz kalan aynı cinse ait izolatların metallere karşı davranışları farklı olmaktadır. Aynı cinse ait bazı izolatlar ekzopolisakkarit üretimini artırarak, bazıları protein konfigürasyonunda farklılıklar meydana getirerek bazıları ise tiyol üretimlerini artırarak metali detoksifiye ettiği bilinmektedir. Bazı izolatlar hepsini birden kullanabilir veya hiçbirini tercih etmeyebilirler [Zalups ve Ahmad, 2003; Leao ve ark., 2007]. Hameed ve Hasnain (2005), Cr(VI)'ya dirençli iki *Synechocystis* izolatının Cr(VI)'ya dirençliliklerinin farklı olduğunu bildirmişlerdir [Hameed ve Hasnain, 2005]. Metal detoksifikasyonu için önemli bir diğer faktör de, daha önceden metalli ortama maruz kalan izolat, metalli ortama maruz kalmayandan daha uzun süre canlılığını koruduğu bilinmektedir [Sun ve Shao, 2007].

Diğer izolatlar arasında en yüksek EC₅₀ değeri *Synechocystis* sp. BASO670'de belirlenmiştir. Bu izolatın Cr(VI) için EC₅₀ değeri 11,5 ppm, Cd(II) için de 15,3 ppm

olduğu tespit edilmiştir. Bundan sonraki canlı kültür çalışmalarında 10 ppm Cr(VI) ve Cd(II) uygulanırken, tüm çalışmalarda her iki metale de diğer izolatlara göre daha dirençli olması nedeniyle *Synechocystis* sp. BASO670 izolatı kullanılmıştır. Türk Standartları Enstitüsü, Dünya Sağlık Örgütü ve ABD Çevre Koruma ajansı, içme sularında bulunabilecek Cr(VI)'nın maksimum değerinin 0,05 ppm, Cd(II)'nin ise 0,005 ppm olması gerektiğini rapor etmişlerdir. Bu dozların üzeri canlılar açısından toksik olup ciddi sorunlara yol açtığı bildirilmiştir [Zouboulis ve ark., 2004]. Bu açıdan bakıldığında *Synechocystis* sp. BASO670'in Cr(VI) ve Cd(II) için EC₅₀ değerleri izin verilen değerlerin üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının atık sulardan ağır metallerin gideriminde kullanılarak, biyoteknolojik açıdan avantaj sağlayacağı düşünülmüştür.

Chen ve ark. (2003), *Chlorella pyrenoidosa*, *Synechococcus* sp., *Spirulina maxima*, *Spirulina platensis*, *Selenastrum capriornutum* ve *Scenedesmus quadricauda* olmak üzere 6 adet mikroalgi Cr(VI)'ya maruz bırakmışlar ve Cr(VI)'nın her bir mikroalg için EC₅₀ değerini sırasıyla (*C. pyrenoidosa*) 4,96 ppm, (*Synechococcus* sp.) 6,50 ppm, (*S. maxima*) 11,16 ppm, (*S. platensis*) 11,74 ppm, (*S. capriornutum*) 12,43 ppm ve (*S. quadricauda*) 20,89 ppm olarak tespit etmişler ve Cr(VI) toleranslarının *Scenedesmus quadricauda* > *Selenastrum capriornutum* > *Spirulina platensis* > *Spirulina maxima* > *Synechococcus* sp. > *Chlorella pyrenoidosa* olduğunu bildirmişlerdir [Chen ve ark., 2003]. Satoh ve ark. (2005), *Synechococcus* sp. için Cd(II)'de EC₅₀ değerinin 5,4 ppm, Rangsayatorm ve ark. (2002), *Spirulina platensis* için Cd(II)'de EC₅₀ değerinin 14,7 ppm olduğunu tespit etmişlerdir [Rangsayatorm ve ark., 2002; Yap ve ark., 2004; Satoh ve ark., 2005]. Diğer çalışmalarda kullanılan siyanobakterilerin EC₅₀ değerleri ile karşılaştırıldığında, *Synechocystis* sp. BASO670 izolatı Cr(VI) ve Cd(II)'ye diğer çalışmalarda kullanılan izolatların birçoğundan daha çok direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

Araştırmacılar metallere dirençli izolatların metal giderim kapasitelerinin de yüksek olduğunu bildirmişlerdir [Ahuja ve ark., 2001; Srinath ve ark., 2001; Sun ve Shao, 2007]. Bu nedenle bu çalışmada Cr(VI) ve Cd(II)'ye diğer izolatlardan daha çok dirençli olan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının cansız, tutuklanmış cansız ve

tutuklanmış canlı formları kullanılarak, Cr(VI) ve Cd(II) biyosorpsiyonu denenmiştir. Biyosorpsiyon çalışması için pH, biyokütle, sıcaklık, metal konsantrasyonları ve zaman gibi parametreler denenerek biyosorpsiyon için en uygun şartlar tespit edilmiştir.

Birçok araştırmacı tarafından metal iyonlarının biyosorpsiyonuna çözeltinin pH'sının önemli etkisinin olduğu vurgulanmaktadır [Kiran ve ark., 2007; Anjana ve ark., 2007]. Cr(VI) biyosorpsiyonunda pH önemli bir faktör olup, pH'nın biyosorpsiyona etkisi elektrostatik güçler, iyon değişimi ve kimyasal komplikasyon gibi mekanizmalar ile gerçekleşmektedir. Cr(VI) biyosorpsiyonunun asidik pH'da gerçekleşmektedir. Bunun nedeni biyomateriyalin yüzeyindeki pozitif yüklü gruplar ile HCrO_4^- iyonları arasındaki elektrostatik harekettten kaynaklanmaktadır. pH'nın yükselmesi ile biyosorpsiyondaki düşüş anyonik yapıdaki Cr(VI)'nın OH^- iyonları ile rekabet edememesinden kaynaklanmaktadır [Cimino ve ark., 2000; Gode ve Pehlivan, 2005].

Metal içeren sular ve atık sularda pH farklılık gösterdiğinden *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının cansız, tutuklanmış canlı ve cansız hücrelerinin Cr(VI) ve Cd(II) biyosorpsiyonu için çeşitli pH'lar denenmiştir. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının her üç formunun da Cr(VI) biyosorpsiyonu için en iyi pH'nın 2, Cd(II) biyosorpsiyonu için de pH'nın 7 olduğu tespit edilmiştir.

Synechocystis sp. BASO670 izolatının cansız hücreleri pH 2'de 100 ppm Cr(VI)'nın yaklaşık % 32'sinin adsorplandığı tespit edilmiştir. pH 3 ve 4'de adsorplanan Cr(VI) miktarının düştüğü, pH 5'de ise tekrar bir miktar arttığı gözlenmiştir. pH 5'deki artışın hücre yüzeyindeki bazı grupların bu pH' da aktive olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Aynı dalgalanma başka araştırmacıların çalışmalarında da gözlenmiştir. Gardea-Torresdey ve ark. (1997), *Synechococcus* sp. PCC 7942 izolatının Cr(VI) giderimini incelemişler, elde ettikleri sonuçlara göre en yüksek alınımlar pH 2'de gözlenmiştir. pH 3 ve 4'de alınımların düştüğünü ancak, pH 5'de tekrar arttığını tespit etmişlerdir [Gardea-Torresdey ve ark., 1997]. Anjana ve ark. (2007), *Chroococcus* sp. HH-11 izolatının Cr(VI) gideriminde pH'nın etkisini incelemişler,

pH 1’de 20 ppm’lik Cr(VI)’nın yaklaşık % 40’ını adsorbe ettiğini, pH 2’de adsorpsiyonun % 30’a düştüğünü ve pH 3’de tekrar yükselerek adsorpsiyonun yaklaşık % 60’a çıktığını bildirmişlerdir [Anjana ve ark., 2007].

pH’nın Cr(VI) ve Cd(II) biyosorpsiyonuna etkisi birçok araştırmacı tarafından çalışılmış ve deneylerinde kullandıkları mikroorganizmaların biyosorpsiyonu için en uygun pH’ları rapor etmişlerdir. Dönmez ve ark. (1999), *Synechoscystis* sp. ile yaptıkları çalışmada en yüksek Cr(VI) biyosorpsiyonunun pH 2’de; Chojnacka ve ark. (2005), *Spirulina* sp.’nin pH 5’de; Anjana ve ark. (2007), *Nostoc calcicola* HH-12 ve *Chroococcus* sp. HH-11’in pH 3’de; Gardea-Torresdey ve ark. (2002), *Synechococcus* sp. PCC 7942’in pH 2’de gerçekleştiğini rapor etmişlerdir [Dönmez ve ark., 1999; Gardea-Torresdey ve ark., 2002; Chojnacka ve ark., 2005; Anjana ve ark., 2007]. Chojnacka ve ark. (2005) hücre yüzeyinde bulunan metal bağlama bölgelerinin (karboksil, fosfat ve hidroksil-veya amin grupların) yüksek oranda pH’ya bağlı olarak işlev gördüğünü belirtmişlerdir [Chojnacka ve ark., 2005].

Siyanobakteriler ile yapılan Cr(VI) giderim çalışmaları göstermiştir ki, Cr(VI) biyosorpsiyonunda uygun pH, 3 ve 3’ün altındadır ve bu sonuçlar da bizim çalışmamızı doğrulamaktadır. Kiran ve ark. (2007), siyanobakterilerin Cr(VI)’yı pH 2-3 arasında yüksek miktarlarda adsorplamasının nedeninin düşük pH’larda hücre yüzeylerinin pozitif yüklenmesinden kaynaklandığını rapor etmişlerdir [Kiran ve ark., 2007]. Syanobakter biyokütlesinin pH 2-3’deki izoelektrik noktasından dolayı, fonksiyonel grupların protonlaşması, hücre yüzeylerindeki bağlanma bölgelerinde hidrojen iyonlarının bulunması Cr(VI)’nın bağlanma bölgelerine adsorpsiyonunu sağladığı bildirilmiştir [Crist ve ark., 1981; Dönmez ve Aksu, 2002]. pH’nın artması ile birlikte hücre duvarındaki fonksiyonel gruplar negatif yüklendiği için Cr(VI) adsorpsiyonu da düşmektedir. Düşük pH, H iyonu artışına neden olarak ortamı asidik hale getirmekte ve canlı mikroorganizmalar için stres faktörü oluşturmaktadır. Diğer mikroorganizmalar gibi siyanobakteriler de pH değişimlerinden etkilenmektedirler. Bu nedenle Cr(VI) biyosorpsiyonunda özellikle cansız veya tutuklanmış hücrelerin kullanımı avantaj sağlamaktadır.

Cd(II) biyosorpsiyonu ile yapılan diğer çalışmalarda ise pH 5-7 arasında değişmektedir. Saeed ve Iqbal (2006), tutuklanmış *Synechococcus* sp. ile yaptıkları çalışmada en yüksek Cd(II) biyosorpsiyonunun pH 5'de; Seker ve ark. (2007), *Spirulina platensis*'in pH 6'da; Katırcıoğlu ve ark. (2007), *Oscillatoria* sp. H1'in pH 6'da; Chojnacka ve ark. (2005), *Spirulina* sp.'nin pH 7'de gerçekleştiğini rapor etmişlerdir [Saeed ve Iqbal, 2006; Seker ve ark., 2007; Katırcıoğlu ve ark., 2007; Chojnacka ve ark., 2005]. Düşük pH'larda hidrojen iyonları ile metal iyonları rekabete girerek siyanobakterilerin hücre yüzeyini pozitif yüklenmesine neden olmaktadır. Bu nedenle Cd(II) gibi pozitif yüklü olan metallerin hücre yüzeyine tutunması engellenmektedir. pH yükseldikçe ortamdaki OH iyonları artmakta ve bu iyonların hücre yüzeyine tutunması ile negatif yüklü hale gelmektedir. Böylece pozitif yüklü olan Cd(II) iyonları hücre yüzeyine rahatlıkla tutunabilmektedirler [Garg ve ark., 2007; Kazemipour ve ark., 2008; Zheng ve ark., 2008]. Siyanobakterilerin normal gelişme ortamlarının pH 7,1-7,5 olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, pH 7'de Cd(II) biyosorpsiyonunda cansız veya tutuklanmış hücrelerinin kullanımının yanı sıra sadece canlı hücrelerin de kullanımı mümkün olmaktadır.

Cr(VI) ve Cd(II) biyosorpsiyonunda pH'ya bağlı cansız hücrelere nazaran tutuklanmış hücrelerin daha yüksek miktarlarda metal adsorpladığı tespit edilmiştir. En yüksek adsorpsiyon tutuklanmış cansız hücrelerde görülmüş olup, Cd(II) metali Cr(VI) metaline göre daha yüksek miktarlarda adsorplanmıştır.

Synechocystis sp. BASO670 izolatının cansız, tutuklanmış cansız ve tutuklanmış canlı biyokütlelerinin miktarlarının Cr(VI) ve Cd(II) ağır metallerinin biyosorpsiyonuna etkisi araştırılmış ve denemelerde 0,03-0,1 g cansız biyokütle ve 10-60 küre tutuklanmış materyal kullanılmıştır. Cansız örneklerde 0,05 g biyokütleyle kadar Cr(VI) alınımında 0,08 g biyokütleyle kadar ise Cd(II) alınımında artış olduğu ve sonrasında sabitlendiği tespit edilmiştir. Bu durum özellikle cansız biyokütleler için karakteristik olup, biyokütle yüzeyindeki bağlanma bölgelerinin doygunluğa ulaşması ile açıklanmaktadır [Karthikeyan ve ark., 2007]. Doygunluk, biyokütle artışı ile metal bağlanma bölgelerinin birbirinin üzerine gelmesi veya agregasyon oluşturmaktan kaynaklanmaktadır [Garg ve ark., 2007]. Gupta ve Rastogi (2008),

cansız algal biyokütle kullanarak (*Oedogonium* sp.) Cd(II) biyosorpsiyonunu incelemişler, artan biyokütle dozlarında Cd(II) biyosorpsiyonunun arttığını, ancak bir süre sonra belirli bir dozun üzerinde biyosorpsiyonun sabit kaldığını tespit etmişlerdir [Gupta ve Rastogi, 2008]. Gupta ve Rastogi (2008), Cr(VI) gideriminde biyokütle olarak ipliksi bir siyanobakter olan *Nostoc muscorum*'un cansız biyokütlesi kullanılmış ve belirli bir doza kadar biyokütledeki artışla Cr(VI) alınımında da artış olduğu, fakat bu dozun üzerinde doygunluğa ulaşarak alınımın sabit kaldığını rapor etmişlerdir [Gupta ve Rastogi, 2008]. Abu Al-Rub ve ark. (2004), metal gideriminde az miktarlarda kullanılacak biyokütlenin biyoteknoloji açısından daha çok avantaj sağladığını rapor etmişlerdir. Bu nedenle hem Cr(VI) hem de Cd(II) için, diğer denemelerde 0,05 g cansız biyokütle kullanılmıştır.

Tutuklanmış canlı ve cansız hücrelerin Cr(VI) ve Cd(II) ağır metallerinin biyosorpsiyonunda ise biyokütledeki artışla birlikte adsorplanan Cr(VI) ve Cd(II) miktarlarının da arttığı tespit edilmiştir. Ancak tutuklanmış hücrelerde cansız hücrelerde olduğu gibi biyokütle artışına bağlı olarak bir doygunluk görülmemiştir. Tutuklanmış hücreler içeren düzgün yapılı kürelerde agregasyon olmadığı için, birbirinin üzerine gelerek metal bağlanma bölgelerini de kapanmadığı rapor edilmiştir [Garg ve ark., 2007]. El-Skaily ve ark. (2007), tutuklanmış biyokütledeki artışla birlikte metalin bağlanacağı yüzey alanının ve porların da artacağı için metal giderimi de bu oranda arttığını bildirmişlerdir [El-Skaily ve ark., 2007]. Bu nedenle bu çalışmada tutuklanmış hücrelerin olduğu kürelerin sayısındaki artış ile birlikte metal alınımı da artmıştır. Akhtar ve ark. (2004), *Chlorella sorokiniana*'yı FBCS ve LIBCS ile tutuklayarak nikel(II) giderimini araştırmışlar, LIBCS ile tutuklanmış biyokütledeki artış ile nikel(II) gideriminin de arttığını tespit etmişlerdir. Ancak, FBCS ile tutuklanmış hücrelerin nikel gideriminin 1 g biyokütle dozuna kadar artarken, bu dozdan itibaren bir miktar azaldığı rapor edilmiştir. Araştırmacılar nikel giderimindeki bu düşüşün nedeninin tutuklanmış hücrelerin agregasyon oluşturmamasından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir [Akhtar ve ark., 2004].

Bu çalışmada, Cr(VI) ve Cd(II) biyosorpsiyonunda biyokütle miktarına bağlı olarak cansız hücrelere nazaran tutuklanmış hücrelerin daha yüksek miktarlarda metal

adsorpladığı tespit edilmiştir. En yüksek adsorpsiyon tutuklanmış cansız hücrelerde görülmüş olup, Cd(II) metali Cr(VI) metaline göre daha yüksek miktarlarda adsorplanmıştır. Tutuklanmış hücrelerdeki metal adsorpsiyonunun yüksek olması, tutuklama ajanı olarak kullanılan Ca-aljinattan ve kürelerin sayısının artması ile içindeki biyokütlenin de artmasından kaynaklanmaktadır. Ca-aljinat içersine hapsolan hücreler için çok büyük bir yüzey alanı oluşturarak, metallerin kolayca tutunacağı bir ortam sağlamaktadır. Bütün biyosorpsiyon denemelerinde, gerek izolatların uzun sürede üretilmeleri gerekse de tutuklanma işleminde kullanılan yoğun miktarlarda canlı ve cansız biyokütle gereksiniminden dolayı 30'ar küre kullanılmıştır.

Metal biyosorpsiyonu enerjiye bağımlı bir mekanizma olduğu için biyosorpsiyon çalışmalarında ortamın sıcaklığı önem kazanmaktadır. Adsorpsiyon mekanizmasının bir çoğu ekzotermik iken [Sharma ve ark., 1990], endotermik adsorpsiyonların olduğunu rapor eden literatürler de bulunmaktadır [Sharma, 2003]. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının cansız, tutuklanmış canlı ve cansız biyokütlelerinin çeşitli sıcaklıklar denenerek (20-40 °C) ortam sıcaklığının Cr(VI) ve Cd(II) ağır metallerinin biyosorpsiyonuna etkisi araştırılmış ve bütün denemelerde optimum biyosorpsiyonunun 25 °C'de gerçekleştiği, 25 °C üzeri sıcaklıklarda ise düştüğü tespit edilmiştir. Dönmez ve ark. (1990), *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* ve *Synechoscystis* sp. ile Cr(VI) gideriminde optimum sıcaklığın 25 °C olduğunu rapor etmişlerdir [Dönmez ve ark., 1990]. Gupta ve Rastogi (2008), *Oedogonium* sp. ile; Şeker ve ark. (2007), *Spirulina platensis* ile; Sarı ve Tuzen (2007), *Ulva lactuca* ile Cd(II) gideriminde optimum biyosorpsiyonun olduğu sıcaklık 25 °C olarak bildirilmişlerdir [Şeker ve ark., 2007; Sarı ve Tuzen, 2007; Gupta ve Rastogi, 2008]. Diğer siyanobakteriler ile yapılan Cr(VI) ve Cd(II) biyosorpsiyonunda elde edilen sonuçlar bu çalışmada elde edilen sonuçları doğrulamaktadır.

Ağır metal iyonlarının biyokütleyle tutunmalarındaki farklılıklar, ağır metalin cinsine (iyon büyüklüğü, atomik ağırlığı, indirgenme potansiyeli), kullanılan biyokütlenin farklılığına (canlı, cansız, tutuklanmış) ve kullanılan biyokütlenin yapısına (hücre yüzey özellikleri, fonksiyonel grupların çeşitliliği ve sayısı, metal bağlayan

proteinlerin bulunması) göre değişiklik göstermektedir. Cr(IV) ve Cd(II)'nin 50'den 300 ppm'e kadar değişen konsantrasyonlarında *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının cansız, tutuklanmış canlı ve cansız biyokütlelerinin Cr(VI) ve Cd(II) biyosorpsiyonu çalışılmıştır. Cr(VI) biyosorpsiyonunda 200 ppm'e kadar biyosorpsiyonun arttığı, 200 ppm'den itibaren Cr(VI) alınınının sabit kaldığı tespit edilmiştir. Cd(II) biyosorpsiyonunda ise Cd(II) alınınının, 250 ppm Cd(II) konsantrasyonuna kadar arttığı bu konsantrasyondan itibaren sabit kaldığı tespit edilmiştir. Cr(VI) ve Cd(II)'nin konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak hücre üzerindeki metal bağlanma bölgelerinde rekabet meydana gelmektedir. Bir süre sonra metal alınınının sabitlenerek alg hücre yüzeyinde bulunan metal bağlanma bölgelerinde doygunluk meydana geldiği bildirilmiştir [Kiran ve ark., 2007]. Benzer sonuçlar yapılan çalışmalarda da görülmüştür. Kiran ve ark. (2007), bir siyanobakter olan *Lyngbya putealis*'in tutuklanmış cansız biyokütlesini kullanarak, Cr(VI)'nin çeşitli konsantrasyonlarında (10, 33, 55, 78 ve 100 ppm) alınımlarını yüzdeleriyle araştırmışlar, 78 ppm konsantrasyonuna kadar alınımda artış olduğunu, 78 ppm'den itibaren alınının düştüğünü rapor etmişlerdir [Kiran ve ark., 2007]. Katırcıoğlu ve ark., (2007), *Oscillatoria* sp. H1'in cansız, tutuklanmış canlı ve cansız biyokütlelerini kullanarak Cd(II)'nin çeşitli konsantrasyonlarda Cd(II)'nin alınımlarını araştırmışlar, her üç örnekte de alınının 100 ppm'lik konsantrasyonuna kadar arttığı, 100 ppm'den itibaren 250 ppm'e kadar sabit kaldığını tespit etmişlerdir [Katırcıoğlu ve ark., 2007].

Cr(VI) biyosorpsiyonunda en yüksek alınımlar 200 ppm'lik Cr(VI) konsantrasyonunda görülürken, Cd(II) biyosorpsiyonunda en yüksek alınımlar 250 ppm'lik Cd(II) konsantrasyonlarında görülmüştür. Ancak, bu metal dozlarına maruz kalan tutuklanmış canlı ve cansız hücreler içeren kürelerin boyutlarında küçülme, morfolojilerinde deformasyonlar ve yüzeylerinde beyazlaşmalar tespit edilmiştir. Bu nedenle sonraki denemelerde, biyoteknolojik açıdan biyomateryallerin daha uzun süreli kullanılabilmesi için izolatların Cr(VI) ve Cd(II) biyosorpsiyonu ile ilgili diğer denemelerinde literatürlerde çok kullanılan 100 ppm'lik metal dozu tercih edilmiştir.

Metal alınımlarında kullanılan parametrelerin bir diğeri de zamandır. Biyosorpsiyonda metal alınımları başlangıçta hızlı iken, ilerleyen zamanda biosorbent yüzeyindeki

bağlanma bölgeleri doygunluğa ulaştığından alınım hızı yavaşladığı bildirilmiştir [Saravanane ve ark., 2002; Bishnoi ve ark., 2004]. Doygunluğa ulaşma zamanı kullanılan mikroorganizmanın cinsine bağlı olarak farklılık gösterdiği belirlenmiştir. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının cansız, tutuklanmış canlı ve cansız biyokütlelerinin çeşitli zaman aralığında (0-24 saat) Cr(VI) ve Cd(II) giderimi incelenerek, kullanılan biyokütlelerin her iki metal açısından doygunluğa ulaştığı zaman tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Cr(VI) biyosorpsiyonunda *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının cansız hücreleri 60. dak, tutuklanmış cansız hücreleri 30. dak ve tutuklanmış canlı biyokütlelerinin 60. dak'ya kadar metal alınınının arttığı, bu zamandan itibaren alınının sabit kaldığı tespit edilmiştir. Cd(II) biyosorpsiyonunda ise *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının cansız hücreleri, tutuklanmış canlı ve cansız biyokütlelerinin 15. dak' ya kadar metal alınımlarının arttığı, 15 dak sonra sabit kaldığı tespit edilmiştir. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının cansız, tutuklanmış canlı ve cansız biyokütleleri, Cd(II) biyosorpsiyonunda Cr(VI) biyosorpsiyonuna nazaran daha çabuk doygunluğa ulaşmıştır. Diğer siyanobakterilerin Cr(VI) ve Cd(II) biyosorpsiyonu ile ilgili çalışmalarda zamana bağlı olarak, ilk 45-120 dak'da biyosorpsiyonun daha hızlı olduğu, daha sonra yavaşladığı ve sabit kaldığı rapor edilmiştir [Bishnoi ve ark., 2007; Lee ve ark., 2007; Gupta ve Rastogi, 2008]. Ancak, bu durum metalin ve mikroorganizmanın çeşidine ve mikroorganizma yüzeyinde bulunan metal bağlanma bölgelerinin çeşidi ve sayısına göre farklılık göstermektedir. Bir çok araştırmacı hızlı metal alınınının biyokütlenin atıksuların arıtımında kullanılabilmesi için en önemli kriter olduğunu bildirmişlerdir [Kumar ve Prasad, 2007]. Bu açıdan değerlendirildiğinde, *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının cansız hücreleri, tutuklanmış canlı ve cansız biyokütlelerinin özellikle 15 dak gibi kısa bir sürede maksimum düzeyde Cd(II) adsorpladığı göz önünde tutulursa, atık su arıtımında kullanımı zaman açısından avantaj sağlayacaktır. Elde edilen deneysel sonuçlara göre, diğer denemelerde *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının cansız hücreleri, tutuklanmış cansız hücreleri ve tutuklanmış canlı hücrelerinin Cr(VI) ve Cd(II) biyosorpsiyonunda biyokütleler metallere 60 dak maruz bırakılmışlardır.

Bütün biyosorpsiyon denemelerinde hem Cr(VI) hem de Cd(II)'nin adsorpsiyonunun en yüksek olduğu biyokütlenin tutuklanmış cansız hücreler olduğu görülmektedir. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının tutuklanmış cansız hücreleri optimum şartlarda 100 ppm Cr(VI)'nin % 49'unu, 100 ppm Cd(II)'nin ise % 64'ünü biyosorbe ettiği tespit edilmiştir. Optimum şartlarda tutuklanmış cansız hücreler, Cr(VI) biyosorpsiyonunda cansız hücrelerden % 16 ve tutuklanmış canlı hücrelerden % 7 daha fazla Cr(VI)'yı, Cd(II) biyosorpsiyonunda ise cansız hücrelerden % 15 ve tutuklanmış canlı hücrelerden % 8 daha fazla Cd(II)'yi ortamdan giderdiği görülmüştür. Cr(VI) ve Cd(II) denemelerinde *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının cansız hücreleri 100 ppm Cr(VI)'nin % 33, 100 ppm Cd(II)'nin ise % 49'unu adsorbe ettiği tespit edilmiştir. Tutuklanma ile cansız hücreler metal alımın kapasitelerini arttırmışlardır. Bununla birlikte, Cr(VI) ve Cd(II)'nin *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının canlı hücrelere toksik etkisi ve EC₅₀ değerlerinin biyosorpsiyonda uygulanan 100 ppm metal konsantrasyonundan daha düşük olmasından dolayı, bu metallerin adsorpsiyonunun tutuklanmış cansız biyokütleye göre daha düşük olduğu düşünülmektedir.

Şu ana kadar yapılan biyosorpsiyon çalışmaları arasında *Synechocystis* sp. çok fazla kullanılmadığı için bu çalışma orijinallik taşımaktadır. Dönmez ve ark. (1999), cansız *Synechocystis* sp. ile yaptıkları çalışmada, biyokütlenin 100 ppm Cr(VI)'nin % 19,2'sini adsorbe ettiğini bildirmişlerdir [Dönmez ve ark., 1999]. Bu çalışmada *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının cansız hücreleri 100 ppm Cr(VI)'nin % 33'ünü adsorbe ettiği tespit edilmiştir. Saeed ve Iqbal (2006), *Synechococcus* sp'nin cansız ve tutuklanmış cansız hücrelerinin Cd(II) biyosorpsiyonu açısından karşılaştırmış, tutuklanmış hücrelerin, cansız hücrelerden daha çok miktarda Cd(II) biyosorbe ettiklerini rapor etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, cansız hücrelerin biyosorpsiyon çalışmalarında tekrarlı kullanımının zor olduğundan ve her yıkama işleminden sonra biyokütle kaybı gibi dez avantajlarının olduğunu, tutuklanmış hücrelerin metal gideriminde, tekrar kullanılabilirliği ve dayanıklılığı açısından kullanımının daha çok avantaj sağlayacağını bildirmişlerdir [Saeed ve Iqbal, 2006]. Araştırmacılar tutuklanmış hücrelerin serbest hücrelerden daha çok metal adsorbe ettiği bildirilmiştir [Akhtar ve ark., 2004; Shashirekha ve ark., 2008]. Bu çalışmada olduğu

gibi diğer araştırmacıların çalışmalarından da, hücre yüzeyi büyümesi ve bağlanma bölgelerinin artmasından dolayı tutuklanmış hücreler ağır metal alınımını arttırmıştır. Teknolojik açıdan değerlendirildiğinde, özellikle Cr(VI) ve Cd(II) kirliliğine maruz kalan suların temizlenmesinde *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının tutuklanmış cansız hücrelerinin kullanımının avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada hücrelerin tutuklanması için kullanılan aljinat, alglerin ürettiği doğal bir materyal olduğu, diğer tutuklama ajanları ile karşılaştırıldığında toksik bir yapıya sahip olmadığı ve tutuklanan mikroorganizmanın gelişmesinde olumsuz bir etkisinin bulunmadığı bilinmektedir. Heteropolimer bir yapıya sahip olan aljinat, α -L-gluronik ve β -D-monouronik asit ihtiva etmektedir [Kiran ve ark., 2007]. Metal giderimi çalışmalarında tutuklama ile hücre yoğunluğu artırılarak, biyokütle her desorpsiyon işleminden sonra defalarca kullanılabilir [Bai ve Abraham, 2003; Bajpai ve ark., 2004].

Ağır metallerin gideriminde, kullanılan biyokütlenin desorpsiyon sonrasında rejenerasyona bağlı olarak tekrar kullanılabilmesinin biyoteknolojik açıdan önemli olduğu bildirilmektedir [Gupta ve ark., 2000]. Biyokütlenin biyoteknolojik ve çevre uygulamalarında kullanılabilmesi için sadece iyi biyosorpsiyon yapmasının yeterli değildir, aynı zamanda adsorplanan metalin kolayca geri kazanılabilir ve biyokütlenin tekrar kullanılabilir olması gerekmektedir [Tunalı ve ark., 2005]. Bazı araştırmacılar desorpsiyon çözeltisi olarak EDTA'yı, bazıları ise HCl'yi önermektedirler [Gupta ve Rastogi, 2008]. EDTA etkili bir desorpsiyon çözeltisi olmasına rağmen, yüksek miktarlarda kullanıldığı zaman doğada ciddi çevresel problemlere neden olmaktadır. HCl ise hem iyi bir desorpsiyon çözeltisi olup, aynı zamanda EDTA'dan daha ucuza temin edilmektedir. Bu nedenle biyosorpsiyon-desorpsiyon denemelerinde desorpsiyon çözeltisi olarak biyoteknolojik açıdan önemli olan HCl kullanılmıştır.

Synechocystis sp. BASO670 izolatının cansız, tutuklanmış canlı ve cansız biyokütlelerinin, daha önce Cr(VI) ve Cd(II) gideriminde belirlenen optimum şartlarda tekrar biyosorpsiyonları çalışılmış ve hemen ardından her iki metalin

desorpsiyonları denenmiştir. Toplam 5 biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüsü denenmiştir. Desorpsiyon çözültisi olarak HCl kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre kullanılan her üç biyokütleden tutunan Cr(VI)'nın % 86'sından, Cd(II)'nin ise % 90'ından daha fazlası geri kazanılmıştır. Beşinci döngüden sonra biyokütlelerde deformasyonlar meydana gelmiştir. Cansız hücrelerin Cr(VI) ve Cd(II) desorpsiyonlarında her yıkama işleminden sonra biyokütlelerinde kayıplar meydana gelmiştir. Tutuklanmış hücreler içeren kürelerde ise 5. döngüden sonra bozulmalar ve parçalanmalar olduğu gözlenmiştir. Biyosorpsiyon-desorpsiyon ve geri kazanımları karşılaştırıldığında tutuklanmış canlı ve cansız hücreler, cansız hücrelerden daha yüksek miktarlarda Cr(VI) ve Cd(II) adsorpladığı ve desorbe ettiği tespit edilmiştir. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının cansız, tutuklanmış cansız, tutuklanmış canlı biyokütlelerinin 5 biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüleri sonunda Cd(II) metalinde, Cr(VI)'ya göre geri kazanımın fazla olduğu tespit edilmiştir. Geri kazanılan metallerin, kullanılabilir formlarına dönüştürüldükten sonra ilgili endüstri ve sanayide tekrar kullanımı mümkün olduğu bildirilmiştir [Gupta ve ark., 2000]. Bu açıdan bakıldığında, endüstrilerde ham madde olarak kullanılan metallerin tekrarlı kullanımı maliyeti düşüreceği için biyoteknolojik olarak avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.

Gupta ve Rastogi (2008), *Nostoc muscorum*'un cansız biyokütlesinin Cr(VI) desorpsiyonunda, EDTA çözültisi kullanarak biyosorbe edilen Cr(VI)'nın % 80'ini geri kazanıldığını ve biyokütlenin 5 biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüsünde kullanıldığını bildirmişlerdir [Gupta ve Rastogi, 2008]. Yine aynı araştırmacılar *Oedogonium* sp.'nin cansız hücreleri ile Cd(II) giderim çalışmasında, tutunan Cd(II) nin geri kazanılmasında HCl kullanmış ve biyokütlenin beş biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüsünde Cd(II)'nin % 82'sinin geri kazanıldığı rapor edilmiştir [Gupta ve Rastogi, 2008]. *Oscillatoria* sp. H1 ile Cd(II) gideriminde, biyokütleden Cd(II)'nin geri kazanılabilmesi için HCl çözültisi kullanılmış, toplam üç biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüsü denenmiş ve her döngüde tutunan Cd(II)'nin % 85'i geri kazanılmıştır [Katırcıoğlu ve ark., 2008]. Diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında biyosorpsiyon-desorpsiyon döngü sayısı ve geri kazanım açısından *Synechocystis* sp. BASO670 izolatı ile daha iyi sonuç alındığı görülmüş ve

buna göre tutuklanmış cansız hücreleri Cr(VI) ve Cd(II) metallerinin gideriminde kullanımının avantajlı olabileceği söylenebilir.

Synechocystis sp. BASO670 izolatının cansız, tutuklanmış cansız, tutuklanmış canlı biyokütlelerinin hem Cr(VI) hem de Cd(II) biyosorpsiyonu ve desorpsiyonu genel olarak incelendiğinde, tutuklanmış cansız hücreler biyoteknolojik olarak endüstriyel atık sularda bulunan Cr(VI) ve Cd(II) ağır metallerden arındırılması için, kullanılabilecek iyi bir biyosorbent olduğu görülmektedir. Şu ana kadar metal alınımı kantitatif olarak incelenmiştir. Ancak, Cr(VI) ve Cd(II) giderim mekanizmasını incelemek ve bu metallerin hücreye etkilerini belirlemek amacı ile canlı hücreler EC₅₀ değerinin altında olan 10 ppm Cr(VI), 10 ppm Cd(II) ve 10'ar ppm Cr(VI)+Cd(II) metallerine maruz bırakılmışlardır.

Canlı hücrelerde metal alınımının iki aşamada gerçekleştiği, birinci aşamada metallerin hücre yüzeyinde fiziksel yolla tutunduğu (hızlı alım), ikinci aşamada ise hücre içersine alındığı (yavaş alım) bildirilmiştir [Matsunaga ve ark., 1999]. Hücre yüzeyine alımda hücre duvarında bulunan fonksiyonel grupların ve ekzopolisakkaritlerin önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Hücre içersine alımda ise; metaller düşük moleküler ağırlıklı tiyollere tutunarak aktif transport ile hücre içersine alındığı rapor edilmiştir [Bajguz, 2000; Wang ve Chen, 2006]. Diğer bir hücre içersine alım şekli de metallothionein gibi şelatlayıcı proteinlere tutunarak endositoz yolu ile alım olduğu bildirilmiştir [Van Ho ve ark., 2002; Zalups ve Ahmad, 2003]. Biyobirikim mekanizmaları kullanılan mikroorganizma ve metal çeşidine göre değiştiği birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir [Arunakumara ve Xuecheng, 2008]. Metal alınımında canlı hücrelerin kullanımı, alım mekanizmasının ortaya çıkmasında avantaj sağlamaktadır. Endüstriyel atıklarla kirlenmiş sularda ağır metaller tek tek değil, birçoğu bir arada bulunmaktadır. Mikroorganizmaların, belirli bir ortamdaki bir metal iyonunu biyosorplama kapasitesi, ortamda başka metallerin var olduğu durumlarda, tek metalin varlığı ile kıyaslandığında; artabilir (sinerjistik etki), azalabilir (antagonistik etki) veya hiçbir değişim göstermez (noninteraction) [Sağ ve ark., 1998]. Bu nedenle *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının doğal ortamdaki davranışına yaklaşımlar yapabilmek için

Cr(VI)+Cd(II) metal karışımının biyobirikimi de denenmiştir. Bu çalışmada 7 gün boyunca Cr(VI), Cd(II) metalleri ve Cr(VI)+Cd(II) metal karışımlarına maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının hücrelerinin, hücre yüzeyine toplanan ve hücre içersine alınan metal miktarları incelenmiştir.

Canlı *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının Cr(VI), Cd(II) ve Cr(VI)+Cd(II) alma kapasitelerini belirlemek için 7 gün boyunca bu metallere maruz bırakılmışlardır. Yedinci günün sonunda *Synechocystis* sp. BASO670 izolatı 10 ppm Cr(VI)'nın % 7'sini hücre yüzeyine, % 2'sini de hücre içine, 10 ppm Cd(II)'nin % 89'unu hücre yüzeyine, % 4'ünü de hücre içine almıştır. Cr(VI)'nın % 80'i, Cd(II)'nin ise % 7'si suda kalmıştır. Metaller tek tek denendiğinde *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının canlı hücreleri, hücre yüzeyi ve hücre içersine toplam % 9 Cr(VI), % 93 Cd(II) biriktirmiş ve bu sonuçlara göre Cd(II)'yi Cr(VI)'ya göre daha çok tercih etmiştir. İzolat Cr(VI)'nın çok az bir kısmını, Cd(II)'nin ise neredeyse tamamını giderdiği görülmüştür.

Cr(VI)+Cd(II) metal karışımına maruz kalan hücrelerde ise yine Cr(VI)'ya nazaran Cd(II) alınımının daha fazla olduğu tespit edilmiştir. 7. günün sonunda Cd(II)'nin neredeyse tamamı (% 96) hücre yüzeyine tutunurken, Cr(VI) alınımı görülmemiştir. Ancak, hücre içersine Cd(II) alınımı görülmezken, Cr(VI)'nın % 28'inin hücre içersine alındığı tespit edilmiştir. Metal karışımlarına maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatı, yine metallere ayrı ayrı maruz kaldığındaki gibi Cd(II)'yi tercih etmiştir. Biyobirikim denemelerinde kullanılan ortam BG11'in pH'sı 6,8'dir. Ancak Cr(VI)'nın asidik pH'larda alındığı bilinmektedir. Bu nedenle yüksek pH'larda Cr(VI) alınımı eser miktarda olmaktadır [Cimino ve ark., 2000; Gode ve Pehlivan, 2005]. Asidik pH'lar metalin hücre içine alımında görev alan taşıyıcı proteinlerin veya metal giderim mekanizmasında rol alan enzim aktivitelerini etkileyebileceği düşünülmektedir. Diğer taraftan Cd(II) alınımı yüksek pH'larda (pH 6-7) gerçekleşmektedir [Chojnacka ve ark., 2005; Katırcıoğlu ve ark., 2007]. Bu nedenle *Synechocystis* sp. BASO670 izolatı hücre yüzeyine Cd(II)'yi Cr(VI)'ya nazaran daha çok tutmuştur.

Biyobirikim çalışmaları ile ilgili literatür araştırmaları sonucunda Cr(VI) ve Cd(II)'un *Synechocystis* sp. izolatının canlı hücreleri ile alınımı ilk defa bu tez çalışmasında denenmiştir. Bu nedenle elde edilen sonuçlar açısından bu çalışma önem taşımaktadır. Başka bir biyobirikim çalışmasında, Matsunaga ve ark. (1999), izole ettikleri 191 adet mikroalgden 24'ünün Cd(II)'ye dirençli olduğunu tespit etmişlerdir. Cd(II)'ye en çok direnç gösteren *Chlorella* sp. NKG16014 izolatının Cd(II) biyobirikimini incelemişler. Elde edilen sonuçlara göre Cd(II)'nin % 25'i hücre yüzeyine tutunurken % 67'si hücre içersine alınmıştır [Matsunaga ve ark., 1999]. *Chlorella* sp. NKG16014 izolatının Cd(II) alınımı *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının Cd(II) alınımı ile karşılaştırıldığında, Cd(II)'nin *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının hücre yüzeyinde daha çok ve hücre içersine daha az alındığı görülmüştür. Metallerin biyobirikiminde birçok faktör görev almaktadır. Bu faktörlerden en önemlilerinin hücre duvarından salgılanan ekzopolisakkaritler (EPS) ve hücre duvar yapısında bulunan metal bağlayıcı ve taşıyıcı proteinlerin olduğu bilinmektedir. Metal alınımında önemli olan bu yapıların durumu, içerikleri ve yoğunluklarındaki farklılıklardan dolayı, farklı mikroorganizmaların metal alınımında farklılıklar görülmektedir.

Ağır metallere maruz kalan mikroorganizmaların morfolojilerinde değişiklikler meydana gelmektedir. 10 ppm Cr(VI), 10 ppm Cd(II) ve 10'ar ppm Cr(VI)+Cd(II) ağır metallerine maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının hücrelerine bu metallerin etkisini incelemek için taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri ve görüntülerin elementel analiz sonuçları kontrol hücrelerle (metale maruz kalmayan) karşılaştırılmıştır. BG11 besiyerinde inkübasyona bırakılmış ve ağır metal ilave edilmemiş *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının kontrol hücrelerinin SEM görüntülerinde normal gelişimini sürdüren bölünme durumundaki hücreler görülmektedir. EDS yardımıyla yapılan hücre yüzeyi elementel analizlerinde ise Cr(VI) ve Cd(II) ağır metallerine rastlanılmamıştır.

Birçok bakteri hücresi kuraklık, sıcaklık, pH değişimleri ve ağır metaller gibi stres şartlarında EPS üreterek yaşamlarını devam ettirmektedirler. Sentezlenen EPS kimi zaman bakteriyi ağır metaller gibi olumsuz çevre şartlarından korurken, kimi zaman

da ortamda bulunan ağır metalleri tuttuğu bilinmektedir. Bu özellik bakterinin cinsine ve ağır metalin çeşidine göre değişmektedir [Comte ve ark., 2008]. Siyanobakterilerin ekzopolisakkaritleri genelde heteropolimer yapıda olup çoğunlukla glikoz, galaktoz, mannoz, riboz, arabinoz, ksiloz, fukoz, ramnoz şekerleri ile glukronik ve galaktronik şeker asitlerinden oluşmaktadır [De Philippis ve ark., 2000]. EPS siyanobakterilerde hücre duvarına bağlı ve dışarı salınan olmak üzere iki şekilde bulunmaktadır. Siyanobakter ekzopolisakkaritlerinde yüksek miktarlarda uronik asit ve fosfat grupları bulunmaktadır [Richert ve ark., 2005]. Bu önemli fonksiyonel gruplar ortamdaki metali tutarak bir bariyer gibi hücreyi korumaktadırlar.

10 ppm Cr(VI) ve 10 ppm Cd(II)'ye maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 hücrelerinin SEM görüntüleri kontrol (metale maruz kalmayan) hücrelerle mukayese edildiğinde, metale maruz kalan hücrelerin salgıladığı ekzopolisakkarit (EPS) yapıda belirgin bir artış olduğu ve hücre yüzeylerinin kontrole göre daha pürüzlü bir yapıya sahip olduğu görülmektedir. Bu görüntüye sahip hücrelerin çevresinin EPS ile kaplı olduğu ve bu hücrelerin metali daha çok yüzeylerine tutacağı düşünülerek EDS analizleri yoğunlukla bu bölgelerde yapılmıştır. Yin ve ark. (2008), *Candida tropicalis* ve *Candida lipolytica*'nın Cr(VI) ve Cd(II) giderim kapasitelerini ve FTIR ve SEM/EDS analizleri ile de metal bağlanma bölgelerini araştırmışlar, elde edilen sonuçlara göre, Cr(VI) detoksifikasyonunda ise hücre dışına salgılanan ekzopolisakkaritlerin önemli faktörler olduğunu rapor etmişlerdir [Yin ve ark., 2008]. Yapılan analizlerde, EPS'nin yoğun olarak dışarı salındığı bölgelerde pürüzlü hücre yüzeyine göre daha fazla Cr(VI) ve Cd(II)'ye rastlanmıştır.

10'ar ppm Cr(VI)+Cd(II) ağır metallerine maruz kalan hücrelerde ise sarmal ve üçlü yapılar gibi morfolojik anormallikler olduğu tespit edilmiştir. Bu anormalliklerin hücrelerin normal hücreler gibi tam olarak bölünememesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ağır metal karışımına maruz kalan hücrelerin EPS'si kontrol hücrelerin EPS'si ile karşılaştırıldığında bir artış olduğu tespit edilmiştir. EDS yardımıyla yapılan hücre yüzeyi elementel analizlerinde ise, bir rekabet ortamı olduğu için hücre yüzeyinde Cr(VI)'ya nazaran çok yüksek miktarda Cd(II) biriktiği

tespit edilmiştir. Biyobirim deneylerinde de 10'ar ppm Cr(VI)+Cd(II) ağır metallerine maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının Cr(VI)'dan çok Cd(II)'yi tercih ettiği tespit edilmişti. Hücre yüzeyi SEM/EDS elementel analiz sonuçları biyobirikim deneyi sonuçlarını doğrulamaktadır. Surosz ve Palinska (2004), bakır ve kadmiyumun *Anabaena flos-aqua*'ya etkisini SEM/EDS analizi ile incelemişler, Cu(II) ve Cd(II)'nin yapısal olarak hücre morfolojisini değiştirdiğini tespit etmişlerdir. EDS analizi sonuçlara göre *Anabaena flos-aqua*'nın canlı hücrelerinin Cd(II)'yi Cu(II)'ye nazaran daha çok tercih ettiğini rapor etmişlerdir [Surosz ve Palinska, 2004]. Ortamda birden fazla metal olması durumunda hücre yüzeyine bağlanma bölgelerinde rekabet oluşmaktadır [Bueno ve ark., 2008]. Metal karışımının alınımında ve kullanılan biyomateryallerin metal tercihinde etkili olan en önemli faktörlerden biri de metallerin sahip olduğu fizikokimyasal özellikleridir. Bir metalin elektronegativitesi ve iyonik radyanı ne kadar yüksek ise bağlanma gücü de o kadar artmaktadır [Sağ ve ark., 2002; Bueno ve ark., 2008].

Elementel analizleri hücre yüzeyinde bulunan elementlerin tespiti için kullanılmaktadır. Bu çalışmada Cr(VI) ve Cd(II) elementlerinin yanı sıra hücre yüzeyinde bulunan C, O, Na, Mg, K ve Ca elementlerine de rastlanmıştır. Bütün denemelerde hücrenin yapıtaşı olan C ve O elementlerinin diğer elementlere nazaran daha yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir. Bueno ve ark. (2008), *Rhodococcus opacus*'u Pb(II), Cr(III) ve Co(II) metallerine maruz bırakarak, metallerin hücre üzerine etkisini elektron mikroskobu ile incelemişler ve elementel analizlerini yapmışlardır. Elementel analiz sonuçlarına göre, kontrol hücrelerde tespit edilen K (potasyum) elementine metale maruz kalan hücrelerde rastlanılmamıştır. Hücre yüzeyinde bulunan K'un metallerle yer değiştirmiş olabileceğini rapor etmişlerdir [Bueno ve ark., 2008]. Bu çalışmada böyle bir ilişki bulunmamaktadır.

Ağır metallerin detoksifikasyonunda, hücre yüzeyine bağlanmasında ve hücre içersine alınmasında rol oynayan önemli bir faktör de proteinlerdir. Birçok organizmada olduğu gibi siyanobakterilerde de metaller, mikro-besin kaynakları ve enzimatik kofaktörler olarak kullanılmaktadır. Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, ve Zn gibi elementler metabolizmada için gerekmektedir [Baptista ve Vasconcelos,

2006]. Fakat Cr(VI) ve Cd(II) gibi elementler metabolizmanın hiçbir evresinde kullanılmaz ve yüksek oranda toksik etki göstermektedir. Bu nedenle hücre içersine alınan toksik ağır metaller metallothionein türevi proteinlerle etkisiz hale getirilmektedirler. Ağır metal stresine maruz kalan siyanobakteriler metalleri etkisiz hale getirmek için metal bağlayıcı (metallothionein türevi) proteinleri sentezlemektedirler. Metallothioneinlerin stres durumunda vakuollerde birikerek sitoplazmada bulunan ağır metal iyonlarının konsantrasyonlarını kontrol altında tutarak hücreyi koruduğu ya da metallerin potansiyel toksik etkilerini nötralize ettiği bildirilmiştir [Cobbett ve Goldsbrough, 2002; Banjerdikij ve ark., 2003; Perales-Vela ve ark., 2006].

Metal bağlayıcı özelliğe sahip metallothionein türevi proteinlere son yıllarda ilgi artmış ve bu konu ile ilgili araştırmalar yapılmaktadır. Örneğin, Cd(II)'ye maruz kalan sucul mikroorganizmaların birçoğunda sisteince zengin metallothionein proteinlerin sentezlendiği tespit edilmiştir [Guimaraes-Soares ve ark., 2007]. *Paxillus involutus* ile yapılan bir çalışmada 3 kDa moleküler ağırlığa sahip metallothionein türevi proteinin metal toleransı ile ilgili olduğu rapor edilmiştir [Courbot ve ark., 2004]. Bir diğer çalışmada *Chlorella sorokiana* 11 kDa moleküler ağırlığında Cd(II) bağlama yeteneğine sahip metallothionein türevi proteinin metal dirençliliğinde çok önemli rol oynadığı bildirilmiştir [Yoshida ve ark., 2006]. Sucul funguslarla yapılan bir çalışmada ise 11 kDa metallothionein benzeri bir proteinin ağır metal adaptasyonu sağladığı tespit edilmiştir [Miersch ve Grancharov, 2008].

Cr(VI) ve Cd(II)'ye dirençli olan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatu 10 ppm Cr(VI), 10 ppm Cd(II) ve 10'ar ppm Cr(VI)+Cd(II) ağır metallerine maruz bırakılarak proteinleri çıkarılmış ve SDS-PAGE'de marker ile birlikte yürütülerek protein profillerinde meydana gelen değişiklikler kontrol hücrelerle mukayese edilmiştir. SDS-PAGE jel görüntülerine göre Cr(VI)'ya maruz kalan hücrelerin proteinleri kontrol hücrelerin proteinleri ile karşılaştırıldığında, 10,15 KD büyüklüğünde farklı bir proteinin sentezlendiği ve bazı protein miktarlarında artma veya azalmanın olduğu dikkati çekmektedir. Benzer sonuçlar başka çalışmalarda da bildirilmiştir. Chovanova ve ark. (2004), kadmiyum kirliliğin maruz kalan aktif çamurlardan sekiz

adet bakteri izole ederek, biyokimyasal reaksiyonları, DNA analizi ve API analizine göre izolatları tanımlamışlardır. Cd(II)'ye dirençli olan bu sekiz izolatı 50 ppm Cd(II)'ye maruz bırakarak, SDS-PAGE ile protein profillerini kontrol hücrelerin protein profilleri ile karşılaştırmışlardır. Kontrole göre Cd(II)'ye maruz kalan hücrelerin bazı proteinlerin miktarında artış olduğunu, bazılarında ise kontrolde bulunmayan proteinlerin sentezlendiği bildirilmiştir [Chovanova ve ark., 2004]. Cr(VI)'ya maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının biyobirikim deneylerinde, 10 ppm Cr(VI)'nın çok az bir miktarının giderildiği, % 7'sini hücre yüzeyinde % 2'sini de hücre içine aldığı tespit edilmişti. Cr(VI)'ya maruz kalan hücrelerin protein profillerinde görülen farklı bantın, Cr(VI) metalinden korunmak metali etkisiz hale getirmek için sentezlenen stres proteini olabileceği düşünülmektedir.

Cd(II)'ye maruz kalan Cr(VI)'ya maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının proteinleri kontrolle karşılaştırıldığında bazı proteinlerin miktarlarında farklılıkların olduğu, 21,82 KD'luk proteinin ise kaybolduğu tespit edilmiştir. Cr(VI)+Cd(II) ağır metallerine maruz kalan hücrelerin proteinleri, kontrol hücrelerin proteinleri ile karşılaştırıldığında ise birçok proteinin kaybolduğu, özellikle 42,25 KD'luk proteinin miktarında ciddi bir artış olduğu dikkati çekmektedir. Cr(VI)+Cd(II) metal karışımına maruz kalan hücrelerin SEM görüntülerinde, birçok hücrede morfolojik deformasyonlar tespit edilmişti. Bu morfolojik deformasyonların kaybolan proteinlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Felicio ve ark. (2003), *Acidithiobacillus ferrooxidans*'ın 2D-PAGE yöntemi kullanarak bakır iyonlarına maruz kalan hücrelerinin proteinlerini, kontrol hücrelerin proteinleri ile karşılaştırmışlar ve metale maruz kalan hücrelerin kontrol hücrelerin proteininde bulunmayan 17KD'luk farklı bir protein sentezlediğini tespit etmişlerdir [Felicio ve ark., 2003]. Vido ve ark., (2001) *Sacharomyces cerevisiae* mayası ile yaptıkları çalışmada, Cd(II)'ye maruz bıraktıkları maya hücrelerinin proteinlerinin proteom analizinde, Cd(II)'ye maruz kalan *S. cerevisiae* hücrelerinin 54 proteinin miktarında artış, 43 proteinin miktarında da azalma olduğunu bildirmişlerdir [Vido ve ark., 2001]. Metallere maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670'in proteinlerinde

meydana gelen farklılıklar bu konu ile yapılan diğer çalışmalara benzerlik göstermektedir.

Surosz ve Palinska, (2004), *Anabaena flos-aqua*'ya çeşitli Cd(II) konsantrasyonları (0,5, 1, 3, 6 ppm) uygulayarak SDS-PAGE protein profillerini incelemişler, Cd(II) konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak protein miktarlarında azalma olduğunu tespit etmişlerdir [Surosz ve Palinska, 2004]. Congeevaram ve ark. (2007), ağır metallere dirençli fungus ve bakteri izolatlarının Cr(VI) ve Ni(II) giderimini çalışmışlar, 100 ppm Cr(VI) ve 50 ppm Ni(II)'ye maruz kalan hücrelerin SDS-PAGE protein profillerinde kontrole göre farklılıkların olduğunu tespit etmişlerdir. Cr(VI)'ya maruz kalan *Aspergillus* sp.'un protein profilinde 93 kDa moleküler ağırlığa sahip, kontrolde hücrelerin proteininde olmayan bir protein bandının görüldüğü ve bu proteinin Cr(VI) detoksifikasyonuna neden olabileceği rapor edilmiştir [Congeevaram ve ark., 2007].

Metallere maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670'in proteinlerinin SDS-Page jel görüntüsü incelendiğinde, protein miktarlardaki farklılıkların, farklı bir proteinin sentezinin ve kaybolan proteinlerin daha çok 30 KD'un altındaki moleküler ağırlığa sahip proteinlerde meydana geldiği dikkati çekmektedir. Birçok araştırmacı metal gideriminde görev alan metallothionein proteinlerinin moleküler ağırlıklarının 30 KD'un altında olduğunu rapor etmişlerdir.

Siyanobakterilerde ağır metal detoksifikasyonundan sorumlu mekanizmalardan bir diğeri de proteinlere bağlı tiol gruplarıdır [Perales-Vela ve ark., 2006]. Tiyoller, sistein aminoasiti bakımından zengin olup, genellikle hücre yüzeyinde metallothioneinlere bağlı olarak bulunan ve metallerin alınımında ve hücre içersine taşınmasında rol oynayan en önemli fonksiyonel gruptur [Jaekel ve ark., 2005]. Yapılarına -SH grupları içeren tiyoller, proteine bağlı tiyol ve proteine bağlı olmayan tiyoller olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar [Cobbett ve Goldsbrough, 2002] ve her iki grup da metal gideriminde etkili olduğu bildirilmiştir [Singh ve ark., 2005]. Bu çalışmada 7 gün 10 ppm Cr(VI), 10 ppm Cd(II) ve 10'ar ppm Cr(VI)+Cd(II) ağır metallerine maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının

klorofil-a miktarları, protein miktarları, sülfidril grubu içeren toplam tiyoleri (TT), proteine bağlı olan tiyoleri (PBT) ve proteine bağlı olmayan tiyoleri (PBOT) tespit edilmiş kontrol hücreler ile mukayese edilmiştir. 7. günün sonunda farklı metal ve karışımlarına maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının klorofil-a ve protein miktarlarında kontrole göre bir azalma olduğu belirlenmiştir. Farklı metaller ve karışımına maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının TT miktarlarında 1. günden itibaren Cd(II) ve Cr(VI)+Cd(II) karışımında kontrole göre artış olduğu tespit edilmiştir. Cr(VI)'ya maruz kalan hücrelerin TT miktarlarının kontrole göre 4. güne kadar arttığı, 4. günden itibaren ise azaldığı belirlenmiştir. Cr(VI)'nın biyobirikim sonuçları (% 7) incelendiğinde Cd(II)'ye (% 89) oranla çok daha az miktarda hücre yüzeyinde toplandığı tespit edilmişti. Cd(II)'ye maruz kalan hücrelerin TT miktarlarının 7. güne kadar kontrole göre arttığı tespit edilmiştir. Biyobirikim deneylerindeki Cr(VI) ve Cd(II)'deki hücre yüzeyine alınımlarının farklılıklarının TT miktarlarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

3. günden itibaren Cr(VI) ve Cd(II) uygulanmış hücrelerde kontrole göre PBOT miktarlarında kontrole göre dikkate değer bir artış belirlenmez iken, Cr(VI)'ya maruz kalan hücrelerde 5. günden itibaren PBOT miktarlarında düşme görülmüştür. Cr(VI)+Cd(II) metal karışımına maruz kalan hücrelerde ise 1. günden 7. güne kadar kontrole göre belirgin bir artış olduğu tespit edilmiştir. PBT grupları kontrol hücrelerle karşılaştırıldığında ise 3. günden itibaren 7. güne kadar Cr(VI), Cd(II) ve Cr(VI)+Cd(II) metal karışımlarına maruz kalan hücrelerin kontrole göre proteine bağlı tiyol miktarlarında artış olduğu tespit edilmiştir. En yüksek artışın Cr(VI)'ya maruz kalan hücrelerde olduğu dikkati çekmektedir. Cr(VI)'ya maruz kalan hücrelerin proteinlerinin SDS-PAGE jel görüntüsünde kontrol hücrelerin ve diğer metallere maruz kalan hücrelerin proteinlerinde bulunmayan farklı bir proteinin olduğu tespit edilmiştir. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının Cr(VI)'ya maruz kalan hücrelerinde kontrole göre PBT miktarında artışın olması ve protein profillerinde düşük moleküler ağırlıklı farklı bir proteinin sentezlenmesine rağmen, hücrelerin biyobirikim denemelerinde Cr(VI)'nın çok az bir miktarını giderdiği tespit edilmiştir. Bu nedenle, PBT miktarındaki artış ve farklı protein sentezinin Cr(VI)

alınımı ile değil, Cr(VI)'dan korunmak amaçlı olan stres proteinlerine bağlı olduğu düşünülmektedir.

Cd(II) ve Cr(VI)+Cd(II) metal karışımına maruz kalan hücrelerin PBT miktarlarında kontrole göre düşüş olduğu tespit edilmiştir. SDS-PAGE jel görüntüsünde de Cd(II) ve Cr(VI)+Cd(II) metal karışımına maruz kalan hücrelerin proteinlerinde kontrole göre birçok proteinin miktarının azaldığı hatta metal karışımına maruz kalan hücrelerin proteinlerinde kayıplar olduğu dikkati çekmiştir. Bu açıdan değerlendirildiğinde SDS-PAGE protein sonuçlarını PBT sonuçları doğrulamaktadır.

Diğer mikrorganizmalar ile yapılan çalışmalarda metale bağlı olarak tiyol gruplarının üretiminin de arttığı rapor edilmiştir. Bir sucül fungus olan *Articulospora tetracladia* ile yapılan bir çalışmada temiz ve metal kirliliğine maruz kalan sulardan izole edilen izolatlar Cd(II) ye maruz bırakılmış ve Cd(II) varlığında hücrelerin kontrol hücrelere göre tiyol miktarlarında artış olduğu tespit edilmiştir [Miersch ve ark., 2001]. Cd(II)'ye maruz kalan mayalardan *Schizosaccharomyces pombe*'nin [Al-Lahham ve ark., 1999], ascomycetelerden *Neurospora crassa*'nın [Kneer ve ark., 1992], zygomycetelerden *Mucor racemosus*'un [Miersch ve ark., 2001], funguslardan *Paxillus involutus*'un [Courbot ve ark., 2004], mikroalglerden *Tetraselmis suecica*'nın [Perez-Rama ve ark., 2001], alglerden *Fontinalis antipyretica*'nın [Bruns ve ark., 2001] proteine bağlı olmayan tiyol gruplarında metale bağlı bir artış olduğu rapor edilmiştir.

Guimaraes-Soares ve ark. (2007), *Fontanospora fusiformis* ve *Flagellospora curta* sucül funguslarının Cd(II)'ye maruz kalan hücrelerinin proteine bağlı tiyol gruplarında artış olduğunu tespit etmişleridir [Guimaraes-Soares ve ark., 2007]. Cd(II)'ye maruz kalan *H. lugdunensis* fungusunun protein profilinde 5-15 kDa moleküler ağırlığa sahip yeni proteinlerin sentezlendiği bildirilmiştir [Miersch ve ark., 2003]. Siyanobakterilerden *Synechococcus* PCC 7942 ile yapılan çalışmalarda 56 adet sisteince zengin aminoasiti içeren SmtA proteini olduğu rapor edilmiştir. SmtA proteininin hücre içinde görevi; özellikle Cd ve Zn gibi ağır metallerin detoksifikasyona neden olmaktadır [Olafson ve ark., 1988]. Metalloitiyonein

proteinleri içersinde sadece prokaryotlara özel SmtA'nın yapısında metallerin bağlanmasını sağlayan tiyol grupları bulunmaktadır ve metale maruz kalan hücrelerde bu proteinin sentezinin arttığı bildirilmektedir [Cavet ve ark., 2003].

Günümüzde artık metal giderimi kadar metal gideriminde rol oynayan faktörler ve giderim mekanizması önem kazanmaktadır. Biyosorpsiyonda ve biyobirikimde kullanılacak canlının metabolizmasını ve metabolizmaya bağlı metal gideriminde rol oynayan metabolitlerin bilinmesi, canlının biyoteknolojide ve özellikle arıtımda kullanılması açısından avantaj sağlamaktadır. Bu çalışmada *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının Cr(VI) ve Cd(II) biyosorpsiyonu ve biyobirikimi detaylı bir şekilde incelenmiş olup, metallerin canlı hücrelere etkileri SEM ve EDS analizleri ile, metallerin alınımlar mekanizmaları ise biyobirikim deneyleri, SDS-page jel görüntüleri ve tiyol miktarlarının belirlenmesi ile tespit edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan teknikler, yöntemler orijinal olup metal giderimi kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının atık sulardan Cr(VI) ve Cd(II) metallerinin gideriminde kullanımının avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Bu çalışmada, Mogan Gölü, Kurtboğazı Barajı, Uncalı Deresi, Bafa Gölü, Hatim Çayı, Harikalar Diyarı Göleti ve Kızılırmak Nehri'nden izole edilen 15 adet siyanobakter izolatının, morfolojileri, bölünme fizyolojileri ve 16S rRNA'larına göre tanımlamaları yapılmış, bütün izolatların *Synechocystis* sp.'ye ait olduğu belirlenmiştir.

2. Tanımlanan izolatlar, atık sularda çok yoğun olarak bulunan ve yüksek oranda toksik Cr(VI) ve Cd(II) ağır metallerine maruz bırakılarak, gerek klorofil-a miktarları gerekse de EC₅₀ değerlerine göre, bu metallerin izolatların canlılığına etkileri belirlenmiştir. Mogan Gölünden izole edilen *Synechocystis* sp. BASO670'ün her iki metale karşı canlılığını en çok koruyan izolat olduğu tespit edilmiştir. Biyosorpsiyon ve biyobirikimde avantaj sağlayacağı düşüncesi ile bu çalışmalarda *Synechocystis* sp. BASO670 izolatı kullanılmıştır.

3. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının cansız, tutuklanmış cansız ve tutuklanmış canlı biyokütleleri kullanılarak Cr(VI) ve Cd(II) ağır metallerini biyosorpsiyonu çalışılmış, tutuklanmış cansız hücrelerin diğer biyokütlelerden daha iyi bir biyosorbent olduğu tespit edilmiştir. Biyosorpsiyon sonuçlarına göre Cd(II) giderimi Cr(VI) giderimine göre çok daha fazla olduğu görülmüştür.

4. *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının canlı hücrelerinin Cr(VI), Cd(II) ve Cr(VI)+Cd(II) biyobirimi iki aşamada çalışılmış, her uygulama için hücre yüzeyine ve hücre içersine alınan metal miktarı tespit edilmiştir. Canlı *Synechocystis* sp. BASO670 izolatı Cd(II)'yi Cr(VI)'ya nazaran daha çok tercih ettiği, metallerinin çoğunun hücre yüzeyinde biriktirdiği çok az bir kısmının hücre içersine aldığı belirlenmiştir.

5. Biyobirikim çalışması ile aynı şartlarda Cr(VI), Cd(II) ve Cr(VI)+Cd(II) metallerine maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının SEM/EDS analizleri yapılmış, SEM görüntülerine göre, Cr(VI) ve Cd(II) metallerine maruz kalan

hücrelerin yüksek oranda EPS sentezlendiği, Cr(VI)+Cd(II) metallerine maruz kalan hücrelerin ise morfolojik deformasyonlara uğradığı tespit edilmiştir. EDS analizlerinde ise *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının Cd(II)'yi Cr(VI)'ya nazaran daha çok tuttuğu ve hücre yüzeyine nazaran metallerin EPS yapısına daha çok tutunduğu belirlenmiştir. SEM/EDS sonuçları biyobirikim sonuçlarını desteklediği tespit edilmiştir.

6. Metalin hücre içersine alınmasında ve detoksifikasyonunda görev alan metallothionein ve stres proteinlerinin metal gideriminde önemli rolü olduğu bilinmektedir. Cr(VI), Cd(II) ve Cr(VI)+Cd(II) ağır metallerine maruz kalan hücrelerin proteinleri çıkarılarak, SDS-PAGE protein profillerindeki farklılıklar tespit edilmiştir. Metale maruz kalan hücrelerin proteinlerin, özellikle 30 KD'un altındaki moleküler ağırlığa sahip proteinlerin miktarlarında farklılıklar meydana geldiği tespit edilmiş, metal varlığında sentezlenen bu düşük moleküler ağırlıklı proteinlerin, metal gideriminde bağlayıcı ve stres proteinleri olduğu düşünülmektedir.

7. Proteinlerdeki farklılıktan yola çıkarak toplam, proteine bağlı ve proteine bağlı olmayan tiyol gruplarının da metal giderimde etken olabileceği düşüncesi ile Cr(VI), Cd(II) ve Cr(VI)+Cd(II) ağır metallerine maruz kalan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının tiyol grupları incelenmiş, biyobirikim çalışmasını ve SDS-PAGE protein profilindeki farklılıkları doğrulayacak sonuçlar elde edilmiştir.

Bu çalışma ile *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının Cr(VI) ve Cd(II) biyosorpsiyonu ve biyobirikimi çok yönlü olarak çalışılmış, giderimde rol oynayan metabolizma ve metabolitlerin etkileri detaylı bir şekilde incelenmiştir. Giderimde rol oynayan metabolizma ve metabolitlerin bilinmesi, atık su arıtımında kullanılacak biyokütlenin giderimde daha verimli olması açısından avantaj sağlayacaktır. Bu çalışmada kullanılan teknik ve yöntemlerin yeni olması, biyosorbent olarak seçilen mikroorganizmanın diğer metal çalışmalarında çok fazla kullanılmaması, metal gideriminin sadece sayısal olarak değil mekanizmasının da incelenmesi, SEM görüntüleri ile metallerin canlı hücrelere etkisinin belirlenmesi, metal gideriminde rol

oynayan proteinlerin ve tiyol gruplarının biyobirikimle ilişkilendirilmesi nedeni ile bu alanda yapılmış diğer çalışmalardan daha kapsamlı ve orijinal olup, metal gideriminde çalışan diğer araştırmacılar için kaynak oluşturacaktır.

Daha ilerki aşamalarda Cr(VI) ve Cd(II) ağır metallerine toleransı *Synechocystis* sp. BASO670 izolatının, Cr(VI) ve Cd(II) gideriminde rol oynayan hücre duvar yapısında bulunan karboksil, hidroksil ve fosfat gibi fonksiyonel gruplarının, ekzopolisakkarit yapısında bulunan ve giderimde rol oynadığı bilinen şeker monomerlerinin, uronik asit, glukuronik asit ve galaktronik asitin, metal varlığında ortaya çıkan metalotiyonein türevi gibi stres proteinlerin ve giderimde elzem olan bazı enzimlerin saflaştırılarak karakterizasyonu yapılabilir. Metallerin proteinlere etkisi 2D-PAGE yöntemi ile daha detaylı bir şekilde incelenebilir. Ayrıca, SDS-PAGE’de kontrole göre miktarlarında değişiklikler görülen ve sentezlenen farklı proteinlerin saflaştırılarak dizi analizleri yapılabilir ve bu farklı proteinler tanımlanabilir.

Sonuç olarak, klasik arıtım yöntemlerine alternatif bir yöntem olan biyosorpsiyon ve biyobirikimle Cr(VI) ve Cd(II) giderimi için, *Synechocystis* sp. BASO670 izolatı içme sularından ve atık sulardan toksik metallerin uzaklaştırılmasında güvenli bir biyofiltre olarak değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR

- Adams, D. G., "Heterocyst formation in cyanobacteria", *Curr. Opin. Microbiol.*, 3: 618–624 (2000).
- Adarsh, V. K., Mishra, M., Chowdhury, S., Sudarshan, M., Thakur A. R., Chaudhuri, S. R., "Studies on metal microbe interaction of three bacterial isolates from east calcutta wetland", *J. Biol. Sci.*, 7: 80-88 (2007).
- Adhiya, J., Cai, X., Sayre, R. T., Traina, S. J., "Binding of aqueous cadmium by the lyophilized biomass of *Chlamydomonas reinhardtii*", *Colloid. Surface.*, 210: 1-11 (2002).
- Ahn, C.-Y., Joung, S.-H., Yoon, S.-K., Oh, H.-M., "Alternative alert system for cyanobacterial bloom, using phycocyanin as a level determinant", *J. Microbiol.*, 45 (2): 98-104 (2007).
- Ahuja, P., Mohapatra, H., Saxena, R. K., Gupta, R., "Reduced uptake as a mechanism of Zinc tolerance in *Oscillatoria angustissima*", *Curr. Microbiol.*, 43: 305-310 (2001).
- Akhtar, N., Iqbal, J., Iqbal, M., "Removal and recovery of nickel(II) from aqueous solution by loofa sponge immobilized biomass of *Chlorella sorokiniana*: characterization studies", *J. Hazard. Mater.*, 108: 85–94 (2004).
- Akhtar, N., Iqbal, J., Iqbal, M., "Enhancement of lead(II) biosorption by microalgal biomass immobilized onto loofa (*Luffa cylindrica*) sponge", *Eng. Life Sci.*, 4 (2): 171–178 (2004).
- Aksu, Z., "Atıksulardaki ağır metal iyonlarının yeşil alglerden *Chlorella vulgaris*' e adsorpsiyonunun kesikli düzende karıştırılmalı ve akışkan yatak tepkime kaplarında incelenmesi", Doktora tezi, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 1-190 (1988).
- Al-Asheh, S., Banat, F., Abu-Aitah, L., "Adsorption of phenol using different types of activated bentonites", *Sep. Purif. Technol.*, 33 (1): 1-10 (2003).
- Al-Lahham, A., Rohde, V., Heim, P., Leuchter, R., Veeck, J., Wunderlich, C., Wolf, K., Zimmermann, M., "Biosynthesis of phytochelatin in the fission yeast. Phytochelatin synthesis: a second role for the glutathione synthetase gene of *Schizosaccharomyces pombe*", *Yeast*, 15: 385-396 (1999).
- Alluri, H. K., Ronda, S. R., Settalluri V. S., Bondili, J. S., Suryanarayana, V., Venkateshwar, P., "Biosorption: An eco-friendly alternative for heavy metal removal", *Afr. J. Biotechnol.*, 6(25): 2924-2931 (2007).

Al-Rub, F. A. A., El-Naas, M. H., Benyahia, F., Ashour, I., “Biosorption of nickel on blank alginate beads, free and immobilized algal cells”, **Process Biochem.**, 39: 1767–1773 (2004).

Andrade, L., Keim, C. N., Farina, M., Pfeiffer, W. C., “Zinc detoxification by a cyanobacterium from a metal contaminated bay in Brazil”, **Braz. Arch. Biol. Techn.**, 47 (1): 147-152 (2004).

Anjana, K., Anubha, K., Kiran, B., Nisha, R., “Biosorption of Cr(VI) by immobilized biomass of two indigenous strains of cyanobacteria isolated from metal contaminated soil”, **J. Hazard. Mater.**, 148: 383-386 (2007).

APHA, AWWA, WPCF, “Standart Methods for the examination of water and wastewater”, Washington (1971).

Arar, E. J., Long, S. E., Pfaff, J. D., “Determination of dissolved hexavalent chromium in drinking water, groundwater and industrial wastewater effluents by ion chromatography”, **United States Environmental Protection Agency**, 6-8 (1991).

Arora, N. R., Pandey, G. N., “Heavy metal and health”, **J. Inst. Eng.**, 65: 1-6 (1984).

Arunakumara, K. K. I. U., Xuecheng, Z., “Heavy metal bioaccumulation and toxicity with special reference to microalgae”, **J. Ocean Univ. Chin.**, 7: 60-64 (2008).

Atımtay, A., Yetis, Ü., “Atıksu özellikleri ve analizleri, endüstriyel atıksu arıtımı”, (A. Tanyolaç, S. Çelebi), **TMMOB Kimya Mühendisleri Odası Yayınları**, Ankara, 3: 67-83 (1992).

Awasthia, M., Rai, L. C., “Interactions between zinc and cadmium uptake by free and immobilized cells of *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb”, **Acta Hydrochim. Hydrobiol.**, 34: 20–26 (2006).

Bai, R. S., Abraham, T. E., “Studies on chromium(VI) adsorption–desorption using immobilized fungal biomass”, **Bioresource Technol.**, 87: 17-26 (2003).

Bajguz, A., “Blockade of heavy metals accumulation in *Chlorella vulgaris* cells by 24-epibrassinolide”, **Plant Physiol. Biochem.**, 38: 797-801 (2000).

Baker, J. A., Neilan, B. A., Entsch, B., McKay, D. B., “Identification of cyanobacteria and their toxigenicity in environmental samples by rapid molecular analysis”, **Environ. Toxicol.**, 16: 472-482 (2001).

Bakkaloğlu, I., Butter, T. J., Evison, L. M., Holland, F. S., Hancock, I. C., “The kinetics of metal uptake by microbial biomass: implications for the design of a biosorption reactor”, **Water Sci. Technol.**, 38: 269-277 (1998).

Ball, S. G. Morell, M. K., “From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule”, **Annu. Rev. Plant Biol.**, 54: 207–233 (2003).

Banjerdkij, P., Vattanaviboon, P., Mongkolsuk, S., “Cadmium-induced adaptive resistance and cross-resistance to zinc in *Xanthomonas campestris*”, **Curr. Microbiol.**, 47: 260-262 (2003).

Baptista, M. S., Vasconcelos M. T., “Cyanobacteria metal interactions: Requirements, toxicity, and ecological implications”, **Crit. Rev. Microbiol.**, 32: 127–137 (2006).

Becher, P. G., Beuchat, J., Gademann, K., Jüttner, F., “Nostocarboline: isolation and synthesis of a new cholinesterase inhibitor from Nostoc 78-12A”, **J. Nat. Prod.**, 68: 1793–1795 (2005).

Beveridge, T. J., “The role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization”, **Annu. Rev. Microbiol.**, 43: 147-171(1989).

Bishnoi, N. R., Garima, A. P., “Biosorption of copper from aqueous solution using algal biomass”, **J. Sci. Ind. Res.**, 63: 813–816 (2004).

Bishnoi, N. R., Kumar, R., Kumar, S., Rani, S., “Biosorption of Cr(III) from aqueous solution using algal biomass *Spirogyra* spp.”, **J. Hazard. Mater.**, 145: 142–147 (2007).

Blanco, A., Sanz, B., Llama, M. J., Serra J. L., “Biosorption of heavy metals to immobilised *Phormidium laminosum* biomass”, **J. Biotechnol.**, 69: 227–240 (1999).

Boswell, C. D., Hewitt, C. J., Macaskie, L. E., “An application of bacterial flow cytometry: Evaluation of the toxic effects of four heavy metals on *Acinetobacter* sp. with potential for bioremediation of contaminated waste waters”, **Biotechnol. Lett.**, 20: 857–863 (1998).

Bradford, M. M., “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, **Anal. Biochem.** 72: 248-254 (1976).

Bremner, J., Beattie, J. H., “Metallothionein and the trace metals”. **Ann. Rev. Nutr.**, 10: 63-83 (1990).

Bruns, I., Sutter, K., Menge, S., Neumann, D., Krauss, G. J., “Cadmium lets increase the glutathione pool in bryophytes”, **J. Plant Physiol.**, 158: 79-89 (2001).

Bueno, B. Y. M., Torem, M. L., Molina, F., de Mesquita, L. M. S., “Biosorption of lead(II), chromium(III) and copper(II) by *R. opacus*: Equilibrium and kinetic studies”, **Miner. Eng.**, 21: 65–75 (2008).

Burns B. P., Saker, Martin L., Moffitt, M. C., Neilan B. A., “Molecular detection of genes responsible for cyanobacterial toxin production in the genera *Microcystis*, *Nodularia*, and *Cylindrospermopsis*”, **Methods Mol. Biol.**, 268: 213-222 (2004).

Can, C., Jianlong, W., “Investigating the interaction mechanism between zinc and *Saccharomyces cerevisiae* using combined SEM-EDX and XAFS”, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 79: 293–299 (2008).

Carlos, C., Jesus, C. G., Silvia, D., Felix, G. C., Herminia, L. T., Juan Carlos, T. G., Rafael, M. S., “Interactions of chromium with microorganisms and plants”, **FEMS Microbiol. Rev.**, 25: 335-347 (2001).

Castenholz, R. W., “Phylum BX. Cyanobacteria. Oxygenic Photosynthetic Bacteria”, In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 1: The Archaea and the Deeply Branching and Phototropic Bacteria 2nd Ed., G. Garrity, D. R. Boone, and R. W. Castenholz, **Springer-Verlag**, New York, 474-487 (2001).

Cavet, J. S., Borrelly, G. P. M., Robinson, N. J., “Zn, Cu and Co in cyanobacteria: selective control of metal availability”, **FEMS Microbiol. Rev.**, 27: 165–181 (2003).

Chen, H., Pan, G., Yan, H., Qin, Y., ”Toxic effects of hexavalent chromium on the growth of blue-green microalgae”, **Marine**, 24 (2): 13-18 (2003).

Chojnacka, K., Chojnacki, A., Górecka, H., “Trace element removal by *Spirulina* sp. from copper smelter and refinery effluents”, **Hydrometallurgy**, 73: 147-153 (2004).

Cimino, G., Passerini, A., Toscano, G., “Removal of toxic cations and Cr(VI) from aqueous solution by hazelnut shell”, **Water Res.**, 34 (11): 2955-2962 (2000).

Cirik, S., Gökpınar, Ş., “Plankton Bilgisi ve Kültürü”, **Ege Ü. Su Ürünleri Fak. Yayınları**, İzmir 19 (1993).

Cleuvers, M., Altenburger, R., Rate, H. T., “Combination effect of light and toxicity in algal tests” **J. Environ. Qual.**, 31: 539-547 (2002).

Cobbett, C., Goldsbrough, P., “Phytochelatin and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis”, **Annu. Rev. Plant Biol.**, 53: 159–182 (2002).

Codd, G.A., “Immobilized micro-algae and cyanobacteria”, **Br. Phycol. Soc. Newslett.**, 24: 1–5 (1987).

Collins, Y. E., Stotzky, G., “Heavy metals alter the electrokinetic properties of bacteria, yeasts and clay minerals”, **Appl. Environ. Microbiol.**, 58: 1592-1600 (1992).

Congeevaram, S., Dhanarani, S., Park, J., Dexilin, M., Thamaraiselvi, K., “Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates”, **J. Hazard. Mater.**, 146: 270–277 (2007).

Cooley, J., Howitt, C. A., Vermaas W. F. J., “Succinate:quinol oxidoreductases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: presence and function in metabolism and electron transport”, **J. Bacteriol.**, 182: 714–722 (2000).

Cossich, E. S., Tavares, C. R. G., Ravagnani, T. M. K., “Biosorption of chromium(III) by *Sargassum* sp. biomass”, **Electron. J. Biotechn.**, 5(2): 133-140 (2002).

Courbot, M., Diez, L., Ruotola, R., Chalot, M., Leroy, P., “Cadmium responsive thiols in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*”, **Appl. Environ. Microbiol.**, 70: 7413-7417 (2004).

Cox, P. A., Banack, S. A., Murch, S. J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R. R., Metcalf, J. S., Morrison, L. F., Codd, G. A., Bergman, B., “Diverse taxa of cyanobacteria produce β -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid”, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 102: 5074–5078 (2005).

Crist, D. R., Crist, R. H., Martin, J. R., Watson, J. R., “Ion exchange system in proton-metal reactions with algal cell walls”, **FEMS Microbiol. Rev.**, 14: 309-314 (1994).

Crist, R. H., Martin, J. R., Crist, D. R., “Interaction of metal ions with acid sites of biosorbents peat moss and *Vaucheria* and model substances alginic and humic acids”, **Environ. Sci. Tech.**, 33 (13): 2252-2256 (1999).

Çetinkaya Dönmez, G., Aksu, Z., Öztürk, A., Kutsal, T., “A comparative study on heavy metal biosorption characteristics of some algae”, **Process Biochem.**, 34: 885-892 (1999).

Dabbagh, R., Ghafourian, H., Baghvand, A., Nabi, G. R., Riahi, H., Ahmadi Faghih M. A. “Bioaccumulation and biosorption of stable strontium and ^{90}Sr by *Oscillatoria homogenea* cyanobacterium”, **J. Radioanal. Nucl. Ch.**, 272 (1): 53–59 (2007).

Dakiky, M., Khamis, M., Manassra, A., Mer'eb, M., “Selective adsorption of chromium(VI) in industrial wastewater”, **Adv. Environ. Res.**, 6 (4): 553-540 (2002).

Daniels, M. J., Turner-Cavet, J. S., Selkirk, R., Sun, H., Parkinson, J. A., Sadler, P. J., Robinson, N. J. “Coordination of Zn^{2+} (and Cd^{2+}) by prokaryotic metallothionein: involvement of hisimidazol”, **J. Biol. Chem.**, 273: 22957-22961 (1998).

Davis, T. A., Volesky, B., Mucci, A., “A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae”, **Water Res.**, 37: 4311-4330 (2003).

De Philippis, L. F., Pallaghy, C. K., “Heavy metals: sources and biological effects”, L. C. Rai, J. P. Gaur, and C. J. Soeder, **Scheizerbartsche Press**, Stuttgart, 31-77 (1994).

De Philippis, R., Ena, A., Paperi, R., Sili, C., Vincenzini, M., “Assessment of the potential of *Nostoc* strains from Pasteur Culture Collection for the production of polysaccharides of applied interest”, **J. Appl. Phycol.**, 12: 401–407 (2000).

De Philippis, R., Paperi, R., Sili, C., “Heavy metal sorption by released polysaccharides and whole cultures of two exopolysaccharide-producing cyanobacteria” **Biodegradation**, 18: 181-187 (2007).

De Philippis, R., Paperi, R., Sili, C., Vincenzini, M., “Assessment of the metal removal capacity of two capsulated cyanobacteria, *Cyanospira capsulata* and *Nostoc* PCC 7936”, **J. Appl. Phycol.**, 15: 155-161 (2003).

De Vuyst, L., F. De Vin, F., Vaningelgem, and Degeest, B., “Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria”, **Int. Dairy J.**, 11: 687–708 (2001).

Deng, L., Su, Y., Su, H., Wang, X., Zhu, X., “Sorption and desorption of lead(II) from wastewater by green algae *Cladophora fascicularis*”, **J. Hazard. Mater.**, 143: 220-225 (2007).

Denga, X., Yi, X. E., Liu, G., “Cadmium removal from aqueous solution by gene-modified *Escherichia coli* JM109”, **J. Hazard. Mater.**, 139: 340-344 (2007).

Donmez, G., Aksu, Z., “Removal of chromium(VI) from saline wastewaters by *Dunaliella* species”, **Process Biochem.**, 38: 751–762 (2002).

Doshi, H., Ray, A., Kothari, I. L., “Biosorption of cadmium by live and dead *Spirulina*: IR spectroscopic, kinetics, and SEM studies”, **Curr. Microbiol.**, 54: 213–218 (2007).

Dursun, A. Y., Uslu, G., Cuci, Y., Aksu, Z., “Bioaccumulation of copper(II), lead(II) and chromium(IV) by growing *Aspergillus niger*”, **Process Biochem.**, 38: 1647-1651 (2003).

Edwards, K. A., Macklin, M. G., Miller, J. R., Lechler, P. J., “Sources, distribution and storage of heavy metals in the Rio Pilcomayo, Bolivia”, **J. Geochem. Explor.**, 72: 229-250 (2001).

El-Enany, A. E., Issa, A. A., “Cyanobacteria as a biosorbent of heavy metals in sewage water”, **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, 8: 95-101 (2000).

Elizabeth, O., Webb, E., Dyhrman, S., “Characterization of phosphorus-regulated genes in *Trichodesmium* spp.”, **Biol. Bull.**, 205: 230–231 (2003).

- El-Sheekh, M. M., El-Shouny, W. A., Osman, M. E. H., El-Gammal, E. W. E., "Growth and heavy metals removal efficiency of *Nostoc muscorum* and *Anabaena subcylindrica* in sewage and industrial wastewater effluents", ***Environ. Toxicol. Pharmacol.***, 19: 357–365 (2005).
- El-Sikaily, A., El Nemr, A., Khaled, A., Abdelwehab, O., "Removal of toxic chromium from wastewater using green alga *Ulva lactuca* and its activated carbon", ***J. Hazard. Mater.***, 148: 216-228 (2007).
- EPA, "Current drinking water standards", (2006).
- Evangelou, M. W. H., Daghan, H., Schaeffer, A., "The influence of humic acids on the phytoextraction of cadmium from soil", ***Chemosphere***, 57: 207-213 (2004).
- Fang, H. H. P., Xu, L. C., Chan, K. Y. "Effects of toxic metals and chemicals on biofilm and biocorrosion", ***Water Res.***, 36: 4709–4716 (2002).
- Felicio, A. P., Garcia, O., Bertolini, M. C., Ottoboni, L. M. M., Novo, M. T. M., "The effects of copper ions on the synthesis of periplasmic and membrane proteins in *Acidithiobacillus ferrooxidans* as analyzed by SDS-PAGE and 2D-PAGE", ***Hydrometallurgy***, 71: 165-171 (2003).
- Figueira, E. M. A. P., Lima, A. I. G., Pereira, S. I. A., "Cadmium tolerance plasticity in *Rhizobium leguminosarum* by *viciae*: glutathione as a detoxifying agent", ***Can. J. Microbiol.***, 5: 11-16 (2005).
- Finney, D. J., "Probit analysis", ***Cambridge Univ. Press***, London, 165-175 (1963).
- Floriańczyk, B., "Metallothioneins and its role in metal regulation, binding of reactive oxygen species, apoptosis and cell differentiation", ***J. Pre-Clin. Clin. Res.***, 1 (1): 16-18 (2005).
- Förstner, U., Wittman, G. T. W., "Metal Pollution in the aquatic environment", ***Springer***, Berlin 197-230 (1983).
- Frank C. A. P., "Microcystin-producing cyanobacteria in recreational waters in southwestern Germany", ***Environ. Toxicol.***, 17 (4): 361 – 366 (2002).
- Gallon, J. R., "N₂ fixation in phototrophs: Adaptation to a specialized way of life", ***Plant Soil***, 230: 39–48 (2001).
- Gandhi, H. P., Ray, R. M., Patel, R. M., "Exopolymer production by *Bacillus* species", ***Carbohydr. Polym.***, 34: 323-327 (1997).
- García-Domínguez, M., Reyes, J. C., Florencio, F. J., "NtcA represses transcription of *gifA* and *gifB*, genes that encode inhibitors of glutamine synthetase type I from *Synechocystis* sp. PCC 6803", ***Mol. Microbiol.***, 35: 1192–1201 (2000).

Gardea-Torresdey, J. L., Arenas, J. L., Francisco, N. M. C., Tiemann, K. J., Webb, R., “Ability of immobilised cyanobacteria to remove metal ions from solution and demonstration of the presence of metallothionein genes in various strains”, **J. Hazard. Sub. Res.**, 1: 1-18. (1998).

Gaur, J. P., Rai, L. C., “Heavy metal tolerance in algae. In: Rai, L. C., Gaur, J. P. (Eds.), Algal adaptation to environmental stresses, physiological, biochemical and molecular mechanisms”, **Springer-Verlag**, Berlin, 363–388 (2001).

Gode, F., Pehlivan, E., “Removal of Cr(VI) from aqueous solution by two Lewatit-anion exchange resins”, **J. Hazard. Mater.**, 119: 175-182 (2005).

Golden, S. S., Sherman, L. A., ”Optimal conditions for genetic transformation of the cyanobacterium, *A. nidulans* R2”, **J. Bacteriol.**, 158 (1): 36–42 (1984).

Gramion, F., “Analyses of microbial community structures and functions in heavy metal-contaminated soils using molecular methods”, Ph.D. thesis, **Swiss Federal Institute of Technology of Lausanne**, Switzerland, 1-107 (2003).

Gregor, J., Jančula, D., Maršálek, B., “Growth assays with mixed cultures of cyanobacteria and algae assessed by *in vivo* fluorescence: One step closer to real ecosystems?”, *Chemosphere*, 70 (10): 1873-1878 (2008).

Guimaraes-Soares, L., Pascoal, C., Cassio, F., “Effects of heavy metals on the production of thiol compounds by the aquatic fungi *Fontanospora fusiramosa* and *Flagellospora curta*”, **Ecotox. Environ. Safe.**, 66: 36–43 (2007).

Gupta, R., Ahuja, P., Khan, S., Saxena, R. K., Mohapatra, H., “Microbial biosorbents: Meeting challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions”, **Curr. Sci. India**, 78 (8): 967-973 (2000).

Gupta, V. K., Rastogi, A., “Equilibrium and kinetic modelling of cadmium(II) biosorption by nonliving algal biomass *Oedogonium* sp. from aqueous phase”, **J. Hazard. Mater.**, 153 (1-2): 759-766 (2008).

Gupta, V. K., Rastogi, A., “Sorption and desorption studies of chromium(VI) from nonviable cyanobacterium *Nostoc muscorum* biomass”, **J. Hazard. Mater.**, 154 (1-3): 347-354 (2008).

Gupta, V. K., Shrivastava, A. K., Jain, N., “Biosorption of chromium(VI) from aqueous solutions by green algae *Spirogyra* species”, **Water Res.**, 35: 4079-4085 (2001).

Halttunen, T., Salminen, S., Tahvonen, R., “Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria”, **Int. J. Food Microbiol.**, 114: 30–35 (2007).

Hameed, A., Hasnain, S., “Cultural characteristics of chromium resistant unicellular cyanobacteria isolated from local environment in Pakistan”, *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, 23: 433-441 (2005).

Han, X., Wong, Y. S., Wong, M. H., Tam, N. F. Y., “Biosorption and bioreduction of Cr(VI) by a microalgal isolate, *Chlorella miniata*”, *J. Hazard. Mater.*, 146: 65–72 (2007).

Harada, K. I., “Production of secondary metabolites by freshwater cyanobacteria”, *Chem. Pharm. Bull.*, 52 (8): 889–899 (2004).

Hirata, T., Tanaka, M., Ooike, M., Tsunomura, T., Sakaguchi, M., “Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from *Spirulina platensis*”, *J. Appl. Phycol.*, 12: 435–439 (2000).

İnam, R., Toprak, Ç., “Polarographic determination of some toxic trace elements in fish muscles”, *Fresen. Environ. Bull.*, 14 (6): 489-493 (2005).

Hirschberg, J., Chamovitz, D., “Carotenoids in cyanobacteria”, The molecular biology of cyanobacteria, D. A. Bryant, *Kluwer*, Dordrecht, 559–579 (1994).

İnternet: Filebox, “Environmental Microbiology”, http://filebox.vt.edu/users/chagedor/biol_4684/Methods/bacterial.gif (2008).

İnternet: University of Hamburg Department of Biology, “Cyanophyta”, <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e42/cyanococ.htm> (2008).

İnternet: Arkadien Organization, “Scientist”, <http://arcadien.org/scientists/oscillatoria.jpg> (2008).

İnternet: San Diego State University, “Biology Department”, <http://www.sci.sdsu.edu/classes/biology/bio514/edwards/cyanobacteria%20lecture.ppt> (2008).

İnternet: Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi, “Biyoloji Bölümü”, <http://w3.gazi.edu.tr/web/tahir/alg/resim.htm> (2008).

Jaeckel, P., Krauss, G., Menge, S., Schierhorn, A., Rucknagel, P., Krauss, G. J., “Cadmium induces a novel metallothionein and phytochelatin 2 in an aquatic fungus”, *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 333: 150–155 (2005).

Jensen, T. E., Baxter, M., Rachlin, J. W., Jani, V., “Uptake of heavy metals by *Plectonema boryanum* (Cyanophyceae) into cellular components, especially polyphosphate bodies: an X-ray energy dispersive study”, *Environ. Pollut.*, 27: 119-127 (1982).

Johnson, K. J., “Bacterial adsorption of aqueous heavy metals: molecular simulations and surface complexation models”, **Graduate Program in Civil Engineering and Geological Sciences Notre Dame**, Indiana, 11-15 (2006).

Kaduková, J., Virčíková, E., “Comparison of differences between copper bioaccumulation and biosorption”, **Environ. Int.**, 31: 227–232 (2005).

Kalantari, N., “Evaluation of toxicity of iron, chromium and cadmium on *Bacillus cereus* growth”, **Iranian J. Basic Med. Sci.**, 10 (4): 222-228 (2008).

Kaneko T *et al.*, “Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions”, **DNA Res.**, 3: 109–136 (1996).

Karthikeyan, S., Balasubramanian, R., Iyer, C. S. P., “Evaluation of the marine algae *Ulva fasciata* and *Sargassum* sp. for the biosorption of Cu(II) from aqueous solutions”, **Bioresource Technol.**, 98: 452–455 (2007).

Katircioğlu, H., Aslım, B., Türker, A.R., Atıcı, T., Beyatlı, Y., “Removal of cadmium(II) ion from aqueous system by dry biomass, immobilized live and heat-dried *Oscillatoria* sp. H1 isolated from freshwater (Mogan Lake)”, **Bioresource Technol.**, 99 (10): 4185-4191 (2008).

Kazemipour, M., Ansari, M., Tajrobehkar, S., Majdzadeh, M., Kermani H. R., “Removal of lead, cadmium, zinc, and copper from industrial wastewater by carbon developed from walnut, hazelnut, almond, pistachio shell, and apricot stone”, **J. Hazard. Mater.**, 150: 322–327 (2008).

Kazy, S. K., Sar, P., Singh, S. P., Sen, A. K., D’Souza, S. F., “Extracellular polysaccharides of a copper-sensitive and copper-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain: synthesis, chemical nature and copper binding”, **World J. Microb. Biot.**, 18: 583-588 (2002).

Kiran, B., Kaushik, A., Kaushik, C. P., “Biosorption of Cr(VI) by native isolate of *Lyngbya putealis* (HH-15) in the presence of salts”, **J. Hazard. Mater.**, 141: 662–667 (2007).

Kiran, B., Kaushik, A., Kaushik, C. P., “Response surface methodological approach for optimizing removal of Cr(VI) from aqueous solution using immobilized cyanobacterium”, **J. Chem. Eng.**, 126: 147–153 (2007).

Klimmek, S., Stan, H. J., Wilke, A., Bunke, G., Buchholz, R., “Comparative analysis of the biosorption of cadmium, lead, nickel, and zinc by algae”, **Environ. Sci. Technol.**, 35: 4283-4288 (2001).

Kneer, R., Kutchan, T. M., Hochberger, A., Zenk, M. H., “*Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* contain heavy metal sequestering phytochelatin”, **Arch. Microbiol.**, 157: 305-310 (1992).

Komárek, J., Azevedo, S. M. F. O., Domingos, P., Komárková, J., Tichý, M., “Background of the Caruaru tragedy: a case taxonomic study of toxic cyanobacteria”, **Algol. Stud.**, 103: 9-29 (2001).

Kratochvil, D., Volesky, B., “Advances in the biosorption of heavy metals-reviews”, **Trends Biotechnol.**, 16: 291-300 (1998).

Krheminska, H., Fedorovych, D., Babyak, L., Yanovych, D., Kaszycki, P., Koloczek, H., “Chromium(III) and (VI) tolerance and bioaccumulation in yeast: a survey of cellular chromium content in selected strains of representative genera”, **Process Biochem.**, 40: 1565–1572 (2005).

Kubal, B. S., D’Souza, S. F., “Immobilization of catalase by entrapment of permeabilized yeast cells in hen egg white using glutaraldehyde”, **J. Biochem. Bioph. Methods**, 59: 61–64 (2004).

Kumar, Y. P., King, P., Prasad, V. S. R. K., “Adsorption of zinc from aqueous solution using marine green algae-*Ulva fasciata* sp.”, **Chem. Eng. J.**, 129: 161–166 (2007).

Kumazawa, S., Yumura, S., Yoshisuji, H., “Photoautotrophic growth of a recently isolated N₂-fixing marine non-heterocystous filamentous cyanobacterium, *Symploca* sp. (Cyanobacteria)”, **J. Phycol.**, 37: 482–487 (2001).

Kuo-Ching, L., Yu-Long L., Chung-Yuan C., “Metal toxicity to *Chlorella pyrenoidosa* assessed by a short-term continuous test”, **J. Hazard. Mater.**, 142: 236-241 (2007).

Kuyucak, N., Volesky, B., “Biosorbents for recovery of metals from industrial solutions”, **37th Canadian Chemical Engineering Conference Proceedings**, 283-286 (1987).

Laemmli, U. K., “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”, **Nature**, 227: 680–685 (1970).

Leao, P. N., Teresa, M., Vasconcelos, S. D., Vasconcelos, M. V., “Role of marine cyanobacteria in trace metal bioavailability in seawater”, **Microb. Ecol.**, 53: 104-109 (2007).

Li, S., Jin-Lan, X., Huan, H., Zhen-Yuan, N., Guan-Zhou, Q., “Biosorption mechanism of Cr (VI) onto cells of *Synechococcus* sp.”, **J. Cent. South Univ. T.**, 14 (2): 157-162 (2007).

Liu, H., Fang, H. P., “Characterization of electrostatic binding sites of extracellular polymers by linear programming analysis of titration data”, **Biotechnol. Bioeng.**, 80: 806-811 (2002).

Liu, Y., Lam, M. C., Fang, H. H. P., “Adsorption of heavy metals by EPS of activated sludge”, **Water Sci. Technol.**, 43: 59–66 (2001).

Lodeiro, P., Herrero, R., Sastre de Vicente, M. E., “Batch desorption studies and multiple sorption–regeneration cycles in a fixed-bed column for Cd(II) elimination by protonated *Sargassum muticum*”, **J. Hazard. Mater.**, 137: 1649-1655 (2006).

Lopez-Maury, L., Garcia-Dominguez, M., Florencio, F. J., Reyes, J. C., “A two-component signal transduction system involved in nickel sensing in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803”, **Mol. Microbiol.**, 43: 247-256 (2002).

Loukidou, M. X., Zouboulis, A. I., Karapantsios, T. D., Matis, K. A., “Equilibrium and kinetic modeling of chromium(VI) biosorption by *Aeromonas caviae*” **Colloid. Surface. A**, 242: 93–104 (2004).

Luesch, H., Harrigan, G. G., Goetz, G., Horgen, F. D., “The cyanobacterial origin of potent agents originally isolated from sea hares”, **Curr. Med. Chem.**, 9: 1791–1806 (2002).

Lundgren, P., Söderback, E., Singer, A., Carpenter, E. J., Bergman, B., “Katagnymene: Characterization of a novel marine diazotroph”, **J. Phycol.**, 37: 1052–1062 (2001).

Lyons, E. M., Thiel, T., “Characterization of *nifB*, *nifS*, and *nifU* genes in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*: NifB is required for the vanadium-dependent nitrogenase”, **J. Bacteriol.**, 177 (6): 1570–1575 (1995).

Mabbett, A. N., Lloyd, J. R., “Macaskie, L. E., Effect of complexing agents on reduction of Cr(VI) by *Desulfovibrio vulgaris* ATCC 29579”, **Biotechnol. Bioeng.**, 79: 389–397(2002).

Mack, C., Wilhelmi, B., Duncan, J.R., Burgess, J. E., “Biosorption of precious metals”, **Biotechnol. Adv.**, 25: 264–271 (2007).

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., Clark, D. P., “Brock Biology of Microorganisms (12th Edition)”, **Published by Benjamin Cummings**, 637-743 (2008).

Mala, J.G.S., Nair, B.U., Puvanakrishnan, R., “Bioaccumulation and biosorption of chromium by *Aspergillus niger* MTCC 2594”, **J. Gen. Appl. Microbiol.**, 52: 179-186 (2006).

Malik, A., “Metal bioremediation through growing cells”, **Environ. Int.**, 30: 261-278 (2004).

Matheickal, J. T., Yu, Q. M., “Biosorption of lead(II) and copper(II) from aqueous solutions by pre-treated biomass of Australian marine algae”, **Bioresource Technol.**, 69: 223-229 (1999).

Matsunaga, T., Takeyama, H., Nakao, T., Yamazawa, A., “Screening of marine microalgae for bioremediation of cadmium-polluted seawater”, **J. Biotechnol.**, 70: 33-38 (1999).

Matsunaga, T., Takeyama, H., Nakayama, H., “16S rRNA-targeted identification of cyanobacterial genera using oligonucleotide-probes immobilized on bacterial magnetic particles”, **J. Appl. Phycol.**, 13: 389–394 (2001).

McLean, J., Beveridge, T. J., “Chromate reduction by a pseudomonad isolated from a site contaminated with chromate copper arsenate”, **Appl. Env. Microbiol.**, 67 (3): 1076–1084 (2001).

Megharaj, M., Avudainayagam, S., Naidu, R., “Toxicity of hexavalent chromium and its reduction by bacteria isolated from soil contaminated with tannery waste”, **Curr. Microbiol.**, 47: 51-54 (2003).

Mejare, M., Bulow, L., “Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals”, **Trends Biotechnol.**, 19: 67–73 (2001).

Miersch, J., Grancharov, K., “Cadmium and heat response of the fungus *Heliscus lugdunensis* isolated from highly polluted and unpolluted areas”, **Amino Acids**, 34: 271–277 (2008).

Miersch, J., Tschimedbalshir, M., Barlocher, F., Grams, Y., Pierau, B., Schierhorn, A., Krauss, G. J., “Heavy metals and thiol compounds in *Mucor racemosus* and *Articulospora tetraccladia*”, **Mycol. Res.**, 105: 883-889 (2001).

Mohamed, Z., “Removal of cadmium and manganese by a non-toxic strain of the freshwater cyanobacterium *Gloeotheca manga*”, **Water Res.**, 35 (18): 4405-4409 (2001).

Moreira-Santos, M., Soares, A. M. V. M., Ribeiro, R., “An in situ bioassay for freshwater environments with the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*”, **Ecotox. Environ. Safe.**, 59: 164–173 (2004).

Moreira, S. M., Moreira-Santos, M., Guilhermino, L., Ribeiro, R., “Immobilization of the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* in alginate for *in situ* experiments: Bead stability and suitability”, **Enzyme Microb. Tech.**, 38: 135-141 (2006).

Moreno, J., Vargas, M. A., Madiedo, J. M., Muñoz, J., Rivas, J., Guerrero, M. G., “Chemical and rheological properties of an extracellular polysaccharide produced by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047”, **Biotechnol. Bioeng.**, 67: 283–290 (2000).

Moreno-Garrido I., “Microalgae immobilization: Current techniques and uses”, **Bioresource Technol.**, 99: 3949–3964 (2008).

Morreno-Garrido, I., Campana, O., Lubiañ, L. M., Blasco, J., “Calcium alginate immobilized marine microalgae: Experiments on growth and short-term heavy metal accumulation”, **Mar. Pollut. Bull.**, 51: 823–929 (2005).

Morgan, J. W., Forster, C. F., Evison, L. M., “A comparative study of the nature of biopolymers extracted from anaerobic and activated sludges”, **Water Res.**, 6: 743–750 (1990).

Mortuza, M. G., Takahashi, T., Ueki, T., Kosaka, T., Michibata, H., Hosoya, H., “Toxicity and bioaccumulation of hexavalent chromium in green paramecium, *Paramecium bursaria*”, **J. Health Sci.**, 51: 676–682 (2005).

Nagalakshmi, N., Prasad, M. N. V. “Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*”, **Plant Sci.**, 160: 291–299 (2001).

Neilan B. A., “The molecular evolution and DNA profiling of toxic cyanobacteria”, **Curr. Issues Mol. Biol.**, 4: 1–11 (2002).

Nicolaus, B., Panico, A., Lama, L., Romano, I., Manca, M. C., De Giulio, A., Gambacorta, A. “Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of heterocystous and non-heterocystous cyanobacteria”, **Phytochemistry**, 52: 639–647 (1999).

Nies, D. H., “Microbial heavy-metal resistance”, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 51: 730–750 (1999).

Nubel, U., Garcia-Pichel, F., Muyzer, G., “PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria”, **Appl. Environ. Microb.**, 63: 3327–3332 (1997).

OECD (Organization for the Economic Cooperation and Development), ‘OECD Guideline for testing of chemical: Alga, growth inhibition test’, (1984).

O’Halloran, T. V., Culotta, V. C., “Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions”, **J. Biol. Chem.**, 275: 25057–25060 (2000).

Olafson, R. W., McCubbin, W. D. Kay, C. M. “Primary and secondary-structural analysis of a unique prokaryotic metallothionein from a *Synechococcus* sp. cyanobacterium”, **Biochem. J.**, 251: 691–699 (1988).

Orchard, E., Webb, E. A., Dyhrman, S. T., “Characterization of phosphorus-regulated genes in *Trichodesmium* spp.”, **Biol. Bull.**, 205: 230–231 (2003).

Ouellette A. J. A., Wilhelm, S. W., “Toxic cyanobacteria: the evolving molecular toolbox”, **Front. Ecol. Environ.**, 1 (7): 359–366 (2003).

Özer, A., Özer, D. “Nikel (II) iyonlarının iki kademeli kesikli kapta *Cladophora crispata* ile giderilmesi”, **Turk. J. Eng. Environ. Sci.**, 22: 305-313 (1998).

Paknikar, K. M., Pethkar, A.V., Puranik, P. R., “Bioremediation of metalliferous wastes and products using inactivated microbial biomass”, **Indian J. Biotechnol.**, 2: 426-443 (2003).

Pardhasaradhi, B. V., Ali, A. M., Kumari, A. L., Reddanna, P., Khar, A., “Phycocyanin-mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves down regulation of Bcl-2 and generation of ROS”, **Mol. Cancer Ther.**, 2: 1165–1170 (2003).

Park, D., Yun, Y. S., Ahn, C. K., Park, J. M., “Kinetics of the reduction of hexavalent chromium with the brown seaweed *Ecklonia* biomass”, **Chemosphere**, 66: 939-946 (2007).

Patterson, J. W., “Waste water treatment”, **Science Publishers Inc.**, U.S.A., 43-55, 59-67, 69-81 (1977).

Pena-Castro, J. M., Martinez-Jeronimo, F., Esparza-Garcia, F., Canizares-Villanueva, R. O., “Phenotypic plasticity in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae) in response to heavy metals stres”, **Chemosphere**, 57: 1629-1636 (2004).

Pennella, M. A., “Metal specifity and the mechanism of allosteric regulation in metal sensing metal responsive transcriptional repressors *Staphylococcus aureus* C2rA and *Mycobacterium tuberculosis* NmtR”, PhD Thesis, **Texas A&M University**, 5-6 (2005).

Perales-Vela, H. V., Peña-Castro, J. M., Cañizares-Villanueva, R. O., “Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae”, **Chemosphere**, 64: 1–10 (2006).

Perez-Rama, M., Alonso J. A., Lopez, C. H., Vaamonde, E. T., “Cadmium removal by living cells of the marine microalga *Tetraselmis suecica*”, **Bioresource Technol.**, 84: 265-270 (2002).

Perez-Rama, M., Lopez, C. H., Alonso, J. A., Vaamonde, E. T., “Class III metallothioneins in response to cadmium toxicity in the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch”, **Environ. Toxicol. Chem.** 20: 2061-2066 (2001).

Prego, R., Cobelo-Garcia A., “Twentieth century overview of heavy metals in the Galician Rias, (NW Iberian Peninsula)”, **Environ. Pollut.**, 121: 425–452 (2003).

Priester, J. H., Olson, S. G., Webb, S. M., Neu, M. P., Hersman, L. E., Holden, P. A., “Enhanced exopolymer production and chromium stabilization in *Pseudomonas putida* unsaturated biofilms”, **Appl. Environ. Microb.**, 72 (3): 1988-1996 (2006).

Prescot, G. W., “The algae”, **Michigan State University**, USA 398-436 (1968).

Prescot, H. K., “Microbiology”, 2nd Ed., **WCB Publ.**, USA 60-88 (1990).

Priester, J., H., Horst, A. M., Van De Werfhorst, L. C., Saleta, J. L., Metres, L. A. K., Holden, P. A., “Enhanced visualization of microbial biofilms by staining and environmental scanning electron microscopy”, **J. Microbiol. Meth.**, 68: 577–587 (2007).

Pulz, O., Gross, W., “Valuable products from biotechnology of microalgae”, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 65: 635–648 (2004).

Rangsayatorn, N., Upatham, E. S., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Lanza, G. R., “Phytoremediation potential of *Spirulina* (Arthrospira) *platensis*: biosorption and toxicity studies of cadmium”, **Environ. Pollut.**, 119: 45-53 (2002).

Raungsomboon S., Chidthaisong A., Bunnag B., Inthorn D., Harvey N. W., “Production, composition and Pb²⁺ adsorption characteristics of capsular polysaccharides extracted from a cyanobacterium *Gloeocapsa gelatinosa*”, **Water Res.**, 40: 3759 – 3766 (2006).

Reddy, K. J., Soper, B. W., Tang, J., Bradley, R. L., “Phenotypic variation in exopolysaccharide production in the marine, aerobic nitrogen fixing unicellular cyanobacterium *Cyanothece* sp.”, **World J. Microb. Biot.**, 12: 311-318 (1996).

Rehman, H., Shakirullah, M., Ahmad, I., Shah, S., “Sorption studies of nickel ions onto sawdust of *Dalbergia sissoo*”, **J. Chin. Chem. Soc.**, 53: 1045-1052 (2006).

Riccardi, G., Rossi, E. D. E., Milno, A., “Amino acid biosynthesis and its regulation in Cyanobacteria”, **Plant Sci.**, 63: 135-151 (1989).

Riccillo, P. M., Muglia, C. I., De Bruijn, F. J., Roe, A. J., Booth, I. R., Aguilar, O. M., “Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance”, **J. Bacteriol.**, 182: 1748-1753 (2000).

Richert, L., Golubic, S., Le Guedes, R., Ratiskol, J., Payri, C., Guezennec, J., “Characterization of exopolysaccharides produced by cyanobacteria isolated from polynesian microbial mats”, **Curr. Microbiol.**, 51: 379–384 (2005).

Rippka, R., Detruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, I., Stainer R., “Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria”, **J. Genet. Microb.**, 111: 1-61 (1979).

- Roane, T. M., Josephson, L., Pepper, I. L., “Dual-bioaugmentation strategy to enhance remediation of co-contaminated soil”, **Appl. Environ. Microbiol.**, 67: 3208–3215 (2001).
- Romay, C., Gonzales, R., Ledon, N., Remirez, D., Rimbau, V., “C-phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, antiinflammatory and neuroprotective effects”, **Curr. Protein Pept. Sci.**, 4: 207–216 (2003).
- Romera, E., Gonzalez, F., Ballester, A., Blázquez, M. Z., Muñoz, J. A., “Comparative study of biosorption of heavy metals using different types of algae”, **Bioresource Technol.**, 98: 3344–3353 (2007).
- Sadettin, S., Dönmez, G., “Simultaneous bioaccumulation of reactive dye and chromium(VI) by using thermophil *Phormidium* sp.”, **Enzyme Microb. Tech.**, 41: 175–180 (2007).
- Saeed, A., Iqbal, M., “Bioremoval of cadmium from aqueous solution by black gram husk (*Cicer arietinum*)”, **Water Res.**, 37: 3472–3480 (2003).
- Saeed, A., Iqbal, M., “Immobilization of blue green microalgae on loofa sponge to biosorb cadmium in repeated shake flask batch and continuous flow fixed bed column reactor system”, **World J. Microb. Biot.**, 22: 775–782 (2006).
- Sağ, Y., Akçael, B., Kutsal, T., “Ternary biosorption equilibria of Cr(VI), Cu(II) and Cd(II) on *Rhizopus arrhizus*”, **Sep. Sci. Technol.**, 37 (2): 279–309 (2002).
- Saravanane, R., Sundararajan, T., Sivamurthyreddy, S., “Efficiency of chemically modified low cost adsorbents for the removal of heavy metals from wastewater”, **Indian J. Environ. Health**, 44: 78–81 (2002).
- Sarı, A., Tuzen, M., “Biosorption of Pb(II) and Cd(II) from aqueous solution using green alga (*Ulva lactuca*) biomass”, **J. Hazard. Mater.**, 152 (1): 302–308 (2007).
- Schaeffer, D. J., Krylov, V. S., “Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria”, **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, 45: 208–227 (2000).
- Sedlak, J., Lindsay, R. H. C., “Estimation of total, protein bound and non-protein sulfhydryl groups in tissue with Ellmann’s reagent”, **Anal Biochem.**, 25: 192–205 (1968).
- Seki, H., Suzuki, A., “Adsorption of heavy metal ions to floc-type biosorbents”, **J. Coll. Interf. Sci.**, 249: 295–300 (2002).
- Sera, D., Chattopadhyay, P., Ray, L., “Cr (VI) biosorption by immobilized biomass of *Bacillus cereus* M1 16”, **J. Hazard. Subs. Res.**, 6: 1–23 (2006).

Shah, V., Ray, A., Garg, N., Madamwar, D., "Characterization of the extracellular polysaccharide produced by a marine cyanobacterium *Cyanothece* sp. ATCC 51142, and its exploitation toward metal removal from solutions", **Curr. Microbiol.**, 40: 274–278 (2000).

Sharma, Y. C., "Cr(VI) removal from industrial effluents by adsorption on an indigenous low-cost material", **Colloid. Surface. A.**, 215: 155-162 (2003).

Shashirekha, V., Sridharan, M. R., Swamy, M., "Biosorption of trivalent chromium by free and immobilized blue green algae: Kinetics and equilibrium studies", **J. Environ. Sci. Health A**, 43: 390–401(2008).

Shibata, S., Oda, K., Onodera-Masuoka, N., Matsubara, S., Kikuchi-Hayakawa, H., Ishikawa, F., Iwabuchi, A., Sansawa, H., "Hypocholesterolemic effect of indigestible fraction of *Chlorella regularis* in cholesterol-fed rats", **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, 47: 373–377 (2001).

Shin, M., Nguyen, T., Ramsay, J., "Evaluation of support materials for the surface immobilization and decoloration of amaranth by *Trametes versicolor*", **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 60: 218–223 (2002).

Simonet, M., Berche, P., Fauchere, J. L., Veron, M., "Impaired resistance to *Listeria monocytogenes* in mice chronically exposed to cadmium", **Immunology**, 53: 155-163 (1984).

Singh, N., Asthana, R. K., Kayastha, A. M., Pandey, S., Chaudhary, A. K., Singh, S. P., "Thiol and exopolysaccharide production in a cyanobacterium under heavy metal stress", **Process Biochem.**, 35: 63-68 (1999).

Sivonen, K., Jones, G. J., "Cyanobacterial toxins", Cyanobacteria in Water, I. Chorus and J. Bartram, **Toxic E. F.N. Spon.**, London 41–111 (1999).

Skulberg, O. M. "Microalgae as a source of bioactive molecules – experience from cyanophyte research", **J. Appl. Phycol.**, 12: 341–348 (2000).

Sponza, D. T., "Extracellular polymer substances and physicochemical properties of flocs in steady and unsteady-state activated sludge systems", **Process Biochem.**, 37: 983-998 (2002).

Sprocati, A. R., Alisi, C., Lia Segre, L., Tasso, F., Galletti M., Cremisini, C., "Investigating heavy metal resistance, bioaccumulation and metabolic profile of a metallophile microbial consortium native to an abandoned mine", **Sci. Total Environ.**, 366 (2-3): 649-658 (2006).

Srinath, T., Verma, T., Ramteke, P. W., Garg, S. K., "Chromium(VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria", **Chemosphere**, 48 (4): 427-435 (2002).

Stal, L. J., Moezelaa, R., "Fermentation in *Cyanobacteria*", **FEMS Microbiol. Rev.**, 21 (2): 179-211 (1997).

Stanier, R. Y., Adelberg, E. A., Ingraham, J., "The blue green bacteria", **The Microbial World**, USA 26-36, 43-58, 79-80 (1976).

Strandberg, G. W., Shumate, II S. E., Parrot, J. R., "Microbial cells as biosorbents of heavy metals: Accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*", **Appl. Environ. Microbiol.**, 41: 237-245 (1981).

Subhashini, J., Mahipal, S. V. K., Reddy, M. C., Reddy, M. M., Rachamallu, A., Reddanna, P., "Molecular mechanism in c-phycoerythrin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line K562", **Biochem. Pharmacol.**, 68: 453-462 (2004).

Sudesh K., Taguchi K., Doi Y., "Can cyanobacteria be a potential PHA producer?", **RIKEN Rev.**, 42: 75-76 (2001).

Sudha, B. R., Emilia, T. A., "Biosorption of Cr(VI) from aqueous solution by *Rhizopus nigricans*", **Biores. Technol.**, 79: 73-81 (2001).

Suhail, A., Amjad A. K., Qayyum, H., "Potential of immobilized bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidases in the decolorization and removal of textile dyes from polluted wastewater and dyeing effluent", **Chemosphere**, 60: 291-301 (2005).

Sun, F., Shao, Z., "Biosorption and bioaccumulation of lead by *Penicillium* sp. Psf-2 isolated from the deep sea sediment of the Pacific Ocean", **Extremophiles**, 11: 853-858 (2007).

Sundstrom, D. W., Klei, H. E., "Wastewater treatment", **Prentice Hall, Inc.**, U.S.A., 28-40 (1979).

Surosz, W., Palinska, K. A., "Effects of heavy-metal stress on cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*", **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 48: 40-48 (2004).

Suzuki, T., Miyake, M., Tokiwa, Y., Saegusa, H., Saito, T., Asada, Y., "A recombinant cyanobacterium that accumulates poly-(hydroxybutyrate)", **Biotechnol. Lett.**, 18 (9): 1047-1050 (1996).

Şahin, Y., Öztürk, A., "Biosorption of chromium(VI) ions from aqueous solution by the bacterium *Bacillus thuringiensis*" **Process Biochem.**, 40: 1895-1901 (2005).

Şeker, A., Shahwan, T., Eroğlu, A. E., Yılmaz, S., Demirel, Z., Conk Dalay, M., "Equilibrium, thermodynamic and kinetic studies for the biosorption of aqueous lead(II), cadmium(II) and nickel(II) ions on *Spirulina platensis*", **J. Hazard. Mater.**, 154 (1-3): 973-980 (2008).

Takahama, K., Matsuoka, M., Nagahama, K., Ogawa, T., “Construction and analysis of a recombinant cyanobacterium expressing a chromosomally inserted gene for an ethylene-forming enzyme at the psbAI locus”, **J. Biosci. Bioeng.**, 95 (3): 302-305 (2003).

Thacker, R. W., Starnes, S., “Host specificity of symbiotic cyanobacteria, *Oscillatoria spongelliae*, in marine sponges, *Dysidea* spp.”, **Mar. Biol.**, 142: 643–648 (2003).

Thyagarajan, G., “Leather industry-in pursuit of better image”, **The Hindu Survey Environ.**, 143-145 (1992).

Ting, C. S., Rocap, G., King J., Chisholm S. W., “Cyanobacterial photosynthesis in the oceans: the origins and significance of divergent light-harvesting strategies”, **Trends Microbiol.**, 10 (3): 134-142 (2002).

Trimurtulu, G., Ohtani, I., Patterson, G. M. L., Moore, R. E., Corbet, T. H., Valeriote, F. A., Demchik, L., “Total structures of cryptophycins, potent antitumor depsipeptides from the blue-green alga *Nostoc* sp. strain GSV 224”, **J. Am. Chem. Soc.**, 116: 4729–4737 (1994).

TSE, “İnsani tüketim amaçlı sular standardı”, Ankara, (2005).

Tunali, S., Kiran, I., Akar, T., “Chromium(VI) biosorption characteristics of *Neurospora crassa* fungal biomass”, **Min. Eng.**, 18: 681–689 (2005).

Tüzün, İ., Bayramoğlu, G., Yalçın, E., Başaran, G., Çelik, G., Arıca, Y., “Equilibrium and kinetic studies on biosorption of Hg II, Cd II and Pb II ions onto microalgae *C. reinhardtii*”, **J. Environ. Manage.**, 77: 85-92 (2005).

Urrutia, I., Serra, J. L., Llama, M.J., “Nitrate removal from water by *Scenedesmus obliquus* immobilizes in polymeric foams”, **Enzyme Microb. Technol.**, 17: 200–205 (1995).

Uslu, O., Türkman, A., “Su kirliliği ve kontrolü”, **T.C. Basbakanlık Çevre Genel Müdürlüğü Yayınları.**, Ankara, 1: 331-333, 336 (1987).

Van den Hoek, C., Mann, D. G., Jalans, H. M., ”Algae”, **Cambridge Univ.**, UK 74-97 (1997).

Van Ho, A., Ward, D. M., Kaplan, J., “Transition metal transport in yeast”, **Ann. Rev. Microbiol.**, 56: 237-261 (2002).

Vanhaverbeke, C., Heyraud, A., Mazeau, K., “Conformational analysis of the exopolysaccharide from *Burkholderia caribensis* strain MWAP71: Impact of the interaction with soils”, **Biopolymers**, 69: 480–497 (2003).

Vieira, R. H. S. F., Volesky, B. “Biosorption: a solution to pollution?”, *Int. Microbiol.*, 3: 17–24 (2000).

Viel, P., Palacin, S., Descours, F., Bureau, C., Le Derf, F., Lyskawa, J., Salle, M., “Electropolymerized poly-4-vinylpyridine for removal of copper from wastewater”, *Appl. Surf. Sci.*, 212-213: 792-796 (2003).

Volesky, B., “Advances in biosorption of metals: Selection of biomass types”. *FEMS Microbiol. Rev.*, 14: 291-302 (1994).

Walker, J. T., Verran, J., Boyd, R. D., Percival, S., “Microscopy methods to investigate structure of potable water biofilms”, *Methods Enzymol.*, 337: 243–255 (2001).

Vido, K., Spector, D., Lagniel, G., Lopez, S., Toledano, M. B., “A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*”, *J. Biol. Chem.*, 276: 8469-8474 (2001).

Wang, J. L., Chen, C., “Biosorption of heavy metal by *Saccharomyces cerevisiae*: a review”, *Biotechnol. Adv.*, 24 (5): 427–451 (2006).

White, C., Gadd, G. M., “Accumulation and effects of cadmium on sulphate-reducing bacterial biofilms”, *Microbiology*, 144: 1407-1415 (1998).

Whitton, B. A., Diversity, ecology and taxonomy of the cyanobacteria. In: N.H. Mann and N.G. Carr [Eds] *Photosynthetic Prokaryotes*, **Plenum Press**, New York, 1-51 (1992).

WHO, “Chemical fact sheets, guidelines for drinking water quality, first addendum to third edition, **World Health Organization**, Geneva, 1: 296-460 (2006).

Wilde, E. W., Beneman, J. R. “Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae”, *Biotechnol. Adv.*, 11: 781-812 (1993).

Wingender, J., Neu, T. R., Flemming H. C., “Microbial extracellular polymeric substances: Characterization, structures and function”, **Springer-Verlag**, Heidelberg, 170-200 (1999).

Winter, C., M. Winter, P. Pohl. “Cadmium adsorption by non-living biomass of the semi-macroscopic brown alga, *Ectocarpus siliculosus*, grown in axenic mass culture and localisation of the adsorbed Cd by transmission electron microscopy”, *J. Appl. Phycol.*, 6: 479-487 (1994).

Wu, J., Yu, H.-Q., “Biosorption of 2,4-dichlorophenol by immobilized white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* from aqueous solutions”, *Bioresource Technol.*, 98: 253–259 (2007).

Xia, Y., Liyuan, C., "Study of gelatinous supports for immobilizing inactivated cells of *Rhizopus oligosporus* to prepare biosorbent for lead ions", **The Int. J. Environ. Stud.**, 5: 1-6 (2002).

Yamini, H., Shrivastava, S., Devaraj, N., Balachandran, U. N., "A schiff base complex of chromium(III): an efficient inhibitor for the pathogenic and invasive potential of *Shigella dysenteriae*", **J. Inorg. Biochem.**, 98: 387-392 (2004).

Yan, G., Viraraghavan, T., "Effect of pretreatment on the bioadsorption of heavy metals on *Mucor rouxii*", **Water Res.**, 26: 119-123 (2000).

Yan, G., Viraraghavan, T., "Heavy metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*", **Water Res.**, 37: 4486-4496 (2003).

Ybarra, G. R., Webb, R., "Differential responses of groel and metallothionein genes to divalent metal cations and the oxyanions of arsenic in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942", **Proc. Conf. Hazard. Waste. Res.**, 2: 78-85 (1998).

Yin, H., He, B., Peng, H., Ye, J., Yang, F., Zhang, N., "Removal of Cr(VI) and Ni(II) from aqueous solution by fused yeast: Study of cations release and biosorption mechanism", **J. Hazard. Mater.**, 158 (2-3): 568-576 (2008).

Yoshida, N., Ishii, K., Okuno, T., Tanaka, K., "Purification and characterization of cadmium-binding protein from unicellular alga *Chlorella sorokinian*", **Curr. Microbiol.**, 52: 460-463 (2006).

Young, R. V., "World of Chemistry", **Gale Group**, Michigan 48-77 (2000).

Zainudin, E. N., Mundt, S., Wegner, U., Mentel, R., "Cyanobacteria a potential source of antiviral substances against influenza virus", **Med. Microbiol. Immunol.**, 191: 181-182 (2002).

Zalups, R. K., Ahmad, S., "Molecular handling of cadmium in transporting epithelia", **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 186: 163-188 (2003).

Zang, X., Liu, B., Liu, S., Sun, P., Zhang X., Zhang, X., "Transformation and expression of *Paralichthys olivaceus* growth hormone cDNA in *Synechocystis* sp. PCC6803". **Aquaculture**, 266 (1-4): 63-69 (2007).

Zheng, W., Li X., Wang, F., Yang, Q., Deng P., Zeng G., "Adsorption removal of cadmium and copper from aqueous solution by areca-A food waste", **J. Hazard. Mater.**, 157 (2-3): 490-495 (2008).

Zouboulis, A. I., Loukidou, M. X., Matis, K. A., "Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils", **Process Biochem.**, 39: 909-916 (2004).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÖZTÜRK, Şahlan
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 14.06.1976, Fransa
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0 (312) 202 12 01
 Faks : 0 (312) 212 22 79
 e-mail : sahlan@gazi.edu.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	2002
Lisans	Ankara Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	1999
Lise	Gazi Anadolu Lisesi	1994

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2000-2008	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

A) SCI Tarafından Taranan Bilimsel Dergilerde Yapılan Yayınlar

1. Öztürk, Ş., Aslım, B., Beyatlı, Y., “Biological screening of microalgae isolated from different freshwaters of Turkey: antimicrobial activity, viability and brine shrimp lethality”, *Fresen. Environ. Bull.*, 15 (10): 1232-1237 (2006).

2. Öztürk, Ş., Aslım, B., “Relationship between chromium(VI) resistance and extracellular polymeric substances (EPS) concentration by some cyanobacterial isolates”, *Environ. Sci. Pollut. R.*, 15 (6): 478-480 (2008).
3. Öztürk, Ş., Aslım, B., Uğur, A., “Chromium(VI) resistance and extracellular polysaccharide (EPS) synthesis by *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* and *Methylobacterium* strains”, *ISIJ Int.*, 48 (11): 1654-1658 (2008).
4. Öke, F., Aslım, B., Öztürk, Ş., Altundağ, S., “Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten”, *Food Chem.*, 112 (4): 874-879 (2009).

B) Özeti Basılmış Uluslar Arası Kongre Tebliğleri

1. Onbaşılı, D., Öztürk, Ş., Aslım, B., “Toxicity of three common herbicides used in Turkey on *Chroococcus* sp. H8, *Scenedesmus* sp. S59 and *Artemia salina*”, 6th International Congress of Turkish Society of Toxicology. November 2-5, Antalya, Turkey, (2006).
2. Turgay, O. C., Yuvalı, G., Öztürk, Ş., Onbaşılı, D., Aslım, B., “Characterization of microbial population changes in a crude oil polluted soil dynamics of hydrocarbon degrading bacteria”, International Soil Meeting (ISM) on Soil Sustaining Life on Earth, Managing Soil and Technology. May 22-26, Şanlıurfa, Turkey, (2006).
3. Öztürk, Ş., Aslım, B., “Cr(VI) resistance and exopolysaccharides production of *Pseudomonas* spp.”, II. International Natural Protection Symposium, September, 8-10, Kütahya, Turkey, (2005).
4. Öztürk, Ş., Aslım, B., “Interactions between Cr(VI) resistance and EPS (Exopolysaccharide) production of some Cyanobacteria isolated from different freshwaters of Turkey”, 4th International Congress of Environmental Micropaleontology, Microbiology and Meiobenthology (EMMM), September, 13-18, Isparta, Turkey (2004).

5. Öztürk, Ş., Aslım, B., “Antimicrobial activity of microalgae isolated from different freshwaters of Turkey”, 6th International Conference on Toxic Cyanobacteria, June, 21-27, Bergen, Norway, (2004).

C) Özeti Basılmış Ulusal Kongre Tebliğleri

1. Öztürk, Ş., Aslım, B., “Türkiyenin çeşitli tatlı sularından izole edilmiş bazı siyanobakter izolatlarının Cd(II)’ye toleransları ve *Chroococcus* sp. H4 suşunun Cd(II) biyosorpsiyonu”, XV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 28-31 Ekim, Antalya, (2007).
2. Yaltırak, T., Öztürk, Ş., Allı, H., Aslım, B., “Ülkemizin çeşitli bölgelerinden toplanan bazı makromantarların patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi”, XV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 28-31 Ekim Antalya, (2007).
3. Aslım, B., Öztürk, Ş., Yüksekdağ, Z., “Çeşitli tatlısulardan izole edilen bazı Siyanobakterilerin tuz stresi altında ekzopolisakkarit (EPS) üretimleri”, VII. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, 10-13 Eylül, İnönü Üniversitesi, Malatya, (2007).
4. Öztürk, Ş., Aslım, B., Suludere, Z., “*Synechocystis* sp. BASO444 izolatının Cr(VI) ve Cd(II) biyobirikimi ve biyobirikimde görev alan ekzopolisakkaritlerin incelenmesi”, 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, (2008).
5. Öke, F., Aslım, B., Öztürk, Ş., Altundağ, Ş., “*Satureja cuneifolia* Ten’in uçucu yağ bileşimi, antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesi”, XX. Ulusal Biyokimya Kongresi, 29 Ekim-1 Kasım, Nevşehir, (2008).