

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAKIR (II) BİYOGİDERİMİNDE SURFAKTAN KULLANIMI

Hüseyin Kaan KABADAYI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

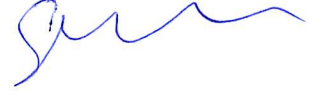
**ANKARA
2018**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAY SAYFASI

Hüseyin Kaan KABADAYI tarafından hazırlanan “**Bakır (II) Biyogideriminde Surfaktan Kullanımı**” adlı tez çalışması 08/06/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı



Jüri Üyeleri

Başkan: Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr. Burcu ERTİT TAŞTAN
Gazi Üniversitesi Sağlık Hizmetleri MYO



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Atila YETİŞEMİYEN
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

08/06/2018



Hüseyin Kaan KABADAYI

ÖZET

Yüksek Lisans

MAYALARLA BAKIR GİDERİMİNDE SURFAKTANLARIN ETKİSİ

Hüseyin Kaan KABADAYI

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY

Bu tez çalışmasında; uzun yıllardır çevreyi tehdit eden bakır (Cu^{+2}) ağır metalinin mayalarla olan biyogiderimine surfaktanların etkisi araştırılmıştır. Bu araştırma için 12 farklı maya izolatının Cu^{+2} giderim kapasiteleri belirlenmiştir. En yüksek bakır giderim kapasitesi, 5 numaralı maya izolatında, 25 ppm Cu^{+2} eklenmiş besiyerinde üçüncü günde % 82.7 olarak bulunmuştur. En yüksek Cu^{+2} giderim kapasitesine sahip maya izolatının genetik tiplendirilmesi yapılmış ve *Kluyveromyces marxianus* olduğu anlaşılmıştır. Seçilen maya ile yapılan biyoakümülsayon çalışmalarında, Cu^{+2} başlangıç konsantrasyonu, surfaktan çeşitleri ve konsantrasyonları ve inkübasyon süresi gibi değişkenlerin etkileri incelenmiştir. Bu deneyler sonucunda, 0.1 mM SDS varlığında, 25 ppm Cu^{+2} içeren besiyerinde, *K. marxianus*, % 97.6 Cu^{+2} giderimi yapmıştır. Biyosorpsiyon çalışmalarında ise yine seçilmiş mayanın giderim kapasitesi ile SDS varlığı, Cu^{+2} başlangıç konsantrasyonu, pH ve zaman değişkenleri arasındaki bağıntı araştırılmıştır. Biyosorpsiyon çalışmaları sonunda 0.1 mM SDS varlığında, 25 ppm Cu^{+2} içeren, pH 9 olan ortamda % 70.7 Cu^{+2} giderimi gözlenmiştir. Tüm bu deneyler sonunda, mayaların biyogiderimde başarılı organizmalar olduğu ve anyonik surfaktanların biyogiderim kapasitelerini arttırdığı ortaya konulmuştur.

Haziran 2018, 86 sayfa

Anahtar Kelimeler: Bakır, Surfaktan, *Kluyveromyces marxianus*, biyogiderim

ABSTRACT

Master Thesis

THE USAGE OF SURFACTANTS FOR COPPER (II) BIOREMOVAL

Hüseyin Kaan KABADAYI

Ankara University
Graduate Scholl of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Proj. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY

In this dissertation thesis, the effects of surfactants on the yeast mediated bioremoval of copper (Cu^{+2}) heavy metals, which has been threatening the environment for many years, was investigated. Cu^{+2} removal capacities of 12 different yeast isolates were determined for this study. The highest copper removal capacity was found in yeast isolate number 5, at the third day % 82.7 in the medium supplemented with 25 ppm Cu^{+2} . The genetic identification of the yeast isolate with the highest Cu^{+2} removal capacity was made and as a result, the yeast isolate was found to be *Kluyveromyces marxianus*. In the bioaccumulation studies, the effects of variables such as initial concentrations of Cu^{+2} , surfactant types and concentrations, and the incubation time were investigated with the selected yeast. As a result of these experiments, in the medium containing 0.1 mM SDS and 25 ppm Cu^{+2} , *K. marxianus* achieved % 97.6 Cu^{+2} bioremoval. On the other hand, in the biosorption studies, The relationship between the Cu^{+2} removal capacity of the selected yeast and the variables including the presence of SDS, the initial concentrations of Cu^{+2} , pH and time were revealed. As a result of these biosorption studies, % 70.7 Cu^{+2} bioremoval was observed in the medium containing 0.1 mM SDS and 25 ppm Cu^{+2} at pH 9. In the light of these results. it was concluded that yeasts are successful organisms at bioremoval and the anionic surfactants increase its bioremoval capacity in general.

June 2017 86 pages

Key Words: Copper, Surfactant, *Kluyveromyces marxianus*, bioremoval

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda beni aydınlatan, çalışmalarımda bana yol gösteren ve destek olan değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY'a, (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı) saygı değer hocalarım Sayın Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ'e ve Sayın Doç. Dr. Nur KOÇBERBER KILIÇ'a, (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı) Araştırma Görevlisi, Sayın Ekin DEMİRAY'a,

her türlü destek ve yardımlarından dolayı sevgili laboratuvar arkadaşlarım Bio. Banu Şeyma CEYHUN, Bio. Gözde BODUR, Bio. Gülşah YALÇINKAYA, ve Uzm. Bio. Selin Işıldak ve Tuğçe Usta'ya,

Çalışmalarım boyunca desteklerini esirgemeyen değerli dostlarım ve hocalarım, Araştırma Görevlisi, Dr. Başar KARACA'ya ve Araştırma Görevlisi Ergin ŞAHİN'e

Hayatım boyunca desteklerini her zaman hissettiğim, bu tez boyunca ilgi ve alakalarını üstümden bir an olsun çekmeyen sevgili anne ve babama, ayrıca tüm bunların yanı sıra her zaman benim için bir yol gösterici olan ağabeyim Mehmet Emre KABADAYI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hüseyin Kaan KABADAYI

Ankara, Haziran 2018

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1 Ağır Metaller	4
2.1.1 Bakır	5
2.2 Ağır Metallerin Giderimi ve Çeşitleri	7
2.2.1 Koagülasyon ve Flokleştirme.....	8
2.2.2 İyon değıştiriciler	8
2.2.3 Klorlama	8
2.2.4 Kapsülleme	8
2.2.5 Nötralizasyon	9
2.2.6 Izgaralar.....	9
2.2.7 Kum tutucular	9
2.2.8 Çölkeltme tankları	10
2.2.9 Filtrasyon havuzları.....	11
2.3 Biyogiderim.....	11
2.3.1 Kompostlaştırma	11
2.3.2 Landfarming.....	12
2.3.3 Katı sıvı biyoreaktörler	14
2.3.4 Biyohavalandırma	14
2.3.5 Biyoagümantasyon	15
2.3.6 Airsparging ve biosparging	17
2.3.7 Fitoremediasyon	19
2.3.8 Biyoyığınlar.....	20

2.4 Ağır Metaller Biyogiderimi ve Direnç Mekanizmaları.....	21
2.5 Mayalar	24
2.5.1 Mayaların mikroskopik özellikleri	24
2.5.2 Mayaların habitatları	25
2.5.3 Mayalarda üreme	25
2.5.4 Kluyveromyces marxianus	26
2.5.4.1 Taksonomisi	27
2.5.4.2 Metabolizma ve fizyoloji.....	29
2.6 Surfaktanlar	31
2.6.1 Anyonik surfaktanlar	32
2.6.2 Katyonik surfaktanlar	33
2.6.3 İyonik olmayan surfaktanlar	33
2.6.4 Zwitteriyonik surfaktanlar.....	33
2.7 Surfaktanlar ile Giderim	34
2.8 Surfaktan Metal Etkileşimi	47
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	54
3.1 Materyal	54
3.1.1 Mikroorganizma Kaynağı	54
3.1.2 Cu (II) Stoğu Hazırlanması	54
3.1.4 Surfaktan Stoklarının hazırlanması	54
3.2 Yöntem	54
3.2.1 Maya seçimi	55
3.2.2 Mikroorganizmanın kültür koşulları	55
3.2.3 Seçilen mayanın tanılanması.....	55
3.3.1 Surfaktan seçimi.....	56
3.3.2 İnkübasyon süresinin ve surfaktanın giderime etkisinin belirlenmesi.....	56
3.3.3 Başlangıç Surfaktan ve Cu (II) konsantrasyonunun birlikte etkisinin belirlenmesi	57
3.3.4 Biyosorpsiyon çalışmaları.....	57
3.4.2 Biyosorpsiyona pH etkisinin belirlenmesi.....	57
3.5 Analiz Yöntemleri	58
3.5.1 Cu (II) analizi	58

3.5.2 Mikrobiyel gelişimin optik yoğunluğunun belirlenmesi.....	58
3.5.3 Cu (II) standardının hazırlanması.....	59
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	60
4.1 Biyoakümülyasyon Çalışmaları.....	60
4.1.1 Yüksek kapasitede Cu (II) gideren maya seçimi.....	60
4.1.2 Surfaktan seçimi.....	61
4.1.3 <i>K. marxianus</i> 'un mikrobiyel gelişimine inkübasyon süresinin etkisi	63
4.1.4 Başlangıç Cu (II) ve SDS konsantrasyonlarının biyogiderimine etkisi.....	64
4.2 Cu(II) Biyosorpsiyon Deneyleri	67
4.2.1 Başlangıç pH değeri ve başlangıç Cu (II) konsantrasyonunun biyosorpsiyon kapasitesine etkisi	67
4.2.2 <i>K. marxianus</i> 'un biyoakümülyasyon ve biyosorpsiyon kapasitelerinin karşılaştırılması.....	70
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	72
KAYNAKLAR	76
ÖZGEÇMİŞ.....	86

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Diamonyum sülfat
<	Küçüktür
>	Büyüktür
°C	Santigrad derece
Ag	Gümüş
Ag^{+2}	İki değerlikli gümüş atom
As^{+3}	Üç değerlikli arsenik atomu
B	Bor
Bi	Bizmut
Cd	Kadmiyum
Cd^{+2}	İki değerlikli kadmiyum atomu
Cm	Santimetre
Cr	Krom
Cu	Bakır
Cu (II)	İki değerlikli bakır atomu
Cu^{+}	Tek değerlikli bakır atomu
Cu^{+2}	İki değerlikli bakır atomu
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Bakır tuzu
Cys	Sistein
Dk	Dakika
G	Gram

Glu	Glutatyon
H ₂ O	Hidrojen dioksit
Hg	Civa
Hg ⁺²	İki değerlikli civa
KH ₂ PO ₄	Mono potasyum fosfat
L	Litre
M	Molar
M ²	Metre kare
Mg	Miligram
mL	Mililitre
Mm	Milimetre
mM	Milimolar
NaOH	Sodyum hidroksit
Ni	Nikel
Ni ⁺²	İki değerlikli nikel
Nm	Nanometre
Pb	Kurşun
Pb ⁺²	İki değerlikli kurşun
pH	Hidrojenin gücü
Ppm	Milyondaki partikül sayısı
Se	Selenyum
Sr	Stronsiyum
T	Sıcaklık
v	Hacim

Zn	Çinko
Zn+2	İki Değerlikli Çinko
Mg	Mikrogram
Mm	Mikrometre

Kısaltmalar

camp	Siklik Adonozin Mono Fosfat
CAS	Kimyasal İçerik Servis Numarası
-CO	Karboksil Grubu
-COOH	Karboksi Hidrojen Grubu
Cryo-SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
CTAB	Setrimonyum Bromür
cys	Sistein
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DSS	Dioktil Sülfosüksinatlar
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
FTIR	Fourier İnfred Spektroskopi
GAC	Darco 20–40 Mesh
GRAS	Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen
H ₂ O	Hidrojen Dioksit
HDPE	Yüksek Yoğunlukta Polietilen
ICI	Imperial Chemical Industries
ITS	Dahili Transkripsiyonlu Spacer
KMK	Kritik Misel Konsantrasyonu

kob	Koloni Oluşturma Birimi
LAS	Linear Alkylbenzene Sulfonates
MT	Melanotropic
myö	Milyon Yıl Önce



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Bakterilerde ağır metal direnç mekanizmaları (Prasad vd. 2006).....	22
Şekil 2.2 Mayaların bakıra (Cu^{2+}) karşı direnç mekanizmaları (Nies 1999)	23
Şekil 2.3 Surfaktanların genel yapısı	32
Şekil 2.4 Surfaktanların çalışma şekilleri (Mao vd. 2015).....	34
Şekil 2.5 Anyonik surfaktanların yüzey yüklerine etkisi (Neu 1996).....	37
Şekil 2.6 Katyonik surfaktanların yüzey yüküne etkisi (Neu 1996).....	39
Şekil 2.7 Surfaktan modifiyeli yüzey ile hücre etkileşimleri.....	40
Şekil 2.8 Surfaktan modifiyeli yüzey ile hücre etkileşimleri (Neu 1996).....	43
Şekil 4.1 0.1mM CTAB içeren besiyerinde Cu (II) giderimi	62
Şekil 4.2 0.1mM SDS içeren besiyerinde Cu (II) giderimi (%).....	63
Şekil 4.4 <i>K. marxianus</i> mayasının 25 mg/L Cu (II), 0.1mM SDS,ve 0.5mM SDS varlığında biyogiderim verimi.....	64
Şekil 4.5 <i>K. marxianus</i> mayasının 50 mg/L Cu (II), 0.1mM SDS,ve 0.5mM SDS varlığında biyogiderim verimi.....	65
Şekil 4.6 <i>K. marxianus</i> mayasının 75 mg/L Cu (II), 0.1mM SDS,ve 0.5mM SDS varlığında biyogiderim verimi.....	65
Şekil 4.7 <i>K. marxianus</i> mayasının 100 mg/L Cu (II), 0.1mM SDS,ve 0.5mM SDS varlığında biyogiderim verimi.....	66
Şekil 4.8.a. <i>K. marxianus</i> 'un pH 3,6 ve 9'da yaklaşık 25 mg/L Cu (II) varlığında zamana bağlı biyosorpsiyon kapasitesi (%), b. <i>K. marxianus</i> 'un pH3, 6 ve 9'da yaklaşık 25, 50, 75, 100 mg/L Cu (II) ve 0.1mM varlığında zamana bağlı biyosorpsiyon kapasitesi (%).....	68
Şekil 4.9.a. <i>K. marxianus</i> 'un pH 9'da yaklaşık 25, 50, 75, 100 mg/L Cu (II) ve zamana bağlı biyosorpsiyon kapasitesi (%), b. <i>K. marxianus</i> 'un pH 9'da yaklaşık 25 mg/L Cu (II) ve 0.1mM SDS varlığında zamana bağlı biyosorpsiyon kapasitesi (%).....	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 Farklı mayaların melaslı besiyerinde gelişimlerinin 3. günlerindeki Cu (II) giderim kapasiteleri	61
Çizelge 4.2 Yaklaşık 25 mg/L Cu (II) ve 0.1 mM surfaktan içeren ve içermeyen melaslı besiyerlerinde görülen mikrobiyel gelişme	62
Çizelge 4.3 SDS içeren ve içermeyen, 25mg/L Cu (II) varlığında melaslı besiyerlerindeki mikrobiyel gelişme (g/L)	63
Çizelge 4.4 Artan konsantrasyonlarda Cu (II) ve SDS varlığında <i>K. marxianus</i> mayasının üçüncü gün mikrobiyel gelişimleri (g/L)	66
Çizelge 4.7 <i>K. marxianus</i> mayasının biyoakümülyasyon ve biyosorpsiyon kapasitelerinin karşılaştırılması (%)	70
Çizelge 4.8 <i>K. marxianus</i> mayasının 1 g/L biyokütlesi ile gerçekleştirilen biyoakümülyasyon ve biyosorpsiyon süreçlerinde gram hücre başına biriktirilen Cu (II) miktarlarının karşılaştırılması	70

1. GİRİŞ

Gün be gün artan nüfusla beraber doğal ortamlardaki kirlilikte aynı hızda artmaktadır. Bu kirliliğin iktisadi ve beşeri hayat üzerinde etkileri yadsınamaz hale gelmiştir. Her ne kadar günümüzde kirliliğin artmaması için üretim süreçleri düzenlense de kirlilik artışının önüne geçilememektedir (Litchfield 2005). Kirlilik küresel bir problemdir. Sürdürülebilir kalkınma önündeki en büyük problemlerden biri yine kirliliktir. Bu durum ayrıca ekosistemin dengesini mahveder, büyük ekonomik kayıplara neden olur ve insan sağlığına zarar verir. Toprak kirliliği, çevreye zararlı endüstriyel atıkların, maden atıklarının, atık giderimine uğramaması, stokların yetersizliği veya sorumsuzca atık giderimi yapılmasından kaynaklanmaktadır (Tabak ve Lens 2015).

Sanayi devriminden sonra hızlı bir artış gösteren ağır metal kirliliğinin önüne geçilmesi bu yüzden dünyamız ve ülkemiz için sürdürülebilir bir kalkınma sağlanması yönünden hayati öneme sahiptir (Litchfield ve Carol 2005).

Ekosistemdeki mikroorganizmalar doğal yaşam döngüleri sırasında ortamdaki atıkları parçaladığı insanlar tarafından uzun yıllardır bilinmektedir. İnsanlar mikroorganizmaların bu özelliklerini, tarımsal, evsel ve endüstriyel faaliyetlerde kullanmışlardır (Litchfield ve Carol 2005). Bununla birlikte, kentleşme ile beraber dünya daha endüstriyel bir sisteme geçtiğinde, insanlar biyolojik giderim konusuna daha aktif bir şekilde ilgi göstermişlerdir. Biyoremediasyon, organik atıkların kontrollü koşullar altında, zararsız bir duruma veya düzenleyici otoriteler tarafından belirlenen konsantrasyon limitlerinin altındaki seviyelere kadar biyolojik olarak indirgendiği süreç olarak tanımlanır (Boopathy 2000). On dokuzuncu yüzyılın sonlarında, atık su arıtma tesisleri kurulmuştur. Fakat buna bugün ki anladığımız manada biyoremediasyon demek güçtür. Biyolojik giderim hareketinin başlangıç kıvılcımı, Raymond ve diğerleri tarafından (1975) "Petrol Ürünleri İçeren Yeraltı Sularında Bakteriyel Etkinliğin Faydaları" adlı çalışma ile beraber çakılmıştır. Petrol varlığı ile bakteriyel varlığın arasındaki ilişkiyi hakkındaki bu çalışma toprağa besin maddelerinin eklenmesinin, yağ giderimini hızlandırdığını ortaya koymuştur. Bu, in situ biyoremediasyonun gelişimine yol açmıştır (Litchfield ve Carol 2005).

Su ortamına, insanlar tarafından madde veya enerji aktarımıyla su kirlenir. İnsan faaliyetleri ile su devamlı olarak kirletilir. İnsan ve hayvan atıkları suyu biyolojik olarak kirletir. Su içerisine karışan atık maddelerdeki organik maddeler bazı bakterilerin yardımı ile biyooksidasyona uğrar ve zararsız duruma dönüştürülür. Bu durumun olabilmesi için bazı bakteri gruplarının ve fazla miktarda çözünmüş oksijenin suda bulunması gerekir. Akarsulara göllere ve denizlere boşaltılan anorganik, organik ve toksik maddelerin oldukça fazla olması durumunda, sudaki oksijen azalmaktadır, oksijen azalmasıyla biyogiderim için bulunması kritik öneme sahip bakteriler ölmekte ve su kaynakları kirlenmektedir. Suyun kirlenmesinde en önemli etken suyun çözücü özelliğidir (Anonim. 1986).

Araştırmacılar, su kirliliği ile hepatit, kolera, dizanteri, kriptosporidiyoz, giardiyaz, diyare ve tifo gibi akut su yoluyla bulaşan hastalıklar arasındaki bağlantıyı rapor etmişlerdir. Su kirliliğinin artan olumsuz etkileri, kanserojen hastalıklara yakalanma riski taşıyan insan sayısında dramatik bir artışa neden olmuştur. Kirliliğin sağlık üzerindeki olağandışı etkileri hakkında bildiklerimizin çoğu, kirlilik seviyelerinin nispeten düşük olduğu gelişmiş ülkelerde rapor edilen verilerden elde edilmektedir. Gelişmekte olan ülkeler gelişmiş ülkelerle göre su kirliliği kaynaklı daha ciddi sağlık riskleri ile karşı karşıyadır. Dünyadaki 2.3 milyar insan suyla ilgili hastalıklardan muzdariptir. Bunların 2.2 milyarlık kısmı gelişmekte olan ülkelerde ki insanlardır. Gelişmiş ülkelerdeki düşük su kirliliği seviyeleri dikkate alındığında, gelişmekte olan ülkelerdeki su kirliliği ile halk sağlığının arasındaki ters ilişki net bir şekilde göze çarpmaktadır (Chen vd. 2004).

Surfaktan kelime olarak "yüzeyi saran" anlamına gelmektedir. Surfaktan maddeler, suyun yüzey gerilimini düşürürler. Bu nedenle "yüzey aktif" maddeler olarak anılırlar (Homberg ve Jönsson 2003). Surfaktanlar su-petrol yüzeyi, hava-su yüzeyi, sıvı-katı yüzeyi gibi farklı yüzeyleri bir araya getiren özellik gösterirler. Surfaktan denince akla, alkil sülfat, alkil sülfonat, etoksillenmiş yağ asitleri, sodyum tuzları gibi organik bileşikler gelir. Surfaktanlar genellikle yapısal olarak uzun bir molekülün ucundaki afinitesi yüksek başka bir grupta karakterize edilir. Surfaktanlar bu grubun kimyasal

durumu açısından iyonik ve iyonik olmayan (noniyonik) olmak üzere nitelendirilirler (Hamme vd. 2006).

Surfaktanların geniş uygulama alanları vardır. Surfaktanlar nötral moleküllerin çözünürleştirilmesinden kozmetik, misel katalizi, ayırma işlemleri, tekstil boyaması gibi bir çok farklı alanda faydalanılır (Nguyen vd. 1986).

Egemen toprak kirleticileri ağır metaller, toksik organik maddeler ve radyonüklidlerdir. (Tabak ve Lens 2015) . Birçok sanayileşmiş ülke ve bölgede toprakta artan ağır metal miktarları bildirilmiştir. Krom, kadmiyum, cıva ve kurşun gibi metaller ve metaloidleri, besin zinciri, kirlenmiş toprak veya suya doğrudan maruz kalma yoluyla ekosistemi ve insan sağlığını tehdit edebilir (Wuana ve Okieimen 2011).

Tüm bu bilgiler ışığında ağır metallerin yeterince iyi ıslah edilmemesi durumunda çevre ve halk sağlığını tehdit edeceği açıktır. Bahsi geçen bu tehditti bertaraf etmenin en uygulanabilir ve verimli yollarından birinin biyogiderim olduğu şüphe götürmez bir gerçektir. Bu noktada bu tez çalışmasının konusu ortaya çıkmaktadır.

Bu çalışmada bakır biyogideriminde surfaktan etkisi araştırılmıştır. Bu süreçte Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan maya izolatlarının bakır giderim kapasiteleri bulunmuştur. Bu kapasitelerin surfaktana bağlı değişimi gözlenmiştir. Bu değişimlerde en iyi pozitif yöndeki değişimi gördüğümüz suşların farklı bakır konsatrasyonları altında verdiği tepkiler incelenmiştir. Arından surfaktanların, bakır konsatrasyonu ve inkübasyon süresine bağlı olarak mayaların biyogiderim yetenekleri üstünde etkileri araştırılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Ağır Metaller

Ağır metaller yoğunluğu 5 g/cm^3 'ten büyük veya atom ağırlığı 50 ve daha büyük olan elementlerdir. Atom ağırlığı 63.546 olan bakır elementi de bir ağır metaldir. Ağır metaller yer kürede doğal olarak bulunurlar. Bozunmaları ve yok edilmeleri mümkün değildir. İnsan vücuduna gıdalar içme suları hatta hava ile girmektedir. İz elementler içerisinde yer alan bazı ağır metaller metabolizmaların işlevselliğini sürdürmesi için hayati öneme sahiptir. Fakat metabolizmaların bu gereksinimleri çok düşük konsantrasyonlarla sınırlıdır. İşte bu yüzden yüksek konsantrasyonlarda, ağır metaller zehirli etkiye sahiptirler. Ağır metallerin biyobirikimi sonucunda organizmalar büyük zararlar görebilir. Biyobirikim, zaman içerisinde organizmalardaki kimyasal konsantrasyonun o kimyasalın doğadaki konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında artması demektir (Tabak vd. 2005). Ağır sanayi tesislerindeki artış ve endüstrileşme süreci doğal ortama yayılan ağır metal miktarında ciddi bir artışa neden olmuştur. Bu artış canlılar üzerinde olumsuz etkiler doğurmuştur (Tabak ve Lens 2015).

Ağır metal kirliliği, metal kaplama tesisleri, madencilik işlemleri ve tabakhane gibi birçok sanayi tesisinin sulu atıklarında görülebilir. Birçok askeri üs ve çevresindeki topraklarda ağır metal kontaminasyonu görülür. Ağır metallerin yeraltı suları ve yüzey sularına da karışma riski bulunmaktadır. Bu faaliyetler sonucu ortaya çıkan bazı metaller kadmiyum (Cd), krom (Cr), kurşun (Pb), cıva (Hg) ve bakır (Cu)'dır. Ağır metaller biyolojik olarak parçalanmaz bu yüzden canlı organizmalarda birikme eğilimindedirler. Bu birikim çeşitli hastalık ve rahatsızlıklara neden olur. Ağır metaller, yeryüzünün kabuğunun doğal bileşenleri olup, birçok canlılar için gerekli olan mikro besin maddeleridirler, ancak yüksek konsantrasyonda şiddetli zehirlenmelere neden olabilir (Gerson 1993).

İyonik türlerdeki ağır metallerin en toksik formları, Cd^{+2} , Pb^{+2} , Hg^{+2} , Ag^{+2} , As^{+3} ve Cu^{+2} gibi daha kararlı oksidasyon durumlarında olanlarıdır ve bunlar ayrışması zor, son derece stabil, biyotoksik bileşikler oluşturma yolunda vücuttaki biyolojik moleküller ile

reaksiyona girmektedir. Çevrede, ağır metaller genellikle pestisitler ve petrol yan ürünleri gibi organik kirleticilerden daha kalıcıdır. Bu tür metaller biyolojik olarak bozunabilir değil, transfer edilebilirler. (Tabak ve Lens 2015)

Ağır metal bir kimyevi halden diğerine değişebilir, bu da hareketliliklerini ve toksisitelerini değiştirir. pH ve iyon değişimine bağlı olarak, bu maddeler topraklarda hareketli hale gelebilir. Bu nedenle, farklı katmanlardaki topraklardan yıkanarak yeraltı sularına karışabilir. Canlı organizmalar için biyoyararlanılabilir hale gelirler (Santona vd. 2006).

Avrupa ve Amerika topraklarına ağır metal birikimi 939.000 t bakır, 783.000 t kurşun, 1.372.000 t çinko ve 22.000 t kadmiyum ulaşmıştır (Hazra vd. 2012).

1999'da, Brezilya'nın Sao Paulo eyaletinde meydana gelen bir olayda ilçedeki en büyük otomobil aküsü üreticilerinden Ajax Akümülatör Endüstrisinin atıklarının 113 çocuğa bulaştığı bildirildi. Bacaların 10 mg/dekilitreden daha yüksek oranda gaz salmakta olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda São Paulo eyaletindeki Paulinia kenti, Shell Chemical tarafından kirletildiği tespit edildi. İncelenen 166 kent sakininin arasından % 53'ünde kronik olmak üzere, % 56'sında vücutlarındaki bakır, çinko, alüminyum, kadmiyum, arsenik ve mangan konsantrasyonlarının sağlıklı sınırın üstünde olduğu gözlenmiştir. Dahası, karaciğer tümörleri, tiroid tümörleri, nörolojik bozukluklar, dermatit, alerjik rinit, gastrointestinal, pulmoner ve hepatik bozukluk insidansı gibi vakaların son zamanlarda ciddi oranda arttığı ortaya konulmuştur (Teixeira vd 2014).

2.1.1 Bakır

Bakır, karaciğerde en yüksek konsantrasyonda bulunmak üzere çeşitli hücreler ve dokularda küçük miktarlarda bulunan önemli bir eser elementtir (Turnlund 1998). Cu^{+} iyonları oksitlenmiş Cu^{+2} veya indirgenmiş Cu^{+} halde bulunabilir (Linder vd. 1996). 1920'lerde hayvanlarda anemi tedavisi için bakır takviyeleri kullanılmıştır. (Hart vd. 1928). 1960'larda insanlarda bakır eksikliği görülmüştür (Cordano vd. 1964). Bakır bir

kofaktör olarak işlev görür ve sitokrom c oksidaz, tirozinaz, p-hidroksifenil piruvat hidrolaz, dopamin beta hidroksilaz, lisil oksidaz ve bakır-çinko superoksidaz dismutaz gibi çeşitli önemli enzimlerin yapısal ve katalitik özellikleri için gereklidir. Bu enzimler, organizmada büyüme, gelişme ve onarım faaliyetleri için gerekli olan bir dizi biyolojik işlemde görev alırlar (Uauy vd. 1998).

Bakır alımı, gıda seçimlerine ve diyetle bağlı olarak büyük ölçüde değişir. Memelilerin en büyük bakır kaynakları tükettikleri sulardan çok yiyeceklerdir. Bakır bakımından zengin gıdalar arasında ıstiridye, karaciğer, fındık, baklagiller, tam tahıllar ve kurutulmuş meyveler bulunur (Sandstead vd. 1995). Kaynak sularında, organik maddeye bağlı olmak kaydı ile ortalama bakır konsantrasyonu 4–10 µg/L'dir (Barceloux 1999). İçme suyu, günlük ortalama bakır ihtiyacının yaklaşık % 6-13'ünü karşılar. İçme suyundaki izin verilen maksimum bakır konsantrasyonu ABD EPA'ya (Çevre Koruma Ajansı) göre 1,3 mg/L'dir (Fitzgerald 1998). Topraktaki bakırın doğal konsantrasyonu yaklaşık 50 mg/L'dir. Bakır, rüzgâr ile taşınan toz, volkanlar ve orman yangınları gibi doğal kaynaklardan ve demir ve çelik üretim tesisleri, belediye atık yakma fırınları gibi antropojenik kaynaklardan salınmaktadır. Atmosferin Bakır içeriği 5 ila 20 ng/m³ arasında değişmektedir (Barceloux 1999).

Bakırın insan vücuduna emilimi, bakırın kimyasal formu ve diyetteki diğer bileşenlerinin varlığı gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Yutulan bakırın % 30-50'si, çoğunlukla Cu⁺² formunda, ince bağırsakta emilir. Geri kalan kısmın çok küçük miktarı da olsa midede emilir. Endojen bakırın bir kısmı sindirim sularından geri emilir. Amino asitler, özellikle histidin, metionin ve sistein, amino asit taşıma sistemi yoluyla emilimi sağlamak için bakıra bağlanır. Azaltılmış ve sitrik, glukonik, laktik ve asetik asitler gibi organik asitler, kolayca emilen bakır ile ligandlar oluştururlar. Öte yandan çinko, demir, molibden, kalsiyum, fosfor ve C vitamini bakır emilimini azaltır (Jacob vd. 1987).

İnce bağırsaktan emilen bakır, genellikle olarak albümine, fakat aynı zamanda transcupreine bağlı olarak kan içinde taşınır (Turnlund vd. 1998). Karaciğer tarafından alınan bakır, hepatositlerde depolanabilir, plazmaya salgılanabilir veya safrada salgılanabilir. Seruloplazmin bir akut faz proteini olarak görev alarak ana bakır

bağlayıcı protein olup, hem bakır Cu^{+2} hem de bakır Cu^{+} durumunda altı bakır atomu içerir. Kandaki dolaşımdaki bakırın yaklaşık % 60-90'ı seruloplazmindir (Harris 1993). Karaciğerden salınan bakır esas olarak dokulara nakledilmek üzere seruloplazmin'e bağlanır, ancak albümin, transkuprein ve histidin'e de bağlanabilir. Metallothionein sitotoksitesiyi önlemek ve bir antioksidan olarak görev yapmak için hücre içi iyonik bakıra bağlanabilir (Luza ve Speisky 1998). *Schizosaccharomyces pombe* ve süperoksit dismutaz (SOD) içermez fakat farklı bir bakır taşıma kompleksi olduğu ortaya konulmuştur. Bakır bağımlı bir gen düzenleyici elemanın varlığı ökaryot modellerinde gösterilmiştir (Kelner vd. 2000).

Normal yetişkin karaciğerinde bakır konsantrasyonu 18 ila 45 $\mu\text{g/g}$ oranındadır (Barceloux 1999), kan ise yaklaşık 6 mg bakır içerir (Linder vd. 1998). Bakır toksisitesine karşı vücudun korunma mekanizması endojen atımıdır. Bakırın emilimi veya atılımı yoluyla bakır homeostatik regülasyonu, vücudun bakır depolarının düzenlenmesi için birincil yöntem gibi görünmektedir (Turnlund vd. 1998). Bakır atılımı için kullanılan başlıca yöntem safra yoludur. Bakırın yaklaşık % 80 karaciğerden atılır ve dışkı yoluyla vücuttan uzaklaştırılır (Winge ve Mehra 1990). Dışkı ile uzaklaştırılan miktarın yaklaşık günde 2 mg olduğu gösterilmiştir (Turnlund vd. 1997). Ter yoluyla vücuttan atılan bakır miktarı günde yaklaşık 50-100 μg 'dır. İdrar yoluyla yaşanan kayıp ise günde yaklaşık 10-50 μg 'dır. İdrar ve ter yoluyla atılan bakır miktarı günlük bakır alınmasının % 3'üne tekabül eder (Turnlund 1999). 19 yaş ve üstü erişkinler için bakır diyetini referans değeri, günde 0.9 mg'dır. Dünya Sağlık Örgütü, minimum alınması gereken bakır miktarını kadınlar için günde 0.6 mg ve erkekler için günde 0.7 mg olarak belirlemiştir. ABD'de bakırın günlük ortalama alımı yaklaşık 1 mg'dır (Turnlund 1988).

2.2 Ağır Metallerin Giderimi ve Çeşitleri

Biyogiderimi tanımlamadan önce aslında giderim nedir sorusunun cevabını vermek gerekir. Giderim; Kimyasal fiziksel ve biyolojik metotlar kullanarak kirlilik ve atıkların toprak, sediment yüzeyi ve kaynak sularından uzaklaştırılmasıdır. (Kocaer ve Alkan 2002, Cing 2002).

2.2.1 Koagölasyon ve Floklaştırma

Kimyasal yumaklaştırma (koagölasyon), sularda bulunan ve kendi ağırlıkları ile çökelemeyen kolloid boyutundaki (10-30µm) katı parçacıkların çeşitli kimyasallar yardımıyla çökebilir hale getirilmesi işleminin kısaca tanımlanmaktadır. Bu işlemin ikinci adımı ise büyüyen taneciklerin birleşerek çökmesinin sağlandığı flokülasyon işlemidir (Robinson vd. 2001)

2.2.2 İyon değiştiriciler

Bir karışımındaki iyonları tutarak bunların yerine bünyelerindeki iyonları veren malzemeler kullanılmaktadır. İyon değişimi hem endüstriyel tekniklerde hem de laboratuvarlar çalışmalarında önem taşımaktadır. Suların yumuşatılmasında ve deiyonizasyonunda iyon değiştiricilerden faydalanılmaktadır. Bunun yanında şeker sanayiinde (şekerin saflaştırılması işleminde) tuz giderici olarak, uranyumun filizlerinden kazanılmasında ve kimyasal analizlerde iyon değiştiricilerden istifade edilir (Fu ve Wang 2011).

2.2.3 Klorlama

Klor dezenfektan etkisi fazla olan bir maddedir. Klorun suda bulunan mikroorganizmalara tam etki edebilmesi için klor dozunun ve klorun sudaki kalma süresinin tam ayarlanması gerekmektedir. İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik ile suda bulunması gereken klor miktarı en fazla 0,5 mg/L olarak belirlenmiştir. Yani suyun litresinde en fazla 0.5 mg serbest klor bulunması anlamına gelmektedir (Nieuwenhuijsen vd. 2000, Deborde ve Von Gunten 2008).

2.2.4 Kapsölleme

Supramoleküler kimyada moleküler kapsölleme, konuk molekülün bir supramoleküler konak molekülünün boşluğu (moleküler kapsöl, moleküler konteyner veya kafes

bileşikleri) içine alınmasıdır. Süper moleküler konakçı molekül örnekleri arasında, carceranlar ve endohedral fullerenler bulunmaktadır.

2.2.5 Nötralizasyon

Oksidasyon-redüksiyon süreci ile zehirli maddeleri yok etmek için oksitleyiciler kullanılır. Kirleticiler, organik bileşikler, iyonik kesikler veya metal iyonları olarak sıralanmaktadır. Oksijen, ozon, permanganat ve hidrojen peroksit gibi belirli sıvı haldeki kimyasallar (oksitler) kullanılır. Oksidanlar matkaplarla zemine taşınmaktadır. (Perkins vd. 1995)

2.2.6 Izgaralar

Izgaralar ile yapılan giderimde kullanıla iki tip ızgara vardır:

Kaba Izgaralar: Kaba ızgaralar koruyucu ekipman olduklarından ilk ünite olarak kullanılmaktadırlar. En yaygın olarak kullanılan kaba ızgaralar: çubuk ızgaralar, elekler ve öğütücülerdir. Endüstriyel atık su arıtma tesislerinde kaba ızgaraların gerekli olmayabileceği gösterilmiştir.

Çubuk ızgaralar: Izgara aralığı 20-40 mm mertebesinde olup evsel atık su ile gelebilecek 40 mm'den iri maddeler (çöp, naylon, ahşap malzeme vb.) ızgarada tutulur ve zaman ayarlı temizleme mekanizması ile taranarak atık sudan uzaklaştırmaktadır. Bu maddelerin arıtma tesisinde mevcut mekanik ekipmanlara zarar vermemesi ve boru hatlarında tıkanıklık yaratmaması için mutlaka uzaklaştırılması gereklidir.

2.2.7 Kum tutucular

Kum olarak tanımlanan maddeler, kum, taş, cüruf gibi yoğunluğu veya çökme hızı, biyolojik arıtmada parçalanabilen organik maddelere kıyasla daha yüksek olan maddelerdir. Yumurta kabukları, kemik parçacıkları, tohumlar, kahve parçacıkları ve

yemek artıkları gibi organik parçacıklar da bu kapsama girmektedir. Kum olarak giderilen maddeler çoğunlukla inert ve oldukça kurudur. Kum kompozisyonu ciddi değişiklikler göstermektedir. Örneğin rutubet % 13-65 arasında, uçucu kısım % 1-56 arasında değişir. Yoğunluğu genellikle 1600 kg/m^3 'dür. 0.2 mm den daha büyük kum parçacıklarının arıtma tesisinin ileriki kademelerinde problem yarattığı bilinmektedir. Bazı durumlarda 0.15 mm çaplı kumların kum tutucularda % 100 giderimi sağlanmakla birlikte, bazen kum boyutu çok daha küçük olabilmekte, 0.15 mm'nin altındaki kumların kum tutucuda sadece % 60 giderimi sağlanmaktadır. Hareketli mekanik ekipmanın aşınmasını önlemek, boru ve kanallarda birikintileri engellemek ve kum birikiminden dolayı çamur çürütücünün temizlenme periyodunu azaltmak için santrifüj, ısı değiştirici ve yüksek basınçlı diyafram pompalardan önce kum tutucuların (kum ayırıcı) kullanılması gerekli görülmektedir. Kum tutucular genellikle kaba ızgaradan sonra ilk çöktürmeden önce kullanılmaktadırlar. Kum tutucuların ızgara ve eleklerden sonra olması, toplanan kumun temizlik ve bertarafını kolaylaştırır.

2.2.8 Çöktürme tankları

Ham atık sudan katıların giderilmesi ile bir miktar askıda katı ve BOI5 de giderilmiş olur, böylece biyolojik arıtma ünitesinde arıtılacak organik yük azaltılmaktadır. Organik yükteki azalma biyolojik arıtma ünitesinde sisteme verilmesi gerekli oksijen miktarının azalmasına, dolayısı ile enerji gereksiniminin ve oluşan fazla aktif çamur miktarının azalmasına neden olmaktadır. Ham atık sudaki köpüğün giderilmesi ile de havalandırma tankı ve çöktürme tanklarında köpük oluşumu azalmış olmaktadır. Belirtilen işlevlerin de sağlanması için genellikle büyük kapasiteli ($>3800 \text{ m}^3 / \text{gün}$) atık su arıtma tesislerinde kurulur. Daha küçük tesislerde eğer ikinci kademe arıtma ünitesi tüm yükü kaldırabilecekse ve köpük, yağ ve yüzen kalıntılar işletme problemi yaratmayacaksa ön çöktürme ünitesi kurulmaz. Damlatmalı filtre, döner biyolojik disk ve batmış biyolojik reaktör gibi ikinci kademe arıtma üniteleri mevcutsa ekipmanın zarar görmemesi için mutlaka sistemin önüne ön çöktürme tankı konulmalıdır. Çöktürme tankları ya dairesel veya dikdörtgen şeklindedirler. Seçim, tesisin büyüklüğü, yerel arazi şartları, mevcut birincil arıtma ekipmanı, ilgili mühendisin kararı, mal sahibinin tercihi, yatırım ve işletme maliyeti gibi faktörlere bağlıdır (Karlsson vd. 2010).

2.2.9 Filtrasyon havuzları

Toprak yıkama Kirlenen toprağı bir çözelti ile taşıyan ve kirleticileri uzaklaştırılacak bir alanda toplayan bir iyileştirme teknolojisidir. Kullanılan sıvı genellikle su, asitler, bazlar, çözücüler veya surfaktanlardır. Kirlenmiş malzemelerle olan sıvı, standart yeraltı suyu ekstraksiyon kuyuları kullanılarak yüzeye pompalanmaktadır. Kirlenmiş araziye tedavi etmek için çok miktarda sıvı gerekmektedir.

2.3 Biyogiderim

Biyolojik metotlarla yapılan giderimin yani biyogiderimin temel tanımı organizmaları kullanarak kirleticileri ortamdan uzaklaştırması ya da nötralize edilmesidir. Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı biyogiderimi: “Tehlikeli maddeleri daha az toksik veya toksik olmayan maddelere indirmek için doğada bulunan organizmaları kullanan işlem” olarak tanımlanmaktadır.

2.3.1 Kompostlaştırma

Besinler, topraktaki mikroorganizmaların havalandırılmasını ve aktivasyonunu arttırmak için karıştırılan toprağı eklenmektedir. Kompostlama ayrı bir kapta yapılır, daha sonra kompostlama tamamlandığında toprağı dahil edilir. Kompost kullanımı ile biyolojik giderme, organik maddenin adsorpsiyon özelliklerine ve mevcut mikroorganizmaların bozunma kabiliyetlerine dayanmaktadır. Kompostlama, toprak biyolojik giderme için en uygun maliyetli teknolojilerden biri olarak kabul edilir ve büyük ve küçük ölçeklerde kullanıma uygundur. Kompostlama kullanımı, çok çeşitli organik kirleticiler ve ağır metaller tarafından kirlenmiş topraklar için çok yönlü bir tekniktir ve çeşitli kirletici maddeler içeren daha kolay iyileştirme için mükemmel bir hale getirir. Organik atıkların toprak iyileştirme amacıyla kullanımı, depolama ve işleme gereksinimini azaltmada yardımcı olmaktadır. Kompostlardan üretilen organik madde, toprak kalitesini ve yapısını iyileştirme avantajını sunar. Kompostlama, öncelikle biyolojik stimülasyon gibi daha hızlı tedavilere kıyasla, mikroplardaki besin

maddelerinin yavaş yavaş serbest bırakılması ve daha fazla zaman gerektirmesi nedeniyle, daha uzun süreyle iyileştirme için kullanılmaktadır (Chen vd. 2015).

2.3.2 Landfarming

Bu teknoloji, toprak yüzeyinden kazınarak alınmış ve periyodik olarak karıştırıp ve havalandırarak işlenmiş kontamine materyalin artırılmasını kapsar. Kontaminantlar, biyotik veya abiyotik reaksiyonlarla degrades edilir, dönüştürülür ve immobilize edilirler. Landfarmingin temeli toprak yüzeyinde bulunan aerobik mikroorganizmlarla atığın kontrol edilmesidir. Bazen, Çok yüzeysel alanlardaki uygulanan alanın en üst noktası hiç kazma uygulaması yapmaya gerek kalmadan basitçe işlenilmektedir.

Bu teknoloji, öncelikle yakıt PAH'ları, halojen olamyan bileşikler VOC'ları, SVOC'ları pestisit ve herbisitlerle kirlenmiş toprağın arıtılmasında kullanılmaktadır.

Teknoloji, basit ve ucuz olmasına rağmen, büyük alan gerektirir ve kontaminantın konsantrasyonundaki düşüş bazen degradesyondan çok buharlaşma yoluyla (havaya kaçma) gerçekleşmektedir.

Landfarming hazırlanışı biyoyığnlara benzese de, kullanılan açısından daha büyük alan gerektirmesi ile ayrılır. Alanın büyüklüğü kontaminasyonun seviyesine ve uygulamanın toprağa hangi derinlikte yapılacağına bağlıdır.

Genel olarak landfarming, 30-45 cm derinliğinde uygulanmaktadır. Toprağın üst yüzeyine bir kg toprak başına 150g çamur yüklenir (20 cm'lik tabakalar halinde) bu nedenle en değişken parametre arıtılmış toprağa ulaşmak için geçen süredir. Landfarm tekniğinde alanın büyük olması ve toprak yüzeyinde bir arıtım olması nedeniyle, alanın tabanı her bölgeye özel hava şartlarına göre dizayn edilmelidir. Arıtım sırasında süzütünün toprağa geçmemesi için 1 mm kalınlığında HDPE astar kullanır. Süzüntü toplama sistemi astarın üstünde delikli borularla sağlanır.

Bir landfarming uygulamasında yapılanlar şunlardır:

- Kontamine materyalin yerleştirilmesi
- Havalandırma
- Sulama
- Besin eklenmesi
- Aritılmış materyalin uzaklaştırılması

Bütün biyomediasyon proseslerinde olduğu gibi yeterli miktarda su mikrobiyel yaşamın sürdürülebilmesi için gereklidir.

Proseste fıskiye tipi sulama sistemi kullanılmaktadır. Önemli olan suyun çok büyük alanlara eşit olarak dağıtılabilesidir. Suyun akış hızı değişken olmakla birlikte 1000 m² alan için saniyede 0,7 L önerilmektedir.

Yavaş difüze olan besin maddeleri tercih edilir. Önce kontimine topraktan alınan bir örnekle landfarming yapılır, daha sonra özellikle ilk haftalarda rutin olarak (iki haftalık aralarla) amonyak, nitrat, o-fosfat ölçümü yapılır. Daha sonra 6 hafta aralıklarla bu ölçümler yapılır. Besinlerin tekrar eklenme zamanını tahmin etmek için azot seviyesine bakılır eğer 50 mg/kg toprak miktarından azsa yeniden ekleme yapılır. Fosfat için bu seviye 5mg/kg topraktır.

Landfarmingdeki havalandırma oldukça basittir. Toprağı sürerek, işleyerek, havalandırma sağlanır. Burada toprağın ne kadar süre ile işleneceği oldukça değişkendir. Sıcak havalarda toprağın sürülmesi hidrokarbonların uzaklaştırılmasında kullanılır. Bu işlem biyodegradasyon değil buharlamadır. Aslında, besin ve su eklenmesi hidrokarbon uzaklaştırılmasını yavaşlatır (Kumar vd. 2011).

2.3.3 Katı sıvı biyoreaktörler

Çamur fazlı ex-situ biyoremediasyonun birçok avantajı bulunur. Pompalama yolu ile suyun eklenmesi materyallerin daha hızlı hareket etmesini sağlar. Bu tip bir prosesin kontrolü çok daha mümkündür. Fermantör ve kemoostatlar hakkında fazla bilgi bulunduğu için bu reaktörler içinde kinetiklerin hesaplanması kolaylaşmıştır. Ayrıca bu reaktörlerde oldukça fazla değişkenlik sağlanabilmektedir. Bir seride birden fazla reaktör bulunması uygulama koşullarının kolay ve hızlıca modifiye edilmesini sağlar. Ayrıca, metabolizma da büyük oranda değiştirilebilir. Bu kadar avantajlı bir sistem olmasına rağmen çok fazla miktarda su gerektirmesi prosesin az tercih edilme nedenlerindendir. Bir başka dezavantaj, İyileştirmesi yapılmak istenen toprak ne kadar fazlaysa, reaktörün de hacminin artmak zorunda olmasıdır (Cicek 2003).

2.3.4 Biyohavalandırma

Oksijen yüzeyin altına ulaştırılarak toprak kontaminantların aerobik biyodegradasyonu sağlanır. Bu olay pasif bir sistemde, doymamış toprağa direk olarak havanın enjeksiyonu ile başlar. Biyo havalandırma sisteminde vadoz zonda hava akışının stimülasyonu sağlanır. Bu teknoloji, yakıtlar, halojen olmayan uçucu organik bileşiklerle (VOC) ve yarı uçucu organik bileşiklerle (SVOC), pestisit ve herbisitlerle kontamine olmuş toprağın arıtımında kullanılmaktadır. Halojen bileşiklerde bu yöntemin başarısı düşüktür. Teknoloji, ilgilenilen kontaminatı doğal olarak parçalayabilen mikroorganizmaları ve bu mikroorganizmaların gelişmesi için besinleri de gerektirir. Ayrıca, mikroorganizmaların ulaşip kullanılabilmesi için kontaminantların toprak parçacıkları tarafından çok sıkı tutulmamaları gerekmektedir.

Biyo havalandırma, suyun çok fazla olduğu ve çok düşük nem oranının olduğu topraklarda çok etkili olamamaktadır. Son olarak, bu teknoloji, yüksek konsantrasyonda inorganik tuz, ağır metal veya organik bileşik içeren alanlarda da mikrobiyal gelişme engelleneceğinden uygulanabilir değildir.

Biyo havalandırma sisteminin temelinde etkili havalandırma yapmak bulunur. Optimum havalandırmanın, degradasyonun maksimum ve buharlaşmanın en az olduğu koşullar için hava akışın sağlanması anahtar noktadır. Sistemin PCP'lerin ve diğer klorlu hidrokarbonların arıtımında kullanımı uygun değildir. Bununla birlikte, trikloroetilen ve fenolün kometobolik olarak oksijen eklenmesi ile degradasyonu da söz konusudur

Gazolin etanol karışımlarının da bu yolla arıtılması için denemeler yapılmamaktadır.

Biyo havalandırma tekniğinde üç fiziksel parametre önem taşır;

- Toprağın gaz geçirgenliği
- Kontaminantın dağılımı
- Oksijenin etki kapsamı

2.3.5 Biyoagümantasyon

Bu yöntemde, kontamine toprak veya suya, spesifik suşlar veya konsorsiyumlar eklenir. Bunun amacı, mikroorganizmaların özel bir organik kirleticiyi biyodegrede etme kapasitelerinin artırılmasıdır.

Biyoagümantasyon, daha çok mikrobiyel degradasyona dirençli kontaminantlar için kullanılır. Bu anlamda biyoagümantasyon, eğer kontamine alanda zaten bulunan mikroorganizmalar ortamda bulunan kirleticiyi parçalayamıyorsa değer kazanır. Bu amaçla yüksek derecede dirençli kontaminantlar için kullanılan biyoagümantasyonda rekombinant DNA teknolojilerinden yararlanılır. Yöntemde, yabancı mikroorganizmalar eklenerek genetik çeşitlilik artırılır. Böylece katabolizma potansiyeli artar ve sonuçta biyodegradasyonla kontaminant giderimi artar.

Ayrıca teknikte kontamine alandan örnek alarak kontaminantı içeren ortamlarda zenginleştirme yapılarak ilk inokülüm elde edilir bu inokülüm yüksek oranlarda biyodegradasyonun artması için kontamine alana uygulanır. Bu yöntemde genetik

çeşitliliğin arttırılması söz konusu değildir. Bu uygulama ile daha çok kontaminantları degrede eden suşların katobilizma potansiyelleri artar.

Bu iki yöntemden başka çok daha pratik olan başka bir yolda karakterize edilmemiş konsorsiyumun kontamine alana uygulanmasıdır. Bu mikroorganizmalar aktif çamurdan veya kompostan alınabilir. Bu yöntemle attirazin saf ve karışık kültürlerle arıtılabilir. Triklorofenol saf kültürle, pentakloroflor aktif çamurlarla uzaklaştırılabilir. Petrol hidrokarbonları için biyoagümantasyonun başarısının az olduğu görülmüştür.

Biyoagümantasyon çalışmaları oldukça yaygındır. Şunu unutmamak gerekir ki yüksek katabolik aktiviteye sahip mikroorganizmaların seçimi çok önem taşısa da bu mikroorganizmaların stres içeren koşullarda yaşamlarının sürdürebilmeleri çok daha önemlidir.

Özel bir alandan izole edilen 660 floresan özellik taşıyan pseudomonasların ripotiplendirilmesinin yapıldığı bir çalışmada, popülasyonun oldukça heterojen olduğu görülmüştür.

690 izolatin 385 ribo tipten ibaret olduğu ve birçok genotipin kararsız olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, 26 ribo tipin daha kararlı olduğu ve bir tanesinin birden fazla örnekte bulunduğu görülmüştür.

Mikro organizma seçerken örneğin yüksek yoğunlukla petrolle kirlenmiş bir alanda bulunan katabolizma yeteneği olan suşların ayrıca bu kontaminanta direnç mekanizmaları da bulunur. Birçok kirleticinin hidrofobik mikroorganizmaların membranlarına zarar verdiği için bu canlılara toksiktir. Bir bakteride böyle bir toksik maddeye cevap farklı şekillerde olmaktadır.

Eğer kontaminant konsantrasyonu düşükse karbon kaynağın azlığı nedeniyle biyoagümantasyon başarısız olur. Bu teori doğruysa besin maddesinin çok az olduğu durumlarda yaşayabilme kabiliyetini taşıyan suşları seçmek önemlidir.

Besin maddesi k tl ğında yaşayabilen mikroorganizmalarla ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Entero bakterilerde besin k tl ğ  sırasında yaşam ile ilgili gen ifadesinin düzenlenmesinde cAMP önem taşır. Denizel ortamlara çok düşük konsantrasyonlarda cAMP eklenmesi, marin bakterilerin düşük besin koşullarında gelişmelerini neredeyse % 100 artırır.

şüphesiz, katabolizma yeteneğ  olan mikroorganizmalarında etkisi böyle artırılır. Biyoag mantasyonda eklenecek mikroorganizma miktarı bölgeye özgüdür. Çeşitli araştırmalarda mikroorganizmaların 10³/kob (gram/toprak) değ rinde toprakta stabilize oldukları gösterilmiştir. Daha fazla miktar protozoanın çok fazla çoğalmasına neden olacağı için istenmez. Ayrıca, hedef substrat miktarı yeteri kadar yüksek olmazsa, bakterilerin gelişmesini destekleyecek yeterli karbon kaynağı da olmaz. Bir ton toprak için 4*10⁶ değ şik prokaryot gerektiğı tahmin edilmektedir. Birçok araştırıcı inokülümün deɡredasyon kapasitesinin inokulum büyüklüğüne dayand ğ n  düşünmektedir.

Kontamine topraklar için gerekli mikroorganizma sayısı oldukça değ şkendir. Bazı nedenler dolayısıyla kirli sular için gerekenden daha fazla inokülüm gerekir. Kontamine toprakta zaten bulunan mikroorganizmalarla olan mücadele protozoa bakteriyofajlardan kurtulamama toprağın kontaminant  tutması ve böylece biyolojik kullanılabilirliğ n az olması (Herrero ve Stuckey 2015).

2.3.6 Airsparging ve biosparging

Bu iki teknik aynı kökenden temel almıştır. Oksijen yüzeyin altına ulaştırılarak kontamine olmuş yer alt  suyu aerobik koşullara getirilerek biyodeɡredasyon sağlanır. Su tabakas n  altına hava enjeksiyonu yoluyla ilerleyen bu teknoloji, yakıtlarla, halojen olmayan bileşiklerle, VOC'ların, SVOC'ların, pestisitler, organik ve herbisitlerle kirletilmiş yer alt  suyunu artırmakta kullanılır.

Ayrıca, airsparging petrol hidrokarbonları gibi uçucu ve parçalanabilir kontaminantlarla kirletilmiş yer altı sularının yeniden kazanımını sağlar. Bu yöntem, basit, ucuz, az donanım gerektiren ve uzun süre bakım ve denetim gerektirmeyen bir iyileştirme çeşididir. Teknoloji, ilgilenilen kontaminantı, doğal olarak parçalayabilen mikroorganizmaları ve besin maddelerini gerektirir. Ayrıca, mikroorganizmaların kontaminantı degrade edebilmesi için kirleticilerin toprakla sıkı sıkıya bağlı olmaması önemlidir.

Airsparging, yüksek konsantrasyonda inorganik tuz, ağır metal veya organik bileşik içeren alanlarda mikrobiyel gelişme engelleneceğinden uygulanabilir değildir.

Teknik bioventinge benzemekle birlikte daha düşük maliyetlidir. Bu sistemde iki önemli faktör bulunur: “Toprağın geçirgenliği ve kontaminantın biyodegradasyona ne kadar uğrayabileceği”.

Toprağın geçirgenliği oksijenin gaz fazından su faza geçebilmesi ve dolayısıyla mikroorganizmalara da ulaşmasını ilgilendirir. Airspargingde daha yüksek hava akışı uygulanır ve bu nedenle buharlaşma yolu ile de kontaminat uzaklaşır. Biosparging de daha düşük hava akışı uygulaması biyodegradasyon yapılmasını sağlar. Biosparging tekniği, orta derecede distile petrolle kontamine olmuş yer altı suyunu arıtmak için kullanılırken, airsparging daha uçucu olan ve mikroorganizmalara daha az zararlı petrol türevleri ile yakın zamanda kirletilmiş yer altı sularını temizlemek için kullanılır.

Bununla birlikte, biyosparging tekniği ile uzun zincirli hidrokarbonlar, n-alkanlar gibi daha kısa zincirli hidrokarbonlara göre daha düşük oranda ve daha uzun zamanda degrade olabilirler. Daha büyük hidrokarbonlar daha az uçucudur ve bu nedenle airspargin tekniğinin bu durumda uygulanması daha az başarılı olur (Johnson vd. 2001).

2.3.7 Fitoremediasyon

İnorganik kirletici fitoremediasyonunda kullanılan yollar ağır metallerin bitkilerde akümüasyonu brassica jeunea toprak üstü dokuları ile Pb, Cr, Cd, Cu, Ni, Zn, Sr, B ve Se gibi metalleri biriktirebilir.

Hiperakümülatör olarak adlandırılan metal biriktiren bitkiler kuru ağırlıklarının % 0,1-1'den daha fazla metali akümüle eder. Hiper akümülatör olmayan bitkilerle karşılaştırılınca hiperakümülatörlerde bu değer 1-3 kat fazla olmaktadır. Hiperakümülatör bitkiler ilk kez 1980'li yıllarda kullanıldı. Bu tip bitkilerin sürgünlerinde köklerinden daha fazla metal bulunur. Bu bitkilerde metal giderim mekanizması ile ilgili olan iki tip protein ve peptit bulunur. MIIT's ve PCs her iki tip protein sisteminde zengindir ve metal stresine dayanıklı yapılardır. Sistein köklerindeki organik kükürt(R-SH) ağır metallerin bağlanacağı bölgeyi oluşturur ve bundan sonra metal bitki dokularına katılır.

Metalotiopenler küçük molekül ağırlığına sahip peptitlerdir. Molekül ağırlıkları 6-7 kDa'dır. Daha çok hayvanlarda, yüksek yapılı bitkilerde, ökaryotik mikroorganizmalarda ve bazı prokaryotlarda bulunurlar.

Bitkiler 60-80 aminoasit içeren MT peptitleri kodlayan genler içerir. İn-vivo koşullarda fazla bilgi olmamasına rağmen in-vitro koşullarda MT'lerin metal afiniteleri şu şekildedir; Bi>Hg>Ag>Cu>Pb>Zn.

Uzun zamanlı Mt-metal kompleksi vakuollere taşınır. Çünkü bu kompleks glutatyonlanabilir.

Fitokeletainler (PCs): Bitkilerde ve bazı küçük funguslarda bulunur. Metal detoksifikasyonu için ağır metalle kompleks oluşturur. Bu kompleks vaküole glutatyon-konjugat pompası ile de taşınmaya da yardım eder. PCs yapısı (γ-glu-Cys)_n X şeklindedir. N (2-11) organizmaya göre değişir, genel formu 2-4 peptit içerir. X genel

olarak glisindir. Alanin veya serinde olabilir. Pcs, glutatyon öncüsünden Pc sintaz enzimi ile sentezlenir.

Ağır metal akümülyasyonunda organik asit ve amino asitlerin kullanımı bitkilerde ağır metal detoksifikasyonu ve in toleransı organik asit ve aminoasit kullanımıyla başarılır. Nikele maruz bırakılan *Alyssum lessbiacum* bitkisinde kslem özünde histidin içeriğinin 36 kat arttığı görülmüştür. Bu sonuç histidinin nikelin bitki dokularına taşınmasında ve biriktirilmesinde nikel histidin kompleksi oluşturarak yardım ettiğini göstermiştir. Metallerde adaptasyonda bitkiler fitosideroforlar salgırlar. Bu salgılar demir eksikliğinde yapırlar. Sentetik kelatörler bu etkiyi taklit ederler. Böyle birçok kelatör kullanılmaktadır. Bunlar içinde EDTA bitkilerde metal aküminasyonunu sağlayan en bilinen kelatördür. EDTA daha çok kurşunla çözülebilir kompleksler oluşturur. EDTA varlığında kurşun alımının brassica juncea mısır ayçiçeği bitkilerinde birkaç kaç arttığı bilinmektedir. EDTA sadece kurşunla kompleks oluşturmaz. Kurşun kadmiyum bakır nikel çinko alımında da kullanılır. EDTA etilen daimin tetra asetik aset DTPA dietilentriaminopentaasetikasit (Tangahu vd. 2011)

2.3.8 Biyoyığınlar

Özellikle kirlenmiş toprakların biyoyileştirilmesinde kirli toprağın bir zar örtü üstünde yığın haline getirildiği ve içine hava beslemesi ile oksijencil mikrobiyel faaliyetin başlatılarak biyolojik olarak arıtımının gerçekleştirildiği yapılardır.

Etkili bir biyoyığın doğru yükseklikte olmalıdır. Fazla miktarda atığın yığılması giderimin verimliliğini düşürür ve havalandırma borularına zarar verir. Biyolojik yığının yüksekliği 3 metreyi aşarsa ikinci bir yığın yapılmalıdır. Yığının eğimi dikkatli ayarlanmalıdır. Çünkü yüksek eğimlerde istenmeyen kirli hava atıkla buluşur.

Kontamine toprağın miktarına göre yığınların büyüklüğü ayarlanır. Yığının kurulacağı alanın büyüklüğü de göz önüne alınmalıdır.

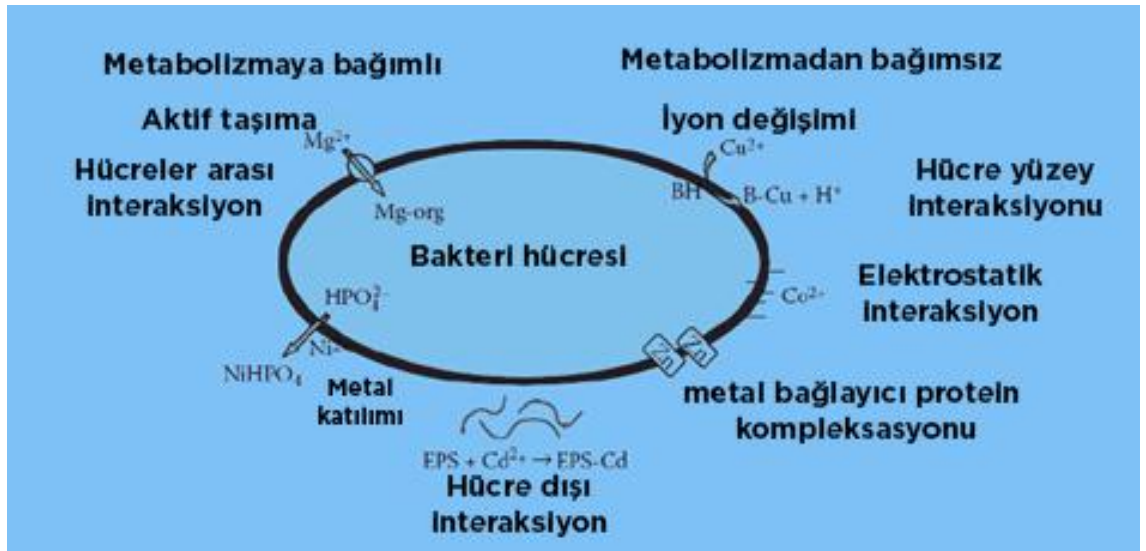
2.4 Ağır Metaller Biyogiderimi ve Direnç Mekanizmaları

Bakterilerin, mayarların ve alglerin toksik metal iyonlarını ortamdan alabileceği pek çok yolu tanımlamışlardır (Gadd 1988, Brierley 1990). Ağır metal iyonları, hücresel yapı içinde tutulabilir ve daha sonra hücresel yapı içinde mevcut olan bağlanma bölgelerine biyosorbe edilebilmektedir. Bu alım yöntemi biyolojik metabolik çevrimden bağımsızdır ve “biyosorpsiyon” veya “pasif alım” olarak bilinmektedir. Ağır metal, hücre metabolik döngüsü yoluya hücre membranı boyunca tutulabildiği gibi hücreye de geçebilir. Bu metal alım modu “aktif alım” olarak adlandırılmaktadır. Hem aktif hem de pasif modlarla metal alımı “biyoakümülyasyon” olarak adlandırılabilir. Büyümekte olan hücreler yoluyla metallerin mikrobiyel giderimi ile ilgili çalışmaların çoğu, metallerin bifazik alımını, yani başlangıç biyosorbsiyon fazının daha yavaş, sonrasında metabolizmaya bağlı aktif metal alımının daha hızlı olduğu ortaya konulmuştur (Garnham vd. 1992, Dönmez ve Aksu 1999). Büyüyen deniz mikroalglerinin kültürlerini kullanan son çalışmalarda, hücre içi Kadmiyum seviyelerinin genellikle biyosorbe edilen miktardan daha yüksek olduğunu göstermektedir (Matsunaga vd. 1999, Perez-Rama vd. 2002). Çoğunlukla hasat edilmiş biyokütle (ölü/ön-muameleye tabi tutulmuş) kullanan çalışmalarda, metal hücrelere alınmaz. Hücre yüzeyinde sadece adsorbe edilir (Torres vd. 1998) ve bu nedenle, biyobirikim kapasitesi küçük bir kısmından yararlanır.

Çeşitli ön muamele edilmiş mikrobiyel biyokütle için yüksek biyosorptif potansiyeli bildirilmiş olmasına rağmen, bu potansiyeli ortaya konulmasının önünde belirli zorluklar bulunmaktadır. Metal biyosorpsiyon çalışmalarının çoğu sentetik metal çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmektedir. (Ahuja vd. 1999, Mehta ve Gaur 2001) Buna karşın gerçek endüstriyel atık su kullanılarak yapılan biyosorpsiyon çalışmalarında, verimin düştüğü ortaya konulmuştur (Corder ve Reeves 1994). Dolayısıyla, mevcut biyosorpsiyon yöntemleri pH, iyonik güç ve organik veya inorganik ligandların varlığı gibi ortam koşullarına duyarlıdır. Biyosorpsiyon ayrıca metal bağlanmada özgüllükten yoksundur (Baudet vd, 1988). Ni gibi bazı metaller daha fazla kirlетici özelliğe sahiptir ve birçok mikroorganizma nispeten düşük Ni bağlama kapasitesine sahiptir (Basnakova ve Macaskie 1977, Chan vd. 1991). Raporlara göre,

ölü biyokütlenin saf Ni sorpsiyonu, sadece 2–5 mg/L’lık Ni konsantrasyonunda % 0.05-0.3’e ulaşmaktadır). Bunun sonucunda büyük miktarlarda aktif çamur ortaya çıkmaktadır. Desorpsiyondan sonra biyokütlenin yeniden kullanılabilir ancak, desorpsiyon özelliği nispeten zayıf kimyasal maddeler kullanıldığında bu mümkündür. Böylece, ortaya çıkan emülsiyonlar metallerin konsantrasyonunda düşüktür ve metallerin nihai geri kazanımlarında problem oluşturmaktadır. Ayrıca, biyokütle maksimum 5–10 sorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonrasında değiştirilmelidir. Bu gerçeklerden dolayı, sadece mikrobiyel biyokütle kullanarak metallerin biyosorptif olarak uzaklaştırılmasına dayanan sürekli bir sistemin geliştirilmesi imkansız görünmektedir (Savvaiddis vd. 1992, Kutsal ve Sağ 1995, Scott vd. 1995, Tsezos vd. 1995).

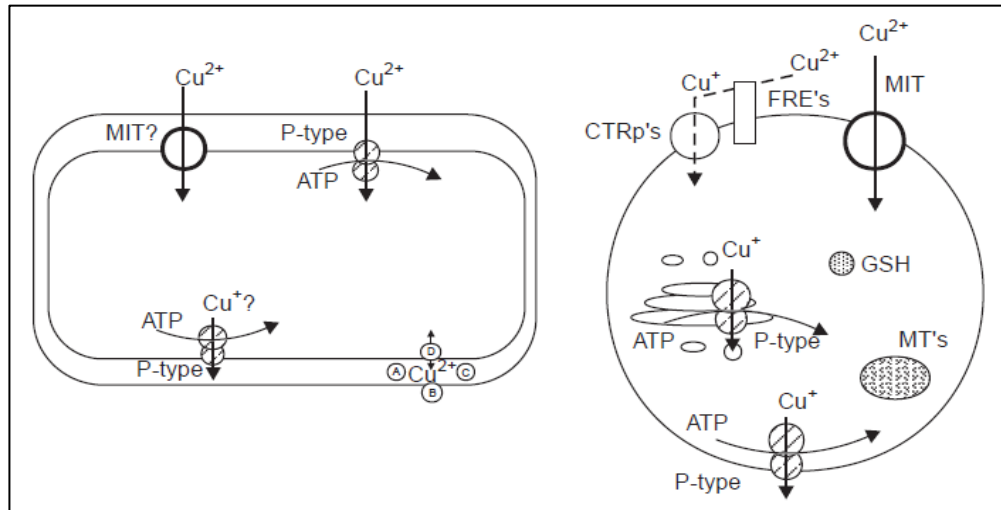
Mikroorganizmaların habitatlarında karşılaştıkları aşırılıklara karşı oluşturdukları mekanizmalara direnç mekanizmaları denir. Ağır metal direnç mekanizmalarıda bunlardan biridir. Plazmid veya koromozomal Dnalarda bulunan genler sayesinde ifade edilen mekanizmalar hücreyi korumaktadırlar (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Bakterilerde ağır metal direnç mekanizmaları (Prasad vd. 2006)

Bu mekanizmalardan biri de ekzopolisakkarit üretimidir. EPS'ler hücre yüzeyini kaplayarak hücrenin ortamda tutunmasını veya dışarıdan gelen molekülleri tutunmasını sağlar. Bu tutuklama yeteneği ağır metal iyonlarına karşı da kullanılabilir. Bazı bakterilerin ağır metaller yoğunluğunun arttığı ortamlarda EPS üretimini arttırdığı gözlenmiştir. Bunun dışında ekstraselüler şelat hücreleri de ağır metalleri hücre dışında bağlayarak detoksifiye eder. Siyanobakterilerde bakır toksitesinin hücreden salgılanan siderophore ile azaltıldığı gösterilmiştir (Madigan vd. 1997).

Bazı ağır metaller ise indirgenerek mikroorganizmaca zararsız hale getirilirler. Bakır formu, biyokütlede bakır alımında önemli bir noktadır. Çift değerli bakır genellikle mikroorganizmalar tarafından monovalent bakır ile indirgenir ve ATPases tarafından hücrelere pompalanır. Bununla birlikte, ilk olarak, ortama tek değerlikli bakırın eklenmesi, bakır biyoyararlanımını ve ATPazlar tarafından pompa işlemini ve sonuç olarak bakır biyosorbsiyonuna hızlandıracaktır. Bakır direncinde oluşan artış bakır giderimini düşürmüştür. *Escherichia coli* gibi bazı mikroorganizmalar özgül bakır direncine sahiptirler. Bu direnci protein membranlarının boyutunu artırarak edinmişlerdir. *Klebsiella pneumoniae* ise bakır alımını azaltmak için fizyolojik bir geçiş adaptasyonuna sahiptir (Şekil 2.2) (Nies 1999).



Şekil 2.2 Mayaların bakıra (Cu^{2+}) karşı direnç mekanizmaları (Nies 1999)

Bazı mikroorganizmalar metalleri hücre içlerinde biriktirirler. Ökaryot mikroorganizmalar vakuollerinde biriktirebilir. Bazı hücreler sentezledikleri Metallothionein benzeri proteinlerle hücre içinde metalleri bağlarlar. Metal bulunan ortamlarda bazı mikroorganizmalar tarafından üretilen metallothioneinler, küçük moleküler ağırlıklı sisteince zengin proteinlerdir. Bazı hücreler metal tuzları şeklinde hücrede metalleri çöktürürler (Aksu ve Dönmez 2000a).

2.5 Mayalar

Mayalar çok ve tek hücreli olarak gözlenebilen ökaryotik yapıda mikroorganizmalardır. Grubun orijinal adı fungi (*Mycota*) doğrudan sapkalı mantarları tanımlamakta fakat 3 ana gruba ayrılmaktadırlar (Madigan vd. 1997).

Filamentli mikrofunguslar (=küfler)

Filamentsiz mikrofunguslar (=maya)

Makrofunguslar (=sapkalı mantarlar)

2.5.1 Mayaların mikroskopik özellikleri

Mayalar tek hücreli canlılardır. Pek çok farklı şekilde gözükabildikleri gibi genelde yuvarlak oval veya silindir şekillindedirler. Boyutları türlerine göre farklılıklar göstermektedir. Mayalar 3 ila 40 mikrometre aralığındaki boyutlarda gözlenmiştir. Boyut olarak bakterilerden büyük olan mayalar mikroskop altında bu özellikleri ile bakterilerden ayırt edilebilirler. Özel koşullar altında mayalar yanyana gelerek uzayan hife benzeyen yapılar oluşturabilmektedir. Mayalarda hücre duvarı bulunur. Bu duvar mayaların şekillerini belirlemektedir. İçerdeği hidrofobik ve hidrofilik yapılar ve diğer kimyasal bileşikler sayesinde bu duvar oldukça dayanıklı ve serttir. Bu kimyasal bileşiklere örnek olarak, glikoz, mannoz az miktarda lipit, çeşitli protein yapıları ve kitin verilebilir. Hücre duvarlarında kalınlıkları türden türe değişmek üzere 3 farklı katman bulunmaktadır. Geçirgenliği yüksek olan sitoplazmik membran aynı zamanda enzimce zengindir. Diğer bir tabaka olan nükleer membran delikli bir yapıya sahiptir.

Bu membranın içersinde çapı 1 mikrometre civarında olan bir çekirdek bulunur. Mayalarda granül ve globüller vardır. Bu yapılar üremenin sonunda doğru sayıca artarken hücre olağan metabolizmasındayken az sayıdadırlar. Bunların yanı sıra maya hücreleri vakuoller, mitokondriumlar ve çok sayıda ribozom da içerir (Braddy ve Duncan 1994).

2.5.2 Mayaların habitatları

Mayalar şeker metabolizmasına sahip olduğu için genelde şeker bulunan ortamlarda görülürler. Doğada meyvelerde çiçek nektarlarında ve ağaç kabuklarında gözlenirler. Nadir olarak simbiyoz yaşadıkları gözlenmiştir. Bu simbiyotik ilişkiler genelde böceklerle kurulmaktadır. Bazı türler hayvanlarda ve insanlarda patojen olarak görülürler. Bunun yanında güçlü hücre duvarları ve fermentasyon yetenekleri sayesinde çok çeşitli habitatlarda görülmüşlerdir (Braddy ve Duncan 1994).

2.5.3 Mayalarda üreme

Mayalarda üreme iki farklı şekilde görülebilir. Bunlar aseksüel üreme ve seksüel üremedir. Askesüel üremede mayalar bölünerek veya tomurcuklanarak ürerler. Bölünerek üreme çoğu mikroorganizmada olduğu gibi maya hücresinin ortasında oluşan bir septum yoluyla olur. Mayaların bu yönleri bakterilere çok benzemektedirler. Tomurcuklanarak üremede ise hücre dış yüzeylerinin birinden ufak bir kabarcık meydana getirir. Bu kabarcık zaman ile gelişerek büyür ve normal bir maya hücresinin fonksiyonlarını kazanmaya başlar. Bunun ardından otoliz yardımıyla ana maya hücresinden kopan tomurcuk gerçek bir maya hücresi oluşturmuş olur. Bazı durumlarda tomurcuklanan hücrenin ana hücreden ayrılmadan yaşamına devam etmesi mümkündür. Bu durumda ikinci hücrede tomurcuklanarak üreyemektedir (Brady ve Duncan 1994).

2.5.4 *Kluyveromyces marxianus*

Konvesksiyonel olmayan mayalardan biri olarak kabul edilen *Kluyveromyces marxianus* son yıllarda daha fazla ilgi görmeye başlamıştır. *K. marxianus* homotik, *hemiascomycetous* mayası olarak tanımlanır. *S. cerevisiae* ile filogenetik olarak ilişkilidir ve daha iyi bilinen *Kluyveromyces lactis* ile kardeş bir türdür (Lachance 1998, Llorente vd. 2000). *K. lactis* ve *K. marxianus*'un en önemli ortak özelliği, laktozu asimile etme ve şekeri karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir. Gıda ürünleri ile olan uzun süreli güvenli ilişkisi, sayesinde Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa Birliği'nde sırasıyla GRAS (Generally Recognized As Safe) ve QPS (Qualified presumption of safety) almasını sağlamıştır. Bu nitelikler, uygulama konusunda birkaç kısıtlama getirmesinin yanında biyoteknoloji sektöründeki potansiyellerini büyük ölçüde artırdığı anlamına gelmektedir. *K. lactis*, başlangıçta laktoz metabolizması üzerine yapılan çalışmalar için *Kluyveromyces* içinde baskın araştırma tütü olmuştur, ancak daha sonra geleneksel olmayan mayalar için bir model olarak kullanılmıştır (Schaffrath ve Breunig 2000, Fukuhara 2006). *K. marxianus* türü, biyoteknoloji uygulamaları için arzu edilen özelliklere sahip olmasından dolayı endüstri tarafından daha yaygın bir şekilde benimsenmiştir. *K. marxianus* türünün anahtar öneme sahip özelliği şekerleri, yani laktoz ve inülin olmak üzere pek çok şekeri asimile etme kapasitesidir. 70 dakikalık tipik jenerasyon üretim süreleriyle son derece hızlı bir büyüme oranına sahiptir. Termotolerant bir suş olan *K. marxianus* 52 °C'ye kadar üreme hızını kaybetmez.

Kluyveromyces marxianus ilk olarak 1888 yılında E.C. Hansen tarafından tanımlanmıştır. Bundan sonra *Saccharomyces marxianus* adı verilmiştir. Bu maya aslen üzümünden izole edilmiştir (Lodder ve Kreger-van Rij 1952). 1922 yılında H. Schnegg tarafından Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)'de depolanmış olan *Zygosaccharomyces marxianus* etiketli özel bir suşun bulunduğu *S. marxianus*'un on suşunu içeren bir tip suş olarak keyfi olarak seçilmiştir. Bu mevcut CBS 712 suşuna karşılık gelir. Söz konusu on suşun bazı farklılıkları, psödomiyosiyum oluşumu, laktozu asimile etme ve fermente etme kapasiteleri kayıt edilmiştir. Sisalın çürüten yaprakları, şeker fabrikası atıkları ve "Lufthefer" (havalandırılmış maya), *S. marxianus* suşlarının

izole edildiği diğer habitatlardır. 1939’da Sacchetti, inulin’in *S. marxianus* tarafından fermente edildiğini gözlemlemiştir. O zamanlar, Jirgensen tarafından 1909’da kefinden izole edilmiş olan *S. marxianus* ve *Saccharomyces fragili*’in çok yakından ilişkili olmasına rağmen, bunlar birbirinden ayrı türler olarak görülmüştür (Lodder ve Kreger-van Rij 1952).

2.5.4.1 Taksonomisi

Moleküler biyolojinin gelişmesinden önce mayaların sınıflandırılması, morfoloji ve fizyolojiye, özellikle de belirli karbon kaynaklarını özümseme kapasitesine dayanıyordu. Bu yöntemlerin bariz kısıtlamaları, moleküler yaklaşımların uygulanmasının önünü açmıştır, ancak farklı teknikler sıklıkla çelişen veya sonuçsuz bulgular ortaya çıkarmıştır. Bununla birlikte, Kurtzman ve meslektaşlarının çalışmaları, mayayı kategorize etmek ve suşlar arasındaki ilişkiyi anlamak için büyük ribozomal altbirimin (25S) rDNA’sının D1/D2 bölgesini kullanarak tiplendirmenin önünü açmıştır. (Kurtzman ve Robnett, 1998). Bu diziye dayalı taksonominin uygulanması, daha önce *Kluyveromyces* cinsinin bir parçası olarak sınıflandırılan mayaların güçlü bir şekilde etkilendiği *Saccharomyces* kladı içinde büyük yeniden organizasyon ve yeniden sınıflandırma ile sonuçlanmıştır (Kurtzman 2003, Lachance 2007). İlginç olarak, *K. thermotolerans* ve orijinal tip olan *K. polysporus* gibi bazı iyi bilinen “*Kluyveromyces*” türleri artık *Kluyveromyces* cinsinin bir parçası değildir ve tip türler artık çok sayıda eşanlamlı olan bir tür olan *K. marxianus*’dur. *K. dobzhanskii*, *K. marxianus* ile en yakından ilişkili olan türdür, ancak bu maya üzerinde, nispeten az sayıda çalışmada kullanılmıştır. *K. marxianus*’a göre fenotipik olarak oldukça farklı görünmektedir.

Kluyveromyces ve *Saccharomyces* cinsleri arasındaki filogenetik ilişkinin anlaşılması, bu cinsler içinde mayanın genetiği ve metabolizması göz önüne alındığında önemlidir. Her iki cins, *Saccharomycotina* veya *hemiascomycetes* içindeki bir alt klad olan “*Saccharomyces*” cinsinin bir parçasıdır. *Candida*, *Debarromyces* ve *Yarrowia* gibi endüstriyel olarak önemli olan diğer *hemiascomycete* mayaları *Saccharomyces* cinsinin dışındadır ve bu nedenle *Saccharomyces* ve *Kluyveromyces*’e göre daha farklı olması beklenilmektedir (Scannell vd. 2007). Ancak *Saccharomyces* cinsinin, 100 milyon yıl

önce (mya) önce meydana gelen bir tüm genom duplikasyon (TGD) olayıyla bölünmüştür (Wolfe ve Shields 1997). *Saccharomyces*'e ait cins ve türler, TGD öncesi ve sonrası, olmaları yönünden ayrılmaktadırlar. *Saccharomyces sensu stricto* türlerinin TGD sonrası ve *Kluyveromyces* türleri, TGD öncesi ortaya çıkıp çıkmadıkları ile tanımlanır. Genlerin ek kopya halinde mevcut olması nedeniyle, TGD geçiren mayalardaki genler, yeni fonksiyonlar geliştirme esnekliğine sahiptir. Bu *S. cerevisiae*'nin evriminde çok önemli olduğuna inanılan bir özelliktir. *Saccharomyces* ve *Kluyveromyces* arasında homolog olan genlerin işlevsel olarak farklılaşmış olabileceği ve bazı durumlarda fonksiyonel korunmanın *Saccharomyces* cinsi dışındaki “az ilişkili” mayalar ile daha yüksek olabileceğini gösterilmiştir. Bu, hücre içindeki metabolik yolları ve süreçleri anlamaya çalışırken önemlidir.

Genom yapısı ve ploidi mayalar içinde değişkendir. *C. albicans* gibi bazı türler diploid iken, *Saccharomyces* gibi haploid, diploid veya poliploid formlarda bulunabilmektedir. *Saccharomyces*'te, çoğu moleküler genetik çalışmalar haploid *S. cerevisiae* ile gerçekleştirilirken, biyoteknolojide kullanılan geleneksel suşlar genellikle diploid veya hatta hibrit türlerdir (Mortimer 2000, Nguyen ve Gaillardin 2005). *Kluyveromyces* cinsindeki türlerin ploidi durumu, çoğu türün homotik olduğu ve çiftleşme gruplarına ayrılabilirdiği belirlenmiş olsa da tam olarak çözülmemiştir (Johannsen 1980). Bununla birlikte, bu özellik, genetik çaprazlamaya (crossover) izin verir ve bazen mutantları birleştirmek ve çift mutasyonların etkisini kontrol etmek için kullanılmaktadır. *K. marxianus*'un bu konuda ki durumu tam anlaşılamamıştır. Geleneksel olarak, türlerin haploid olduğu düşünülmüştür (Johannsen 1980, Steensma vd. 1998) ancak son zamanlardaki moleküler çalışmalar, bunun her zaman doğru olmayabileceğini ve örneğin yaygın olarak kullanılan suşlarda *K. marxianus* CBS6566 suşunun diploid olabileceği önerildiği gösterilmiştir (Ribeiro vd. 2007). Buna karşılık, moleküler yaklaşımlar, diğer suşların haploid olduğunu ve bu nedenle de, *K. marxianus*'un hem haploid hem de diploid formlarının araştırma ve endüstriyel alanlarda yaygın olarak kullanıldığını göstermektedir (Hong vd. 2007, Pecota vd. 2007, Nonklang vd. 2009).

2.5.4.2 Metabolizma ve fizyoloji

Ondokuzuncu yüzyılda Louis Pasteur'ün çalışmaları ile başlayan maya araştırmalarında, mayaların şekerleri kullanılarak mikrobiyel gelişme göstermesi büyük ilgi uyandırmıştır. Biyokimyasal yaklaşımların uzun bir süre yararlanıldıktan sonra, moleküler genetik metodların keşfi ile araştırmalar beklentiler oluşmuştur (Fukuhara 2006). Çeşitli şeker türlerinin ve şekerlerden enerji üretmek için kullanılan yolların, farklı mayaların özelliklerini tanımlamakta ve moleküler yöntemlerin keşfine kadar mayaları sınıflandırmakta önemli bir araç olmuştur. Bu yollar hakkındaki ayrıntılı bilgi sahibi olunması bir mayanın kesin tür tayini için büyük bir öneme sahiptir. Glikoliz ve TCA döngüsünün ana yollarının bileşenleri büyük ölçüde korunmuş olsa da, regülasyonun maya türleri arasında önemli ölçüde farklılaştığının görülmesi şaşırtıcıdır (Flores vd. 2000). Düzenleyici mekanizmalardaki bu farklılıklar, Crabtree, Kluyver, Pasteur ve Custer etkileri olarak adlandırılan ve bunları ilk kez açıklayan bilim insanlarından adlarını alırlar. Bu etkilerin hala tam olarak anlaşılmadığını söylemek doğrudur, ancak mayaların şeker metabolizmasında yapılan araştırmalara genel bir bakışla ve en son verilere dayanarak, mayaların şeker indirgeme yolları anlaşılabilir (Barnett ve Entian 2005). *Kluyveromyces* göz önüne alındığında, *Saccharomyces* ile nispeten yakın filogenetik ilişkinin doğrudan karşılaştırmaları kolaylaştırması beklenebilir, oysa şeker metabolizması söz konusu olduğunda, *Saccharomyces* oldukça eşsizdir. Açıkçası, TGD'ye girmeyen mayaların, farklı selektif baskı altında evrildiği bilinmektedir. Bu yüzden kendi nişlerine uygun özel düzenleyici mekanizmaları geliştirdiler. Bu nedenle *S. cerevisiae* ile *K. marxianus* ya da diğer TGD mayaları ile yapılan çalışmalarda ekstrapolasyon yapıldığında dikkatli olunmalıdır ve diğer çalışmalarda da belirtildiği gibi belki de asıl geleneksel olmayan" maya *S. Cerevisiae*'dir (Blank vd. 2005).

Mayalar, aerobik, fakültatif veya respiro-fermentatif olarak veya vis oksijene karşı durumlarına bağlı olarak fermentatif olarak sınıflandırılabilirler (Merico vd. 2007). *S. cerevisiae* gibi *K. marxianus*, bir respiro mayalayıcı mayadır ve TCA döngüsü yoluyla oksidatif fosforilasyon yoluyla veya etanole fermentasyon yoluyla enerji üretebilir. Crabtree etkisinin mekanistik temeli hala tam olarak anlaşılamamıştır ancak

muhtemelen yüksek glikolitik akı altında enzim doygunluğu, TCA enzimlerinin glikoz baskısı ve spesifik redoks dengeleyici metabolik reaksiyonların ifadesi ile ortaya çıkmaktadır (Merico vd. 2007). *K. lactis* ve *K. marxianus* genellikle Crabtree negatif olarak sınıflandırılrsa da, her iki tür de fermantasyon ile etanol üretimi için gerekli genleri taşırlar ve belirli koşullar altında fermantasyon yaşam tarzını benimseyeceklerdir. *K. marxianus*'un "Crabtree statüsü" literatüründe çelişen raporlar olduğu ve bazı çalışmalarda "Crabtree-effect positive" olarak adlandırıldığı belirtilmelidir. Bu görünürdeki çatışmanın neredeyse tamamı, türlerin karşılaştırmalı çalışmalarının, her bir türün temsilcisi olarak tek bir türü seçmesiyle oluşanyetersizliği yansıtmaktadır. *Saccharomyces* cinsi içindeki 40 maya üzerine yapılan bir çalışma, oksijenin varlığında mayalanmaya yönelik yaygın kabiliyetin, mayanın, NAD (P) / NAD (P) H (redoks) dengesini elde etme kapasitesiyle kısıtlı olduğunu göstermiştir. (Merico vd. 2007). Mevcut kanıtlara dayanarak, yazarlar fermantasyonel bir yaşam tarzı için bir tercihin *Kluyveromyces* de dahil olmak üzere bu maya klonu için atalarının durumunu temsil edebileceğini düşünüyorlar. Bu çalışmada kullanılan *K. marxianus* (CBS 712)'nin özel suşunun, muhtemelen hem türler arasındaki altta yatan farklılıkların hem de varyasyonun bir yansıması olan *K. lactis* (CBS 2359) suşuna kıyasla fermentasyonla önemli ölçüde daha iyi olduğu her iki türün içinde ortaya konulmuştur. *Kluyveromyces*'in temel olarak Crabtree negatif mayaları ve tercihen TCA döngüsüne ve optimum enerji üretimine doğru doğrudan metabolizmasının olduğu sonucuna varılmaktadır. Bununla birlikte, *K. marxianus*, eş zamanlı fermentasyon ve solunum gerçekleştirme kapasitesine sahiptir ve bu yollar arasındaki kesin denge, spesifiktir. Etanol veya biyokütle üretimi arasında çok açık bir bağlantı vardır. Örneğin, Merico ve arkadaşları, *S. cerevisiae* için 0.13 g/g (şeker gramı başına gram biyokütle) ve 0.40 g/g için biyokütle verimi rakamlarını rapor ediyorlar. *K. lactis* (Merico vd. 2007). Biyokütlenin önemli olduğu uygulamalar için, maya türleri arasındaki bu fark kesinlikle önemlidir. Bununla birlikte, aynı zamanda, Crabtree etkisinin birçok ilgili faktör kaynaklandığı ve bunların tüm türlere eşit olarak uygulanamayacağı da düşünülmelidir. Böylece, aşırı Crabtree pozitif ve Crabtree negatif mayalar arasında bir spektrum vardır ve etkinin gücü dışsal faktörlerden etkilenebilir. Bahsedildiği gibi, etkinin gücünde varyasyon, türler içinde bile ortaya çıkmakta olup, bu durum *K. marxianus* suşlarının neden çok etkili etanol üreticileri olduğunu açıklamaktadır (Hong vd. 2007, Nonklang

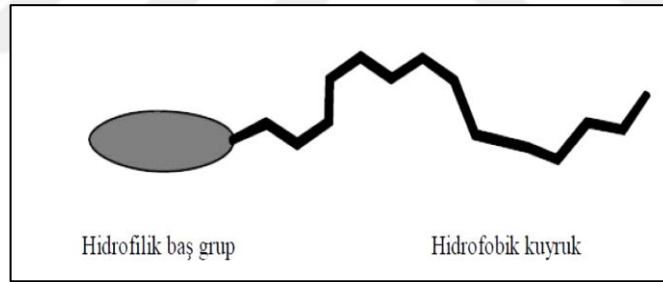
vd. 2008). Metabolizma göz önüne alındığında, *K. marxianus*'un herhangi bir ökaryotik mikropun en hızlı büyüme oranlarından birine sahip olması, örneğin bir kemostat çalışmasının, *K. marxianus* CBS 6566'nın özgül büyüme oranını (μ_{max}) 0.6 sa⁻¹ (iki katına çıkma süresi) olarak kaydetmesi dikkate değerdir. 70 dakika) ve evenmax 0.8 h⁻¹ ile daha hızlı büyüyen bir varyant seçilebilir (Groeneveld vd. 2009). Özellikle *K. marxianus*'un yüksek metabolik akışı, on dört maya türünün bir mukayesesinde gözlenmiştir.

K. lactis ve *K. marxianus*'un tanımlayıcı bir özelliğinin, laktozu bir karbon kaynağı olarak kullanma kapasitesi olduğu, *S. cerevisiae*'de bulunmayan bir özellik olduğu belirtilmiştir. Laktoz kullanımı, *K. lactis*'te yoğun olarak çalışılmış ve *K. Marxianus*'un da temel özelliklerin korunduğu varsayılmaktadır (Rubio-Teixeira 2006, Schaffrath ve Breunig 2000). Laktozu kullanma kabiliyeti, hücrenin içine laktoz alımı için gerekli olan bir laktoz permeabilitesini kodlayan LAC12 ve laktozu monomer glikozu ve galaktoza hidrolize eden bir p-galaktosidazı kodlayan LAC4'ü içeren iki gen, LAC12 tarafından sağlanır. *S. cerevisiae*'de olduğu gibi, galaktoz ayrıca Leloir yolu yoluyla glikoz-6-P'ye metabolize edilir. LAC12 – LAC4 gen çiftinin evrimsel tarihi açık değildir, ancak regülasyonları *S. cerevisiae*'de iyi çalışılmış olan Gal4p / Gal80p sistemi ile entegre edilmiştir. Bununla birlikte, türler arasındaki farklılıklar vardır, örneğin, LAC/GAL genlerinin bazal ekspresyonu, muhtemelen bir GAL4 pozitif oto düzenlemeli döngüden oluşmaktadır. Glikoz inhibasyonu kontrolünün ekspresyonu kontrol etme düzeyinin de oldukça etkili olduğu durumlarda *Kluyveromyces*'te daha yüksektir. Mekanik olarak, farklılıklar da görülmüştür. Örneğin *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*'te GAL2 tarafından kodlanan spesifik bir galaktoz geçirgenliğinden yoksundur ve Gal1p'de enzimatik ve düzenleyici işlevleri bulunurken, bunlar *Saccharomyces*'de Gal1p ve Gal3p arasında bölünmüştür (Rubio-Teixeira 2005, Traven vd. 2006).

2.6 Surfaktanlar

Surfaktan kelime olarak "yüzeyi saran" anlamına gelmektedir. Surfaktan maddeler, suyun yüzey gerilimini düşürürler. Bu nedenle "yüzey aktif" maddeler olarak anılmaktadır (Homberg vd. 2003). Surfaktanlar su-petrol yüzeyi, hava-su yüzeyi, sıvı-

katı yüzeyi gibi farklı yüzeyleri bir araya getiren özellikler göstermektedirler. Surfaktan denince akla, alkil sülfat, alkil sülfonat, etoksillenmiş yağ asitleri, sodyum tuzları gibi organik türevler gelmektedir. Surfaktanlar genellikle yapısal olarak uzun bir molekülün ucundaki afinitesi yüksek bir grupta karakterize edilmektedir. Surfaktanlar bu grubun kimyasal durumu açısından iyonik ve iyonik olmayan (noniyonik) olmak üzere nitelendirilir (Hamme vd. 2006). Surfaktanların geniş uygulama alanları vardır. Surfaktandan nötral moleküllerin çözünürleştirilmesinden kozmetik, misel katalizi, ayırma işlemleri ve tekstil ürünlerinin boyanması gibi geniş bir aralıkta faydalanılmaktadır (Scamehorn 1986). Surfaktanlar, hidrofobik kuyruk ve hidrofilik baş kısmından oluşurlar (Şekil 2.3). Sıvıların veya sıvıların ara yüzeylerinin gerilimini azaltabilen kimyasallardır. Surfaktanlar ortamda basit monomerler halinde bulunur, ancak bazen daha karmaşık polimerler olarak da bulunurlar. Yüzey aktif maddelerin hidrofilik grubunun yüküne dayanılarak, bunlar anyonik (negatif yüklü), katyonik (pozitif yüklü), noniyonik (herhangi bir yük olmadan) ve Amfolitik/zwitter iyonik (her iki yük) olarak gruplandırılırlar (Rebello 2014).



Şekil 2.3 Surfaktanların genel yapısı

2.6.1 Anyonik surfaktanlar

Anyonik yüzey aktif madde SDS, petrokimyasal veya oleo kimyasal esaslı lauril alkollerin sülfonatlanmasıyla sentezlenirken, LAS sadece petrokimyasal yan ürünlerden sentezlenir. SDS, 12 karbon atomlu alkil kuyruklu, amfifilik özelliklere sahip bir sülfat grubuna bağlı bir linearmolekülüdür. LAS, hidrofobik bir alkile sahiptir. Zincir ve bir benzen halkası ve bir sülfonat grubu içeren hidrofilik bir kafaya sahiptir. Tek bir bileşik

değil, ideal olarak yakından ilişkili homologlar ve izomerlerden oluşan 20 bileşiğin bir karışımıdır (Rebello 2014).

2.6.2 Katyonik surfaktanlar

Katyonik surfaktanlar birçok yüzeyde güçlü olarak adsorplandığından dolayı yüzey modifikasyonlarında kullanılmaktadırlar. Katyonik surfaktanların büyük bir çoğunluğu, katyonik yük taşıyan azot atomuna dayanmaktadır. Hem amin hem de kuaterne amonyuma dayalı ürünler oldukça fazladır. Aminler, yalnızca protonlanmış durumda surfaktan olarak fonksiyon gösterirler, bu nedenle yüksek pH değerlerinde kullanılamazlar. Kuaterner amonyum bileşiklerinin pH'a karşı duyarlılığı yoktur. Kuaterner olmayanlar da çok değerlikli anyonlara karşı oldukça yüksek hassasiyete sahiptir.

2.6.3 İyonik olmayan surfaktanlar

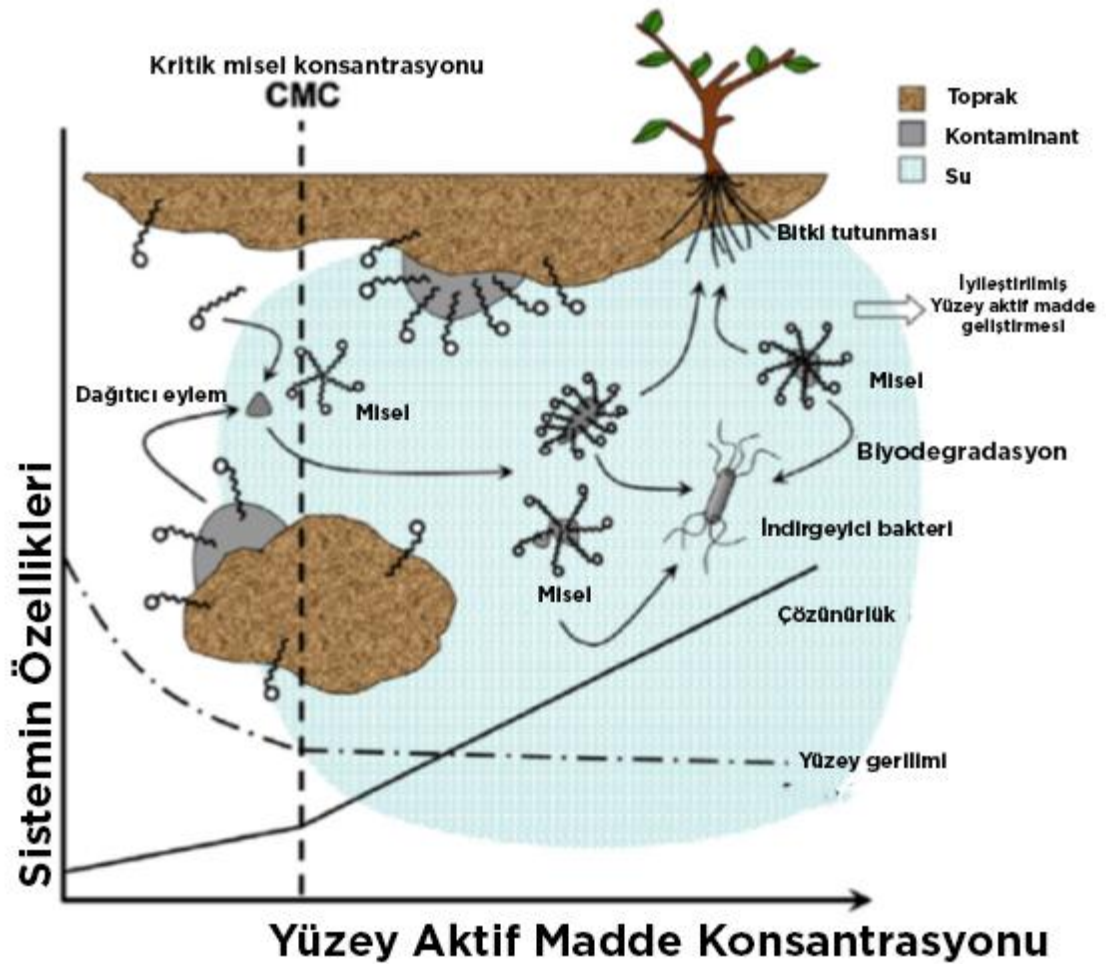
İyonik olmayan surfaktanlar, diğer bütün surfaktan türleri ile uyumludur. Sert sulara karşı hassasiyetleri yoktur. İyonik surfaktanların tersine fizikokimyasal özellikleri, elektrolitler tarafından belirgin bir şekilde etkilenmez. Etoksilatlanmış bileşiklerinin fizikokimyasal özellikleri sıcaklığa çok bağlıdır. İyonik bileşiklerin tersine bunlar yüksek sıcaklıklarda suda daha az çözünür ve daha hidrofobik hale gelirler. İyonik olmayan surfaktantlar, polar grup olarak ya bir polietere ya da polihidroksil birimlerine sahiptir. İyonik olmayanların büyük bir kısmında polar grup, oksietilen birimlerinden oluşan bir polieterdir (Holmberg vd. 2003).

2.6.4 Zwitteriyonik surfaktanlar

Zwitteriyonik surfaktanlar en küçük surfaktan sınıfıdır. Bunlar genellikle asit ve bazlarda kararlıdır. Göz ve deride çok düşük tahribat gösterdiklerinden dolayı birçok türünün şampuan ve kişisel bakım ürünlerinde kullanılması uygundur. Zwitteriyonik surfaktanlar, farklı işaretle iki yüklü grup içerirler. Pozitif yük, genellikle amonyumken, negatif yük kaynağı en yaygın olarak karboksilatlardır. Buna karşın farklı negatif yük

kaynakları görülebilmektedir. Zwitteriyonik surfaktanlar, sık sık amfoterik surfaktanlar olarak da adlandırılmaktadır (Holmberg vd. 2003).

2.7 Surfaktanlar ile Giderim



Şekil 2.4 Surfaktanların çalışma şekilleri (Mao vd. 2015)

Kirleticileri topraktan çözündürmek için yüzey aktif maddeler kullanılır.

Surfaktanların biyogiderime etkisini anlamamanın en iyi yolu yüzeyler ve hücreler ile interaksiyonlarını anlamaktır.

Substratların arasında bir ara birim olarak bulunmaları surfaktanların temel özelliklerindendir. Ayrıca, kayma ve hücre-hücre etkileşiminde etkili rol oynarlar. Çoğu

yüzey aktif madde'nin fizyolojik işlevleri kesin bir şekilde belirlenememiştir (Haferburg vd. 1986)

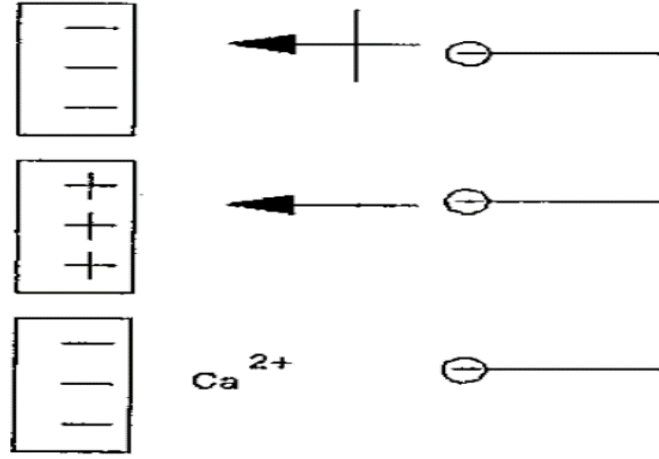
yüzey aktif madde'leri ağırlıklı olarak hidrokarbon asimilasyon ve biyosit etkinliği açısından araştırılmıştır. Bununla birlikte surfaktanların, bakterilerin kayma ve ara yüzlerin ıslanmasında bir görevi olabileceği düşünülmektedir. Yüzey aktif madde'ların biyosidal aktivitesi, moleküllerin lipid yapısı ile yakından ilişkilidir. Bu bileşiklerin ökaryotik hücrelerle etkileşiminin sonuçları iyi bilinmektedir ve pirojenite, öldürücü toksisite, immünojenisite, mitojenisite ve diğer moleküler litik etkilerini içerir (Wicken vd. 1980).

Hidrokarbon-su ara yüzeyleri, kendiliğinden oluşan hidrofobik ara yüzeyler değildir. Diğer önemli hidrofobik arayüzeylerin sıralanması gerekirse, hava-su ara yüzü, bitkilerin hava kısımları, hidrofobik kütikül, mum katmanları, kitin Eklem bacaklı iskeleti ve kömür, katran veya elemental sülfür ara yüzleri sayılabilir. Yapraklarda ve kitine ait mikrobiyel bozunma, doğadaki organik maddenin geri dönüşümü için gereklidir. Sıvı olmayan hidrofobik ara yüzler aynı zamanda bu bozunma sürecinde yüzey aktif madde'lar sayesinde substrat olarak kullanılmalarını sağlamaktadır. Su-gaz veya hava ara yüzü sadece nehirler, göller ve deniz gibi sulu sistemlerde değil, aynı zamanda topraklarda ve tortullarda evrensel bir hidrofobik ara yüzü temsil eder. Hidrofobik moleküller bu ara yüzde birikim eğilimi gösterirler ve ara yüzeylerde aktif olarak görülen bakteriler için cazip besin kaynağıdır. yüzey aktif madde'ler, bu doğal hidrofobik tümüyle etkileşimi güçlendirmek için ideal moleküller gibi gözükmemektedir.

Arayüzeyler hakkında li bir diğer önemli husus mikrobiyel hücre zarı, hücre duvarı ve hücre yüzeyi döngüsü ürünlerinin surfaktanlara göre tanımlanmasıdır. Gram pozitif ve gram negatif bakteriler için, hidrofobik bir kısım taşıyan amfifilik bileşikler bilinmektedir. Bu bileşiklerin yapısı kısmi olarak lipid olabileceği gibi membranda bir lipid çıkışı görevi görebilir veya membrandan (Bugg vd. 1994) geçmek üzere geçici olarak bir polimerle tutturulan bir parça olabilir. Bakteriyel hücre duvarları ve peptidoglikan olarak çeşitli değerlendirmelere konu olmuştur (Koch 1988).

Bakteriyel hücre duvarı hücrelerin şeklini ve mekanik özelliklerini belirlemektedir. Hücre duvarlarının sentezi ve dönüşümü, hücrelerin büyümesi sırasında çok önemlidir. Yine, gram-pozitif ve gram-negatif hücrelerin surfaktanlara tepkisi farklıdır. Çünkü hücre duvarı kalınlığındaki değişimin yanı sıra bir dış zarın varlığı veya yokluğunda bu intereksiyonu değiştirir. Tanım olarak, hücre duvar değişimi büyüme gerektirmez ve dönüşüm ürünlerinin çevreye bırakılması esastır. Genel olarak, müreinden hidrolazlar tarafından salınan hücre duvarı dönüşüm ürünleri, hücre tarafından geri dönüştürülür (Doyle vd. 1988, Cooper 1991). Son olarak bakterilerin en dıştaki yüzey tabakasını oluşturan hücre yüzeyi dönüşüm ürünleri vardır. Yalnızca gram pozitif hücrelerde değil, aynı zamanda proteinler ve polisakaritler gibi diğer moleküllerden oluşur. Yukarıda özetlenen sentetik yüzey aktif madde'lerin tüm yönleri ilke olarak mikrobiyel yüzey aktif madde'ler için geçerlidir. Yüzey-aktif yaklaşımı tarif ederken, biyolojik yüzey aktif maddelerin, amfifilik, polifil bileşiklerin olası teorik konumlarını, yönlendirmelerini ve etkileşebilecekleri farklı yüzey türleri ayrıntılı bir şekilde ortaya konulmaya çalışılmıştır. Doğal sistemlerde durum çok daha karmaşıktır ve birçok ilave parametrenin dikkate alınmasını gerektirir. (Doyle vd. 1988, Pugsley 1993, Whitfield vd. 1993)

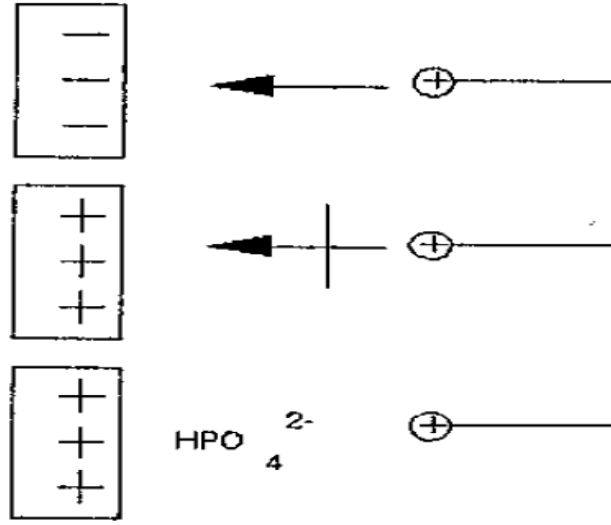
Bakterilerin çeşitli arayüzlerle etkileşiminde yüzey aktif madde'lerinin genel çalışma prensibi 1987 yılının başlarında tanımlanmıştır. (Neu 1987) Daha sonra Gerson, yüzey aktif madde'lerin suda çözünmeyen substratlardaki mikroorganizmaların büyümesinde önemli olduğunu bulunmuştur. Bir biyositür, hücre yüzeyinin dış katmanlarındaki hidrofobik kısımlara (gram pozitif bakterideki hücre duvarı ve gram negatif bakterideki dış zar) ile demirlenebilen bir biyositürdür. Bu durumda hücre, hidrofobik bir arayüz ile etkileşime girebilir, ancak hidrofobik bir arayüzle etkileşime giremez (Şekil 2.6).



Şekil 2.5 Anyonik surfaktanların yüzey yüklerine etkisi (Neu 1996)

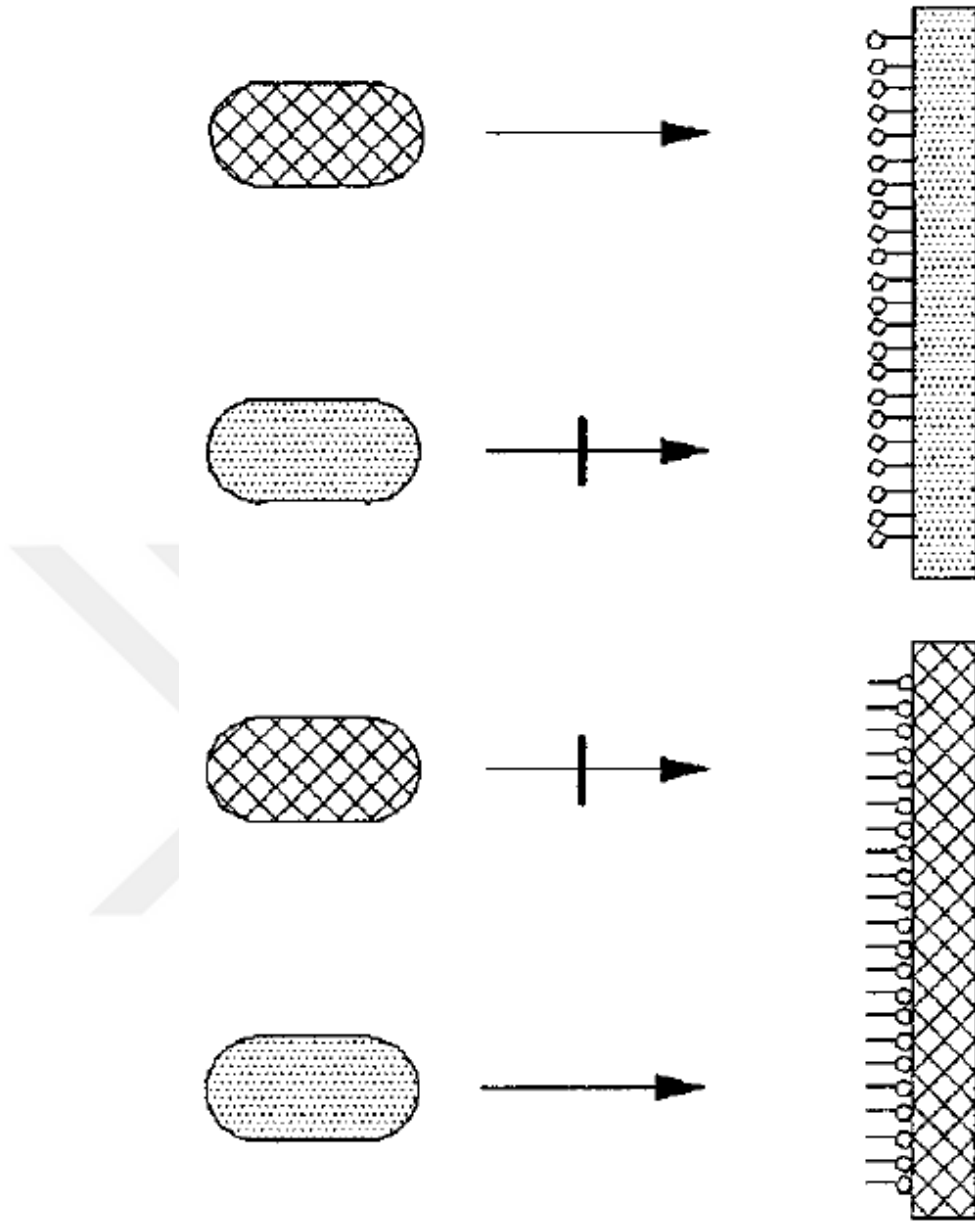
Bu olayın örneklerinden biride gram negatif hücrelerin dış zarının dış tabakasındaki lipidlerde gözlenmektedir. Hücrenin yüzey yapısına bağlı olarak, moleküler seviyedeki durum hala belirsiz olsa da, bu lipidler ara yüzelerle etkileşimde belirli bir dereceye kadar yer aldığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, hücre yüzeyi üzerinde hidrofobik bölgelerin bloke edilmesinde surfaktanlar etkisinin gözlemlendiği örnekler bulunmaktadır. Bir serratamolitin varlığı ile hücre yüzeyi hidrofobikliğinin azaltılması *Serratia* için önerilmiştir (Bar-Ness vd. 1988). Bir başka örnek, gram-pozitif bakterilerin sitoplazmik zarın dış tabakasındaki lipid ile modifiye edilmiş polipeptidlerdir. Streptokoklar için, bu lipid modifiye polipeptidlerin tutunma için önemli olduğu gösterilmiştir. (Jenkinson 1992). Surfactanlar da, hidrofilik kısım vasıtasıyla hücre yüzeyine bağlanabilir. Böylece hidrofobik kısmı dış tarafta kalır. Bu, hidrofobik bir hücre yüzeyi oluşturur ve bu durumda hücre, hidrofobik bir ara yüzeyle etkileşime girebilir (Şekil 2.5). Dyar, *Micrococcus* ve *Mycobacterium* türlerinin hücre yüzeylerini incelenmiştir. (Dyar 1948). *Corynebacterium*, *Mycobacterium* ve *Nocardia* cinslerinin bakterileri (CMN kompleksi olarak da bilinirler) kovalent bağlı hidrofobik özellikler taşıyan mikolik asit bakımından zengindirler. Mycolic asitler, uzun alifatik yan zincire sahip yüksek molekül ağırlıklı hidroksi yağlı asitlerdir. Mykolik asitlerdeki karbon atomlarının sayısı 30 ile 90 arasında değişebilir. Bu gruptaki bakteriler hidrofobiktir, çünkü sitoplazmik zar içerisinde demirlenmemiş, dış ortamla interaksiyon halinde mikolik asitlerin alifatik zinciri vardır. Teflon ve cama yapışma özelliklerini incelemek için farklı zincir

uzunluklarına sahip miklorik asitlerle birlikte koriyonform bakteriler kullanılmıştır. Fizikokimyasal hücre yüzey özelliklerinin (hidrofobiklik) teflon'a yapışmanın, miklorik asitlerin varlığı ve zincir uzunluğu ile ilişkili olabileceği bulunmuştur. (Bendinger vd. 1993). Bu ilişki, bir hidrofobik hücre yüzeyi ve emülsiyon haline getiren bileşiklerin üretiminin (Stephens vd. 1987) önünü açabilir. Ramnolipid üreten *Pseudomonas aeruginosa* suşlarıyla yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Ramnolipid, hücre hidrofobitesini artırır. Hidrofobik kısmı çevreye yönlendirilirken (Zhang vd. 1994), hücrenin dış tabakalarında ramnolipidin hidrofilik kısım ile bağlandığını göstermektedir. *E. coli*, *Bdellovibrio bacteriovorus* ile enfekte edildiğinde, uzun zincirli yağ asitleri intraperiplazmik büyüme sırasında kovalent olarak *E. coli* peptidoglikana bağlanır (Thomashow vd. 1978). Gram negatif bir bakteri olan *E. coli*'de yağ asitleri dış matrikse maruz kalmazlar. Bununla birlikte, bu, yağ asitlerinin peptidoglikana bağlanabileceğini göstermektedir. Bu bulgu, aynı prensibin gram-pozitif bakteriler için de geçerli olduğunu ve bu bakterilerin bu yağ asitlerinin dış ortama maruz kalabileceğini göstermektedir. Serbest yaşayan ve yapışan bakterilerin lipid içeriğini karşılaştıran ilginç çalışma rapor edilmiştir. Bu çalışma, serbest yaşayan bakterilerin lipid içeriği ve yağ asidi oranını arasındaki farkı ortaya koymuştur (Valeur vd. 1988). Bunun bir başka örneği, maya hücreleri ile yapılan çalışmalarda bulundu. Yağ asitlerinin, *Saccharomyces* suşlarının hücre yüzeyindeki hidrofobik belirleyiciler olduğu gösterilmiştir. Bu, yağ asitlerinin açıl zincirlerinin dışta kaldığı anlamına gelir (Limura vd. 1980, Limura vd. 1981). Yüzey aktif maddelerin diğer bir işlevi de , bakterilerin yüksek organizmalarla spesifik etkileşimlerini sağlamasıdır. Hücreye bağlı polimerik yüzey aktif madde'lar, polimerik amfifilik moleküllerdir. Hidrofobik kısım ile dış hücre tabakalarına yapışır, böylece hidrofilik bölge çevreye maruz bırakılırlar. Bu düzenleme, hücrenin hidrofilik arayüzlerle etkileşime girmesine, ancak hidrofobik olanlarla etkileşime girmesine izin verir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Katyonik surfaktanların yüzey yüküne etkisi (Neu 1996)

Bu durumun iyi bilinen örnekleri, lipopolisakkaritler (Lu'deritz vd. 1971, Reitschel 1984, Westphal vd. 1996) ve enterobakteriyel olan gram-negatif bakterilerdir Diğer ilgili örnekler lipoteikoik asit lipomannan *Actinomyces amphiphile* ve diğer bazı amfifiller içeren gram-pozitif bakterileridir. Buna ek olarak, gram negatif verilen surfaktanlar, mikroorganizmalar yağ asitlerini, lipidleri ve biyolojik koruyucu maddeleri çevreleyen ortama atarlar. Biyolojik yüzey aktif maddeleri sulu faza atabilen mikrobiyel bir hücre, bir ara yüzde mikrobiyel olarak oluşturulmuş bir şartlandırma filminden sorumlu olabilir. Hidrofobik bir arayüzde, bu şartlandırma filmi ara yüzeyi hidrofobik seviyeden hidrofilğe değiştirecektir. Bu, hidrofobik hücrelerin değil, hidrofobik hücrelerin artık ara yüz ile etkileşime girdiği anlamına gelir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 Surfaktan modifiyeli yüzey ile hücre etkileşimleri

İlk örnek, yüzey aktif madde üreten *Thiobacillus* türleri için bildirildi. Bu bileşik, elemental kükürtün hidrofofik yüzeyine yapışmanın başlangıç aşamalarında (Jones vd. 1961, Beebe vd. 1971, Bryant vd. 1984) yer alabilir.

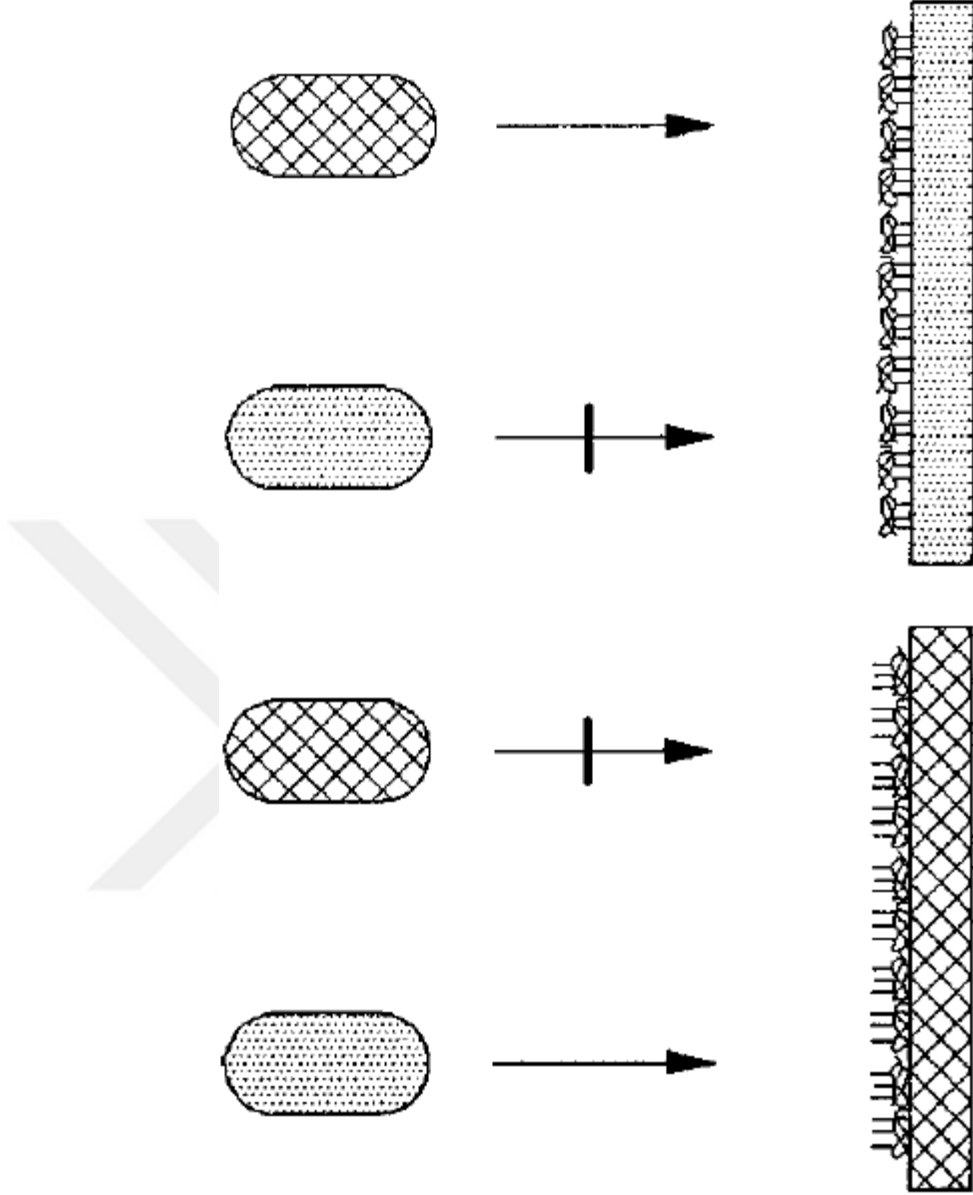
Hidrofofik yüzeylerde temelde belirli habitatlardan izole edilmiş yüzey aktif madde'lar üreten mikroorganizmalar görülür. Hidrofofik bitki keseciklerinden izole edilen çoğu

fitopatogenik corynebacteria'nın yüzey aktif madde'ları üretirler. Benzer bulgular *Pseudomonas* türleri için bildirilmiştir.

Yüzey aktif madde üreten mikroorganizmalar hidrofobik hücre yüzeyleri sulu ortamlardan bile izole edilmiştir (Neu 1961). Bu tarama sırasında bulunan bazı biyolojik koruyucu maddeler başlangıçta antibiyotik olarak keşfedilmiştir (Neu ve Poralla 1990). Bu yolla izole edilmiş bir bakteri, suyun yüzey gerilimini 27 mN /m değerindeki en düşük teorik değerine düşüren bir peptidolipit biyosurfaktant olan viscosin üreten bir *Pseudomonas* suşudur (Neu vd 1990). Brokoli baş dönmesi hastalığının araştırıldığı farklı bir çalışmada bulunmaktadır. Belirtilere neden olan *Pseudomonas fluorescens* suşları, brokoli yapraklarının aşırı hidrofobik, mumlu yüzeyinin ıslanmasına izin veren viscosin ürettiği gözlenmiştir. Pektolitik ve surfaktan pozitif suşları, su ile kaplı yüzeylerde ve çürümenin yayılmasına, sebep olmuştur. Hastalığın oluşum mekanizması bu şekilde açıklanmıştır (Hildebrand 1989). Viscosin üreten *P. fluorescens* suşları kömür üzerinde gelişebilen mikroorganizmalardır. Bununla birlikte, sıvılaşma ve surfaktan üretimi arasında herhangi bir ilişki kurulamamıştır (Fakoussa 1988, Fakoussa 1989). Hücre dışına atılan biyosurfaktanlara bir başka örnek, bir deniz *Vibrio* türünün bir kolonisinde bulunan hidrofobiklik farkı olabilir. Hidrofobiklik, koloninin çevresinden merkeze artmıştır. Bu koloni hidrofobisitesi, farklı büyüme bölgelerinden gelen hücrelerin hücre yüzeyi hidrofobikliği ile korelasyon göstermez. Bununla birlikte, gevşek bağlanmış bir emülsiyon haline getirici maddenin varlığı ile ilişkilendirilmektedir. Bu gözlem, hücre dışına atılan bir yüzey aktif madde'nin hidrofobik bölgelerinin hidrofobik hava arayüzü ile etkileşime girdiği, hidrofilik bölgelerinin ise bakteri kolonisinin üzerindeki hidrofilik hücre yüzeyleri ile etkileşime girdiği anlamına gelir. Benzer bulgular *E. coli* kolonileri için bildirilmiştir. Elektron mikroskobu teknikleriyle agardaki kolonilerinin lipidlerden oluşan bir yüzey filmi ile örtülmüş olduğu gösterilmiştir (Tetz vd. 1993). Bu filmin biyolojik rolü hala bilinmiyor. Bu örnekler, mikrobiyel hücre yüzeyi hidrofobikliği ile SAK'ların üretimi arasında bir ilişkiyi göstermektedir. Hidrofilik bir ara yüzde, hücre dışına atılan biyolojik koruyucu maddeler ara yüzey özelliklerini hidrofilikten hidrofobik hale getirebilir. Sadece hidrofobik hücreler bu hidrofobik koşullandırma filmi ile etkileşime girebilir (Şekil 2.7). Bir örnek *Serratia marcescens*'in yüzey aktif eksolipididir. Bu lipopeptid, bakterilerin

hidrofilik bir yüzeyde flagellumdan bağımsız yayılmasını desteklediği gösterilmiştir (Matsuyama vd. 1989, Matsuyama vd. 1992).

Amfifilik ve polifil polimerler ayrıca çevreye atılabilmektedir. Bu bir arayüz üzerinde şartlandırma filmi oluşturabilmektedir. Hidrofobik bir ara yüzde, polimerler, ara yüzdeki hidrofobik lipit kısmı veya hidrofobik gruplarla bağlanacak ve böylece hidrofobik ara yüzeyi hidrofilik bir ara yüz haline getirecektir. Hidrofilik mikroorganizmalar, ancak hidrofobik mikroorganizmalarla değil, mikrobiyel orijinli hidrofilik şartlandırma filmi ile de etkileşime girebilmektedir (Şekil 2.8). Bu davranış, emülsan adı verilen bir polifilik polimer üreten *Acinetobacter calcoaceticus* için bildirilmiştir. Bu polimer, yapışmayı etkin bir şekilde engellediği, *acinetobacter calcoaceticus* ve *Streptococcus pyogenes* gibi hidrofobik bakterilerin, epitel hücrelerine dönüştürülmesinden yola çıkılarak hidrokarbonların emilimini engellediği gösterilmiştir. Polifilik polimerin hidrofobik hidrokarbon ile ve hidrofobik hidrokarbonla etkileşime girdiğine işaret edilmiştir. Epitelyal hücrelerin bağlayıcı bölgeleri yağ asitleri vasıtasıyla bu özellikleri kazanır (Rosenberg vd. 1983). Bir hidrofilik ara yüz ile etkileşime giren mikrobik amfifilik polimerlerin teorik olarak henüz mevcut durumda, hidrofilik arayüzü hidrofobik hale getireceği beklenmektedir. Sonuç olarak, sadece hidrofobik mikroorganizmalar hidrofobik şartlandırma filmi ile etkileşime girebilmektedir (Şekil 2.7).



Şekil 2.8 Surfaktan modifiyeli yüzey ile hücre etkileşimleri (Neu 1996)

Yukarıda tarif edildiği gibi, biyosurfaktanlar mikrobiyel hücre yüzeyinde farklı yollarla yönlendirilebilir. Bununla birlikte, oryantasyonuna bakılmaksızın, hücre yüzeyinden salınırlar veya hücre yüzeyi ile ara yüz arasındaki alana atıldıklarında, muhtemelen bakterinin ara yüzeye yapışmasına neden olmaktadır. Ara yüzün hidrofilik veya hidrofobik özelliklerine bağlı olarak, bakteri hidrofilik veya hidrofobik özelliklere sahip bir mikrobiyel şartlandırma filmine sahip olacaktır. Yapışmadan sonra yüzeyde kalan bu mikrobiyel moleküller için "desorpsiyon ayak izleri" terimi önerilmiştir (Neu 1992).

Yüzeylerde bırakılan bu ayak izi materyali, özelliklerini tanımlamak için lektinleri kullanarak etiketlenmiştir (Neu vd. 1991). Bu kategoriye uyan çeşitli örnekler streptokoklardır. Bazı çalışmalarda, streptokokların bir yüzeye yapıştığı ancak diğer mikroorganizmaların yapışmasını etkileyebilecek bazı bileşiklerin geride bıraktıkları anlaşılmıştır. Ölümüne neden olacağı bulunmuştur. *Streptococcus mitis* hücreleri için bu maddelerin ara yüzeyi değiştirdiği ve *Streptococcus mitis* ve *Streptococcus mutans* hücrelerinin yapışmasını etkilediği gösterilmiştir. Yüzeyden ayrılmış *Streptococcus cricetus* hücreleri ile önceden muamele edilmiş yüzeyler *Prevotella intermedia*'nın yapışmasını olumsuz etkilemiştir (Cowan vd. 1993). *Streptococcus thermophilus* ile yapılan deneylerde, benzer gözlemler (Busscher vd. 1990, Busscher vd. 1994) yapılmıştır. Yapışma esnasında başlangıçta biriken hücreler bakteriyel kalıntılar bırakır. Yüzey aktif madde alt katmanının üzerine yapışır, böylece bir yapışma engelleyici katman oluşturur. Kayma, bakterilerin heterojen grubu özel bir durumu temsil eder. Kayma, bakterilerin iki boyutlu bir sistem içerisinde kaldığı sürekli bir emilim süreci olarak görülebilir. *Cytophaga johnsonae* için, sülfonolipidlerin ve ornitin lipidlerinin kayma hareketliliğinin moleküler belirleyicileri olduğu, sentezlerinin yüzey kaynaklı olduğu (Abbanat vd. 1988) ve hücrelerin dış zarında lokalize oldukları gösterilmiştir (Godchaux vd. 1988, Pitta vd. 1989). Diğer bulgular kayma motilitesinde lipopolisakkaridin ek bir katılımını desteklemektedir Biosurfaktantların bazı kaygan bakterilerin itici gücünden sorumlu olduğu düşünülmektedir. *Myxococcus xanthus*'un kayma motilitesi için yüzey gerilim gradyanlarına dayanan bir model teorik hesaplamalar ve deneysel gözlemler kullanılarak oluşturulmuştur. Bir yüzey aktif maddenin polaritesinin, hücreleri bir ara yüzden geçirebileceği öne sürüldü. Kaydırma sürecindeki hidrofobik bileşenlerin altı çizilmektedir (Wolkin ve Pate 1985). Özetle, lipidler, biyosurfaktanlar ve lipopolisakaritler, bu heterojen bakteri grubunun kayganlaştırma sürecinden bir şekilde sorumlu olabilen bileşenlerdir. Bu, kayma mekanizması için tam bir açıklama anlamına gelmemekle beraber, yüzey aktif moleküller olarak, bu bakterilerin kayma hareketlerinde önemli bir rol oynamaları muhtemeldir. İleri ki çalışmalarda kayganlaştırıcı bakteriler içindeki mekanizmalar büyük olasılıkla bulunacak ve bunların bazıları mikrobik yüzey aktif madde'ları içerecektir. Yukarıda tartışıldığı gibi, mikrobik yüzey aktif madde'ler, hidrofobik kısımlarını dışa açan mikrobiyel hücre yüzeyine bağlanabilir. Bu gibi yüzey

bileşiklerinin kontrollü salınması, hidrofilik/hidrofobik yüzey özelliklerinde bir değişikliğe neden olacaktır. Sonuç olarak, bu bileşikler, mikrobiyel hücre yüzeyi hidrofobikliğinin düzenlenmesinden sorumlu belirleyiciler olarak kabul edilebilmektedirler. Bu mikroorganizmalar, farklı büyüme koşulları altında ve morfogenezis ve farklılaşma sırasında farklı büyüme evrelerinde hücre yüzeyi hidrofobikliğini değiştirebilir. Önceki bölümlerde verilen örneklerle ek olarak, bu bildirinin kanıtlarını içeren başka raporlar da bulunmaktadır. Yapışık bakterilerin, hücre yüzeyinin hidrofobikliğini değiştirerek biyofilmlerden kendilerini kurtardığı bulunmuştur. *Pseudomonas aeruginosa* ve *E. coli* ile yapılan çalışmalarda biyofilmden kurtulan hücreler için hidrofiliklik gözlenmiştir. (Allison vd. 1990a). Birkaç mikrobiyel bileşimin, hidrofobik hücre yüzeyi belirleyici için (hidrofobinler) olduğu öne sürülmüştür. Bunlar, ince fimbrialar, M protein / lipoteikoik asit, A protein, protein tabakası, prodigiosin, glukosiltransferaz, dış zar proteinleri, yüzey fibrilleri, çeşitli fimbrialar, çekirdek oligosakkaritler / dış zar lipidleri ve gramisidin S'dir. Bununla birlikte, lipoteikoik asit dışında bu liste, mikrobik yüzey aktif madde'lar. Dahası, hücre yüzeyindeki hidrofobiklikteki dış zarın dış tabakasındaki lipidlerin rolü henüz açıklanamamıştır. Lipopolisakaritlerinde azaltılmış bir O-spesifik zinciri olan gram-negatif bakterilerin, suşlarına sahip olan suşlara göre daha az hidrofilik oldukları bilinmektedir. Bununla birlikte, bu açıdan dış zar lipidlerinin işlevi tam olarak anlaşılamamıştır. Hücre yüzeyi hidrofobikliği veya hidrofilitesi, hücre yüzeyindeki oryantasyona bağlı olarak değişir. Biyosurfaktantların ve amfifilik polimerlerin mikrobik hücre yüzeyi ile serbest bırakma mekanizması ile birleşmesi, mikroorganizmaların hücre yüzeyindeki hidrofobikliği ve dış oramdaki değişen çevre koşullarına göre ayarlanmasını sağlamak için ideal bir yol olduğunu düşündürmektedir. (Allison vd. 1990b).

Saccharomyces cerevisiae suşunun kullanıldığı bir çalışmada ise triton x 100 ve Pluronic f-68 surfaktanlarının maya hücreleri üzerinde etkisi araştırılmıştır. Deneylerde özellikle zar geçirgenliği çalışılmıştır.

Noniyonik surfaktanlar, hücre kültürü sistemlerinde takviye olarak ilgi çekmektedir. Bu gibi bir yüzey aktif madde olan Pluronic F-68, ortalama molekülü bir blok kopolimerdir.

Pluronic'in hücre korumasının kesin mekanizması açık olmasa da, bir ara yüzey filmi, yüzey gerilimi etkisi, ve hücre-kabarcık etkileşimlerine karşı korunmak için kararlı bir köpük oluşumu dahil olmak üzere birçok olasılık göz önüne alınmıştır. İlgili çalışmalarda, diğer noniyonik surfaktanların hem hayvan hem de mikrobik sistemlerde membran geçirgenliğini etkileyebileceğini göstermiştir. Maya hücrelerinde, hem Triton X-100 hem de steroidal glikozit, digitonin, laktoza karşı membran geçirgenliğini artırabilir. Önceden olduğu gibi, bu etkilerin mekanizması çok iyi anlaşılmamıştır, ancak bir öneri, digitoninin, geçirgenlik değişimlerine yol açan membran lipitleri ile kompleksler oluşturmasıdır. Önceki çalışmalarda, Pluronic F-68'in maya hücrelerinde büyüme, yapı ve membran üzerindeki etkilerini inceledik. Pluronic floresan boya, floresein diasetat (FDA) alımı yapılır iken, hücre canlılığı veya yapısı üzerinde bariz zararlı etkileri olduğu gösterildi. Önemli bir bulgu, FDA alımının kullanılan Pluronic'in kaynağına ve konsantrasyonuna göre değişmesiydi.

Maya hücre zarları üzerinde saflaştırılmış Pluronic F-68 fraksiyonları ve bilinen bir zar-bozucu ajan olan Triton X-100 tarafından üretilenlere karşı olan tepkilerin karşılaştırılması. Çalışmanın özel hedefleri, bu surfaktanların (Dean vd. 1972) membran geçirgenliğini FDA, (Schmolka 1977) membran ve hücre proteinlerine, (Mizrahi 1975) membran yapısına ve (Bentley vd. 1989) fosfolipit çift katmanlarına çıpalanma yetenekleri ve etkileri incelenmiştir.

Membran geçirgenliği deneylerinde çeşitli konsantrasyonlarda denenilen Triton X100 ve Pluronic F-86'nın kayda değer bir etkisi görülmemiştir. Aynı şekilde hücre ve membran proteinlerde de kayda değer bir etki gözlenmemiştir.

Maya hücrelerinin ince kesitleri, hücre ultrasonu üzerindeki tüm Pluronic fraksiyonları ile kültürün bariz zararlı etkilerini ortaya konulmuştur. Cryo-SEM gözlemleri, ya ticari

dereceli ya da saflaştırılmış Pluronic ile kültürün ardından hücre morfolojisi üzerinde bariz zararlı etkiler ortaya koymamıştır.

2.8 Surfaktan Metal Etkileşimi

Miller'e göre, biyosurfaktanlar, çözelti içinde bulunan metalin serbest formunun kompleksleştirir. Bu, metalin çözelti içerisindeki aktivitesini azaltır ve bu nedenle, Le Chatelier'in ilkesine göre desorpsiyonu artırır. Ayrıca eğer metaller uzun süredir ortamdaysa bağlandıkları yerden ayrılmaları zorlaşır ve bu da surfaktanların etkisini azaltır.

Cd, Pb ve Zn gibi katyonik metal türlerini seçici olarak kompleksleyebilen çeşitli *Pseudomonas aeruginosa* suşları tarafından üretilen rhamnolipid biyosurfaktan üzerinde önemli çalışmalar yapılmıştır. Çalışmalar, bu surfaktanın, kadmiyum ve kurşun gibi toksik metallerle, kalsiyum ve magnezyum gibi normal toprak metali katyonları ile daha az afiniteye sahip olduğundan daha karmaşık olduğunu göstermiştir. *P. aeruginosa* ATCC9027 tarafından üretilen 5 mM'lik bir rhamnolipid çözeltisinin, kadmiyumun % 92'sini komplekse ettiği, 22 µg / mg rhamnolipid kompleksi olduğu bulunmuştur . Biyobozunur bir yüzey aktif madde olarak, *Bacillus subtilis*'den elde edilen surfaktin, kontamine toprak ve tortulardaki ağır metallerin uzaklaştırılması için uygunluğu araştırılmıştır. Kirlenmiş topraklarda çevreye duyarlı ve uygun maliyetli giderim yapmak için başvuru yöntemlerinden biri de toprak yıkamadır. Zaman açısından verimli ve çok yönlü bir yöntemdir ve son yıllarda dikkate değer miktar çalışmaya konu olmuştur. Toprak yıkama, kimyasal kirleticileri topraklardan uzaklaştırmak için sıvıları, genellikle sulu çözeltileri kullanan mekanik bir işlemdir. Kirleticiler toprak yüzeyine yapışır. Kirleticilerin suda çözünürlükleri düşük olduğundan, giderimleri için asitler, yüzey aktif maddeler ve kenetleme maddeleri gibi katkı maddeleri kullanılır (Şekil 2.4).

Yüzey aktif maddenin benzersiz moleküler yapısı, özellikle de hidrofobikliği organik bileşikler için toprak kirleticilerinin suda çözünürlüğü artırır. Toprak remediasyonunda Anyonik, katyonik, zitteriyonik ve iyonik olmayan surfaktanlarla denemeler ve uygulamalar yapılmıştır (Fountain vd. 1996).

Toprağın ilk yıkanmasında sonra bakırın % 25'i, çinkonu n% 6'sı ve kadmiyumun % 5'i topraktan uzaklaştırılmıştır. Beşinci yıkanmanın ardından bu değerler sırasıyla, % 70, % 25 ve % 15'e ulaşmıştır. Bu deneylerde % 1'lik NaOH ve % 0.1 surfaktan kullanılmıştır.

Sedimentlerden ağır metallerin (Cu ve Zn) uzaklaştırılması için surfaktin, ramnolipid ve sophorolipid kullanmanın uygunluğunu araştırmışlardır. % 0.5 rhamnolipid içeren tek bir yıkama, bakırın % 65'ini ve çinkonun % 18'ini uzaklaştırırken, % 4'lük sophorolipid bakırın % 25'ini ve çinkonun % 60'ını uzakştırmıştır. Çeşitli yüzey aktif maddelerle yıkandıktan sonra tortulardan, organik olarak bağlı bakırın çıkarılabileceği gösterilmiştir. Ayrırma kapasitesi yüksek biyosurfaktanların ramnolipid ve surfaksin olduğu ortaya konulmuştur. Daha sonra biyosurfaktanlar tarafından metalin uzaklaştırılmasının, yüzey aktif maddenin toprak yüzeyine emilmesi ve metal ile kompleksleştirilmesi, metalin topraktan çözelti içine ayrılması ve dolayısıyla yüzey aktif madde miselleri ile birleşmesi yoluyla meydana geldiğini ileri sürmüşlerdir (Mulligan vd. 2001).

Biyöretici bazlı ultrafiltrasyon kullanılarak, iki değerli metal iyonları olan, Cu^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} ve Ni^{+2} 'yi, tek değerlikli metal iyonları dönüştürerek sulu çözeltiden uzaklaştırılması çalışılmıştır. Polikarboksilik asit tipi biyoyüzeyaktif maddelerden, spiculisporic asitten türetilen 2-(2-karboksietil)-3-desil maleik anhidritin sodyum tuzu kullanılmıştır. Metal iyonları miseler ve formasyonel bağlanma yoluyla ağır metal tutuklaması yapmıştır. Metal yüzey aktif madde kompleksi çökeler. Metal remediasyonu için biyosurfaktanların kullanımı ile ilgili çalışmalar dışında, bakteriyel ve alg ekzopolisakkaridleri gibi diğer mikrobik ürünlerin ve kirlenmiş alanlardan metallerin uzaklaştırılması için diğer bakteriyel polimerler üzerinde de çalışma yapılmıştır. Bunların dışında, toprakta bakteri polimerleri tarafından iz metal mobilizasyonu gösterilmiştir. Mikrobiyel aktivite ile ilgili olmayan bir başka ilginç çalışmada, Quillaja kabuğundan elde edilen bitki kaynaklı biyosurfaktan saponin, kirlenmiş topraklardan ağır metallerin geri kazanımı için incelenmiştir. Saponin kullanımı, ağır metallerin topraktan % 90-100 oranında Cd ve % 85-98 oranında Zn ekstraksiyonu için etkili olmuştur. Metal iyileştirme için biyosurfaktanların kullanımının etkinliği, organik

bileşiklerle birlikte kontamine olmuş sitelerde yer alan maliyet açısından artmaktadır (Chi vd. 2009).

Zehirli ağır metallerin ortamdan uzaklaştırılması önemli bir sorundur. Giderim işlemlerinin basit, etkili ve ucuz olmalısı beklenmektedir. Ağır metallerin atık sulardan uzaklaştırılması için çeşitli işlemler önerilmiştir. Bu süreçler kimyasal çökeltme, iyon değişimi, sementasyon , koagülasyon ve flokülasyon , kompleksasyon, biyosorpsiyon ve membran proseslerini içermektedir .

Bu çalışmada, ucuz, geniş çapta uygulanabilir, verimli olduğu ve nispeten az miktarda çamur oluşturduğu için adsorpsiyon sürecine odaklanılmıştır. Aktif karbon etkili ve ucuz bir adsorbantır ve suyu arıtmak için çeşitli endüstrilerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Aktif karbon, ağır metalleri kompleksleştirerek ya da metal iyonlarının çeşitli yüzey oksijen içeren fonksiyonel gruplara elektrostatik çekimi ile giderir. Bununla birlikte, ticari aktif karbonlarda, bu fonksiyonel gruplar karbon yüzeyinin sadece küçük bir bölümünde bulunurlar; Bu grupların miktarındaki artış, aktif karbonun metal katyonları adsorbe etme kapasitesini artırabilir.

Aktif karbonun adsorbe katyonlarına olan kapasitesini arttırmak için birçok fonksiyonel/yüzey modifikasyonu yöntemi uygulamaya konmuştur. Bunlar kimyasal veya fiziksel tedavi ve yüzey modifikasyonu içerir. Bu metotlar arasında yüzey aktif maddelerin kullanıldığı yüzey modifikasyon yöntemleridir. Bu teknikler aktif karbonların çinko, kadmiyum ve krom gibi ağır metalleri emme kapasitesini önemli ölçüde artırabilir . Bununla birlikte, yüzey aktif madde ile emprenye edilen aktif karbonun (SIAC) ağır metalleri modifiye edilmemiş karbondan daha etkili bir şekilde adsorbe ettiği mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır (Chi vd. 2009).

Bu çalışmada, ticari aktif karbonun kadmiyum iyonlarını adsorbe etme kapasitesini artırmaya çalışmıştır. (Cd (II)). Aktif karbonun yüzeyini, anyonik yüzey aktif maddeler sodyum dodesil sülfat (SDS), sodyum dodesil benzen sülfonat (SDBS) veya dioktil sülfosüksinat sodyum (DSS) ile emprenye ederek modifiye edilmiştir. SIAC'ların Cd (II) 'yi adsorbe etmek için kapasiteleri çeşitli koşullar altında incelenmiştir. Ayrıca

aktive edilmiş karbonların yüzey özelliklerini de ölçmüştür. Bu özelliklerin SIAC'ların katyonları adsorbe etme yeteneği ile nasıl ilişkili olduğunu belirlenmiştir. Son olarak, bu SIAC'lerin Cd (II)'yi sulu çözeltiden çıkardığı bir mekanizma önerdik ve atık su arıtımı için kullanılacak olan adsorban olarak SIAC'ın yüzey yüklerini tartışılmıştır (Chi vd. 2009).

Anyonik yüzey aktif maddelerin Cd (II) giderimi üzerindeki etkisini anlamak için, bakire GAC beş farklı miktardaki SDS ile emprenye edilmiştir. Aktif karbonun yüzeyindeki SDS miktarı arttıkça spesifik yüzey alanı 643.5'ten 121.4 m² g⁻¹'e düşmüştür. Bu düşüş, SDS'nin GAC'nin mikro gözeneklerinin çoğunu kapladığı anlamına gelir. Bu fenomen, SDS-emdirilmiş aktif karbonun adsorplama kapasitesi için çok elverişli görünebilir, çünkü adsorbe iyonlarına aktif karbonun kapasitesi yüzey alanıyla orantılıdır. Bununla birlikte, aktif fonksiyonel grupların miktarı ve yüzey yükü de aktif karbonun adsorplama kapasitesini etkileyen önemli değişkenlerdir (Chi vd. 2009).

SDS-emdirilmiş aktif karbonun toplam asiditesi, SIAC üzerindeki SDS miktarı arttıkça azaldı. Bu sonuç, bakir GAC'nin asidik gruplarının SDS tarafından kaplandığını ve bu gruplar ile Cd (II) iyonları arasında daha düşük bir etkileşim olasılığının ortaya çıktığı anlamına gelir. Bununla birlikte, büyük miktarda asidik gruba sahip olan bakire GAC, Cd (II)'yi zayıf bir absorpsiyon kapasitesi olduğunu göstermiştir. Bu sonuç, bakire GAC'deki asidik grupların çoğunun Cd (II) iyonları ile etkileşime girebilen aktif olmayanlar olduğunu göstermektedir. Böylelikle, SDS ile emprenye etmek aktif karbonu aktif fonksiyonel gruplarla sağlayabilir. Sonuç olarak, GAC'nin Cd (II) 'yi adsorbe etme kapasitesi SDS ile emprenye edilerek 0.022 ila 0.198 mmol/g arasında önemli ölçüde artmıştır; Bu eğilim, SIAC üzerine surfaktan miktarı ile orantılıdır.

Katyonik ağır metalleri daha spesifik ve etkili bir şekilde giderebilen yeni bir aktif karbon türü geliştirmek için, aktif karbonun yüzeyine anyonik yüzey aktif maddelerin emdirilmesi ile modifiye edildiği SIAC'lar yarattılmıştır. Test edilen yüzey aktif maddeler arasında SDS, aktif karbonun Cd (II) adsorbe etme kapasitesini en etkili

şekilde arttırmıştır. SIAC'ın Cd (II)'yi adsorbe etme kapasitesi, aktif karbonun emdirildiği yüzey aktif madde miktarına orantılı olarak artmıştır (Chi vd. 2009).

SIAC'ların yüzey fonksiyonel grupları üzerine yapılan araştırmalar, artırılmış adsorptif kapasitelerinin, anyonik yüzey aktif maddenin hidrofilik başındaki negatif yüklü gruplara bağlı olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu gruplar aktif karbonun yüzey yükünü daha negatif yaptı ve Cd (II) adsorpsiyonunu kolaylaştırmıştır. Bu nedenle, anyonik yüzey aktif maddelerin kullanıldığı yüzey modifikasyon yönteminin, katyonik ağır metal iyonlarını adsorbe etmek için aktif karbonun kapasitesini arttırmak için kullanılabileceği sonucuna vardık (Chi vd. 2009).

Bu çalışma, izole maya türlerinin ölü biyokütlesi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Zn (II) 'nin sulu ortamdan uzaklaştırılması için biyosorban olarak *Candida rugosa* ve *Candida laurentii*. *C. rugosa* ve *C. laurentii*, birlikte kullanılmış ve 30 °C'de 90 mg L⁻¹ Zn (II) varlığında pH 6.0'da çinkonun % 65.4 ve % 54.8'inin gidermiştir. Zn (II) giderimindeki dikkate değer artış, SEM analizi ile teyit edilen anyonik yüzey aktif madde sodyum dodesil sülfat (SDS) ile muamele edilmiş ölü maya biyokütlesi kullanılarak not edildi. Deneysel veriler iki, üç ve dört parametrelili izoterm modelleri kullanılarak analiz edildi. İzoterm profilini tanımlamak için en uygun denklem Freundlich modeliydi. Biyosorbent performansı, sodyum aljinat boncukları içinde tutulan *C. rugosa*'nın SDS ile muamele edilmiş ölü biyokütlesi ile doldurulmuş kolon modunda değerlendirilmiştir. FT-IR analizi, Zn (II)'nin maya ile bağlanmasında -NH, -CO ve -COOH fonksiyonel gruplarının rol oynadığını gösterdi. Bu çalışma, *C. rugosa*'nın immobilize edilmiş SDS ile muamele edilmiş ölü biyokütlesinin, Zn (II) iyonlarının sulu çözeltiden uzaklaştırılması için potansiyel ve çevre dostu bir biyosorbik olarak kullanılabileceğini doğrulamıştır.

pH'ın Zn (II)'nin maya türleri tarafından uzaklaştırılması üzerindeki etkisi 3-9 pH aralığında değerlendirildi. Maya türlerinin her ikisi için adsorbat çözeltisinin pH'sının artması ile birlikte çinko giderme yüzdesinin arttığını göstermiştir. Karşılaşılan bu pH bağımlı giderim , çözelti içinde metal alımı ve metal kimyasında yer alan fonksiyonel gruplar tarafından açıklanabilir. Çinko çözeltisinin başlangıç pH'sini arttırmak için,

biyosorban yüzeyindeki net negatif yük artar. Biyosorpsiyon yüzeyleri daha fazla negatif yüklü hale geldiği için çinko iyonlarının emilimi artmıştır. pH 6.0'da dengeye ulaşmıştır. Yüksek asidik pH'ta daha düşük metal giderimi, pozitif yüklü Zn (II) iyonları ve hidrojen iyonları arasındaki metal bağlama bölgeleri için olan rekabete bağlı olabilir. En iyi pH 6'da *Saccharomyces cerevisiae* kullanılarak çinkonun giderilmesi için benzer sonuçlar elde edilmiştir (Wang 2012).

Mevcut bölgelerin sayısı ve adsorpsiyon için iyon değiştirmeleri, biyosorpsiyon işlemindeki adsorban miktarına bağlıdır. Adsorbent konsantrasyonunun metal giderme verimliliği üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Her iki maya türünün çinko gideriminin, biyosorbent dozu 1,5 g/L'e kadar artan biyosorbent konsantrasyonu ile hızla arttığı bulunmuştur. Bununla birlikte, bu dozajın ötesinde, konsantrasyon gradyanında azalmaya bağlı olarak giderim verimliliği azaltılmıştır. Biyosorbent dozajındaki artışla birlikte gideriminin verimindeki artış, adsorpsiyon için kullanılabilir alanların ve değiştirilebilir iyonların artan sayısına bağlanabilir.

Çözeltideki çinkonun başlangıçtaki konsantrasyonu, Zn (II)'nin denge alımını önemli ölçüde etkilemiştir. Başlangıç konsantrasyonunun, denge işleminden dolayı genel olarak beklenen çinko giderimini arttırdığı belirtilmiştir. Metal giderimindeki bu artış, başlangıçtaki metal konsantrasyonlarındaki artışla birlikte, sorpsiyon için daha yüksek metal iyonları (çinko) mevcudiyetinden kaynaklanmıştır. Üstelik, daha yüksek başlangıç konsantrasyonu, metal iyonları ve sorbentler arasında daha yüksek çarpışma olasılığı ile sonuçlanan, sulu ve katı faz arasındaki metal iyonlarının tüm kütle transfer direncine gelmek için artan itici güç sağlar. Bu ayrıca daha fazla giderme neden oldu. Çinko (II) 'nin zamanın bir fonksiyonu olarak iki maya türünün gideriminde de gösterilmektedir. Her iki tür için çinko giderim verimliliği 240 dakikada dengeye ulaşmıştır. İlk aşamalarda biyokütle üzerinde aktif bağlanma alanlarının bol miktarda bulunmasından dolayı biyosorbentlerin metal giderimi hızlı bir şekilde artmıştır ve bu alanların kademeli olarak dolmasıyla, emilim sonraki aşamalarda daha az verimli hale gelmiştir. Bu nedenle, Zn (II)'nin *C. rugosa* ve *C. laurentii* tarafından maksimum olarak uzaklaştırılması, optimum duruma göre sırasıyla % 65.4 ve % 54.8 olarak bulunmuştur.

Zn(II) giderimindeki dikkate değer artış, 3 mM SDS konsantrasyonunda kaydedildi; bu oran, *Candida rugosa* ve *Candida laurentii* tarafından sırasıyla % 75.0 ve % 84.7 olarak bulundu. SDS konsantrasyonundaki daha fazla artış Zn(II) giderimini azaltmıştır. Benzer sonuçlar (Rao vd. 2010) 2 mM konsantrasyonda SDS ilavesinin, hardal yağı kekinden türetilen karbon üzerindeki Zn (II) adsorpsiyon sürecini desteklediğini bildirmişlerdir. SDS'nin kritik misel konsantrasyonu (KMK) 8 mM'dir. Yüzdesel adsorpsiyon KMK değerinin (8 mM) altında SDS varlığında artar (Lin vd. 1999). KMK'nin üstünde adsorpsiyondaki bir azalma, miseller metal kompleksinin, kütlenin yüzermeyle yüzeyine yavaş bir şekilde aktarılmasından kaynaklanabilir. SDS molekülleri, KMK'nin üzerinde dinamik agregasyon (miseller) oluşturur. Bu miseller hidrofobik bir iç ve dış cepheye sahiptir ve bu da dağınık yağ damlaları gibi davranmasına neden olur. Mikeller ve iyon türleri arasındaki etkileşim esas olarak hidrojen bağı ve elektrostatik kuvvetler aracılığıyla gerçekleşir (Das vd. 2012).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Mikroorganizma Kaynağı

Bu tez çalışmasında, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan, 12 maya izolatu kullanılmıştır.

3.1.2 Cu (II) Stoğu Hazırlanması

Cu (II) stoğu hazırlanmasında, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck, CAS numarası 7758-99-8) kullanılmıştır. Stok, steril distile su içinde 20.000 mg/L olacak şekilde çözülüp otoklavlanarak hazırlanmıştır. Deney düzenekleri hazırlanırken bu stoktan alınan boya melaslı besiyerlerine eklenmiştir.

3.1.4 Surfaktan Stoklarının hazırlanması

Maya hücreleri kullanılarak Cu (II) gideriminin araştırıldığı çalışmalarda, giderim veriminin artırılması amacı ile iki farklı surfaktan kullanılmıştır. Bunlar Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (Scharlau CAS numarası 151-21-3) ve Alkiltrimetil amonyum bromür (CTAB) (Sigma-Aldrich marka CAS numarası 57-09-0) surfaktanlarıdır. Surfaktanın steril distile suda çözülmesiyle hazırlanan surfaktan stok solüsyonlarının konsantrasyonu 0.5 mM olup istenilen miktarlarda melaslı besiyerlerine eklenmiştir.

3.2 Yöntem

Melaslı besiyerine üremekte olan aktif hücrelerle yapılan biyobirikim çalışmalarında, surfaktanların Cu (II) giderimine etkisi, Cu (II) ve surfaktan konsantrasyonları değiştirilerek incelenmiştir.

Cu (II) ve surfaktan içermeyen besiyerinde geliştirilmiş biyokütle ile yapılan biyosorpsiyon denemelerinde ise, farklı kütlelerdeki yaş maya hücreleri ile biyokütlenin surfaktanlı ortamda Cu (II) biyosorpsiyona etkisi araştırılmıştır.

3.2.1 Maya seçimi

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan alınan izolatlar ve 25 mg/l Cu (II) içeren melaslı sıvı besiyerlerinde pH 5’de üç gün boyunca 30 °C’de 100 devir/dakika’lık çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.2 Mikroorganizmanın kültür koşulları

Çalışmada farklı konsantrasyonlarda Cu (II) ve surfaktan içeren melaslı sıvı besiyerleri kullanılmıştır. Kültür ortamının pH’ı, 0.1 M NaOH veya 0.1 M H₂SO₄ ile istenilen değere ayarlandıktan sonra besiyerleri, 250 ml’lik erlenlere 100 ml olacak şekilde aktarılmıştır. Besiyerlerine aktif kültürlerden % 5 (v/v) mikroorganizma inoküle edilerek, 30 °C’de 100 devir/dakika ile çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Çalışmada mikroorganizma bulunmayan, aynı miktarda surfaktan ve boya içeren besiyerleri kontrol amacıyla kullanılmıştır.

Mikroorganizmalar ana deney erlenlerine aktarılmadan önce aktarılabilecekleri ortamdaki ile aynı miktarda Cu (II) ve surfaktan konsantrasyonu içeren melaslı besiyerinde 3’er gün geliştirilerek iki kez alıştırma yapılmış, ardından bu aktif kültürler ana besiyerlerine inoküle edilmiştir.

3.2.3 Seçilen mayanın tanılanması

İzolatların üstel (logaritmik) olarak büyüyen kültüründen elde edilen tüm hücreler, genomik DNA izolasyonu ve konvansiyonel PZT (Polimeraz Zincir Tepkimesi) ile 18S rDNA’nın transkriptine dahil olan aralayıcı (spacer) (ITS) bölgelerinin amplifikasyonu için kullanıldı. Maya suşlarının genomik DNA’sı DNABiz kiti kullanılarak izole edildi.

ITS bölgeleri daha sonra ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılarak PZT amplifiye edildi. PZT, MyTaq DNA polimerazı (Bioline UK) kullanılarak gerçekleştirildi. Termal döngü koşulları; 1 dakika başlangıç denatürasyon basamağında 94 °C’de, ardından 45 döngüde denatürasyon için 45 saniye, bağlanma için 55 °C’de ve uzama için 72 °C’de 45 saniye olacak şekilde yapılmıştır. Sanger dideoksi zincir sonlandırma DNA dizilemesi, ABI 3100 Genetic Analyzer kullanılarak harici bir laboratuvarında (Refgen, Ankara, Türkiye) yine ITS1 ve ITS4 sekans primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Maya izolatının elde edilen ITS sekansı, NCBI’nin nükleotit BLAST arama motoru kullanılarak filogenetik analize tabi tutulmuştur. Sonuç olarak, izole edilmiş mikroorganizmanın dizisi belirlenmiş olan ITS bölgesi, veritabanında mevcut *K. marxianus*’un ITS bölgesi ile % 100 dizi benzerliği gösterdiği bulunmuştur. Mikroorganizmanın ITS dizisi MH261382 erişim numarası altında NCBI’nin GeneBank dizi veritabanına yüklenmiştir.

3.3.1 Surfaktan seçimi

Biyogiderimin kapasitesinin artırılmasına en yüksek katkıyı sağlayan surfaktanın bulunması amacı ile deneylerde iki çeşit surfaktan kullanılmıştır. Bu deneylerde, besiyerlerine yaklaşık 25 mg/l Cu (II) eklenmiştir. Ardından bu besiyerlerine 0.1 mM CTAB ve 0.1 mM SDS eklenmiştir. Ardından maya inokülasyonu yapılan besiyerlerinden 3. ve 5. günlerde 5 mL’lik örnekler alınmıştır. Alınan örnekler 10 dakika 5000 devir/dakikada santrifüj edilerek elde edilen pellet ile mikrobiyel gelişim ve spektrofotometrik Cu (II) analizleri yapılmıştır. Mikroorganizma içermeyen melaslı besiyerlerinde yapılan deneylerde Cu (II)’nin kendiliğinden giderimi ve Cu (II)’nin sadece surfaktan varlığında giderimi de takip edilmiştir.

3.3.2 İnkübasyon süresinin ve surfaktanın giderime etkisinin belirlenmesi

Surfaktan ile giderimde inkübasyon süresinin etkisinin araştırılması için deneyler yapılmıştır. Bu deneylerde, melaslı besiyerlerine Yaklaşık 25 mg/L Cu (II) eklenmiştir.

Ardından bu besiyerlerine 0.1 mM SDS eklenmiştir. 5 günlük inkübasyon süresince boyunca 5 mL’lik örnekler alınmıştır. Alınan örnekler 10 dakika 5000 devir/dakikada santrifüj edilerek mikrobiyel gelişim ve spektrofotometrik Cu (II) analizleri yapılmıştır. Mikroorganizma içermeyen besiyerlerinde yapılan deneylerde Cu (II)’nin kendiliğinden giderimi ve Cu (II)’nin sadece surfaktan varlığında giderimi incelenmiştir.

3.3.3 Başlangıç Surfaktan ve Cu (II) konsantrasyonunun birlikte etkisinin belirlenmesi

Besiyerleri artan konsantrasyonlarda (yaklaşık 25-100 mg/L) Cu (II) ve farklı konsantrasyonlarda (0 mM, 0.1mM, 0.5 mM) SDS eklenerek deneyler yapılmıştır. Maya inokülasyonu yapılmayan besiyerleri ile kontrol deneyleri yapılmıştır. Inkübasyon süresi boyunca besiyerlerinden 5 ml’lik örnek alınmıştır. Bu örnekler 10 dakika 5000 devir/dakikada santrifüj edildikten sonra pellet kısımları ile mikrobiyel gelişimleri, üst fazları ile Cu (II) giderim miktarları analiz edilmiştir.

3.3.4 Biyosorpsiyon çalışmaları

3.4.1 Biyokütlenin hazırlanması

Biyosorpsiyon çalışmalarında kullanılacak biyokütlesinin eldesi için hazırlanan melaslı besiyerleri pH 5’te, 250 mL’lik Erlen-Mayer’lere, 100 mL olacak şekilde konulmuştur. Ardından aynı özelliklerdeki besiyerlerine alıştırılmış mayalar, bu besiyerlerine ekilip üç gün boyunca inoküle edilmiştir. Daha sonra, besiyerlerinden alınan örnekler 10 dakika 5000 devir/dakikada santrifüj edilmiş (Hettich EBA 12) üst fazdan uzaklaştırılarak elde edilen maya pelleti deneylerde kullanılmıştır (Nüve FN400).

3.4.2 Biyosorpsiyona pH etkisinin belirlenmesi

Biyosorpsiyon çalışmaları sırasında en yüksek sorpsiyonun yapıldığı pH değerini belirlemek için ortamın pH’ı sırasıyla 3, 6 ve 9’a ayarlanmış ve bu ortamlara yaklaşık 25, 50, 75 ve 100 ppm Cu (II) eklenmiştir. Biyosorpsiyona surfaktan etkisinin

belirlenmesi amacı ile her bir Cu (II) konsantrasyonun bulunduğu ortama 0.1mM ve 0.5 mM SDS eklenmiştir. denenmiştir. Biyosorpsiyon deneyleri, 250 ml'lik erlenlerde toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile suya, Cu (II) ve surfaktan ilave edildikten sonra pH ayarı yapılarak gerçekleştirilmiştir. Denemelerde 1g/L kuru ağırlık olacak şekilde yaş biyokütle kullanılmıştır. Yaş biyokütle ilave edilen Erlen'ler 4 saat boyunca 30°C de 100 devir/dakika'lık çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi boyunca 0,15, 30, 120, 240, 360, 720 ve 1440. Dakikalarda erlenlerden örnek alınarak Cu (II) analizi yapılmıştır.

3.5 Analiz Yöntemleri

3.5.1 Cu (II) analizi

Deney ortamına ilave edilmiş Cu (II) analizi ise amonyak içeren ortamda Sodyum dietilditiyokarbamatın verdiği renkli komplekslerden yararlanılarak spektrofotometrik yöntemle yapılmıştır. Reaksiyonda kullanılan Sodyum dietilditiyokarbamat solüsyonu 0.1g tartılıp 10 ml distile suda çözülerek hazırlanmıştır. İnkübasyon sırasında belirli zamanlarda alınan örnekler, 5000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant, besiyerinde kalan Cu (II) analiz için kullanılmıştır. Süpernatanttan 1 ml alınıp 1.15 M'lık amonyaktan 20 ml ve Sodyum dietilditiyokarbamat solüsyonundan 200 µl alınarak hazırlanan karışım 25 ml'ye tamamlanmıştır. Ölçümler spektrofotometrik olarak 460 nm'de gerçekleştirilmiştir.

3.5.2 Mikrobiyel gelişimin optik yoğunluğunun belirlenmesi

Çalışma boyunca yapılan deneylerde, örnekler 5000 devir/dk.'da 10 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve pelletler 3 ml distile su ile vortekslenmiştir. Ardından süspansiyonların spektrofotometrede (Shimadzu 1200V) 600 nm dalga boyunda ölçümleri yapılmıştır. Optik yoğunlukları biline besiyerlerinden elde edilen biyokürle gravimetrik ölçümleri ile oluşturulan eğimler sonucunda bulunan değer 0.0152 olark kaydedilmiştir. Optik yoğunluğun konsantrasyona çevirimi bu değer ile hesaplanmıştır.

3.5.3 Cu (II) standardının hazırlanması

Balon jojelerde hazırlanan 10, 20, 40 ve 100 mg/L konsantrasyonlardaki Cu (II) çözeltilerinin spektrofotometrik analizi ile absorbans değerleri belirlenmiştir. Belirlenen değerler kullanılarak çizilen eğrinin eğimi çalışmalar boyunca kantitatif ölçümler için kullanılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Bakır standardı

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu tez çalışmasında, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan 12 mayanın Cu (II) giderim kapasiteleri belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda en yüksek Cu (II) giderimi 5 kodlu izolat kullanıldığında elde edilmiştir. Genetik tanılaması yapılan 5 kodlu izolatın *Kluyveromyces marxianus* olduğu saptanmıştır. Cu (II) başlangıç konsantrasyonu, surfaktan çeşidi ve konsantrasyonu ve inkübasyon süresi gibi değişkenlerin biyoakümüülasyon üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Ek olarak 1 g/L kuru *K. marxianus* biyokütlesine tekabül eden yaş biyokütle kullanılarak yapılan biyosorpsiyon deneylerinde Cu (II) giderimine SDS'nin etkisi de araştırılmıştır. Bu amaç ile yapılan deneylerde, pH, artan Cu (II) konsantrasyonu ve biyosorpsiyon süresi gibi parametreler optimize edilmiştir.

4.1 Biyoakümüülasyon Çalışmaları

4.1.1 Yüksek kapasitede Cu (II) gideren maya seçimi

Tez çalışmasında kullanılmak üzere yüksek kapasite ile Cu (II) giderimi yapabilen mayayı seçebilmek için on iki farklı maya izolatı, yaklaşık 25 mg/L Cu (II) içeren pH değeri 5'e ayarlanmış melaslı besiyerlerine inoküle edilmiş ve gelişimlerinin 3. gününde Cu (II) giderim analizleri yapılmıştır. Biyogiderim verimlerinin % olarak belirtildiği çizelge 4.1'de 5 numaralı izolatın diğerlerine göre daha yüksek kapasitede Cu (II) giderdiği görülmektedir. Bu yüzden başlangıç Cu (II) konsantrasyonu, surfaktan çeşidi ve konsantrasyonu ve inkübasyon süresinin mayaların Cu (II) giderimine olan etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda 5 numaralı izolat (*K. marxianus*) kullanılmıştır.

Çizelge 4.1 Farklı mayaların melashı besiyerinde gelişimlerinin 3. günlerindeki Cu (II) giderim kapasiteleri

izolat no	biyogiderim, %
1	52.7±2.1
2	67.7±2.1
3	68.4±2.4
4	63.3±1.5
5	82.7±2.4
6	75.0±1.9
7	78.8±3.2
8	71.7±1.7
9	45.6±1.5
10	42.7±1.7
11	51.7±2.9
12	55.4±1.0

*(T:30 °C, çalkalama hızı: 100 devir/dakika, pH: 5, C₀:24.8 ppm)

4.1.2 Surfaktan seçimi

Biyoakümülyasyon çalışmalarında biri anyonik diğeri katyonik olmak üzere iki farklı surfaktan kullanılmıştır. Literatürde kullanılan en yaygın katyonik surfaktanlardan biri olan CTAB ve yine literatürde en yaygın kullanılan anyonik surfaktanlardan biri olan SDS bu çalışmalar için tercih edilmiştir. Cu (II) giderimine en uygun surfaktanın belirlenmesi için, ilk besiyerine sadece yaklaşık 25 mg/L Cu (II), diğeri besiyerlerine ise sırasıyla 0.1 mM CTAB ve SDS eklenmiştir. Ardından bu besiyerlerine *K. marxianus* inokülyasyonu yapılarak gelişimin 3. ve 5. günlerindeki Cu (II) giderim kapasiteleri belirlenmiştir. Hem ağır metalin kendiliğinden giderimini hem de surfaktanın ağır metal gideriminde tekli etkisini belirlemek için kontrol deneyleri yapılmıştır.

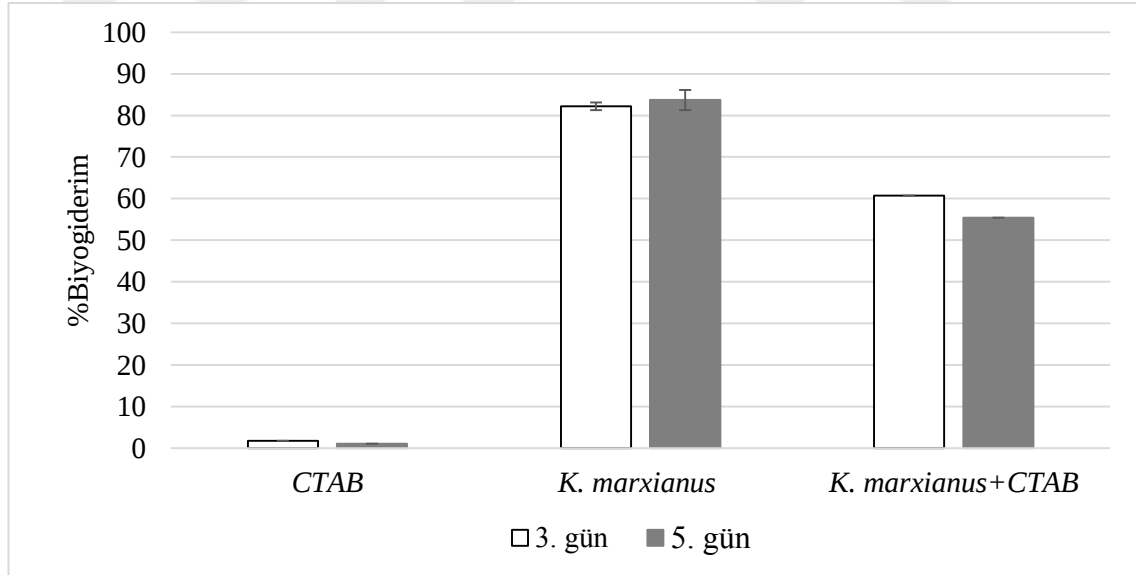
Şekil 4.1 - 4.2'de ortamda bulunan 0.1 mM SDS'in Cu (II) giderimi arttırdığı, öte yandan aynı konsantrasyonda CTAB'nin mikrobiyel gelişmeyi olumsuz yönde etkilemek suretiyle giderimi olumsuz yönde etkilediği görülmektedir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Yaklaşık 25 mg/L Cu (II) ve 0.1 mM surfaktan içeren ve içermeyen melashı besiyerlerinde görülen mikrobiyel gelişme

	Mikrobiyel gelişme (g/L)	
	3.gün	5.gün
<i>K. marxianus</i>	0.7±0.1	0.6±0.1
<i>K. marxianus</i> +CTAB	0.3±0.0	0.3±0.0
<i>K. marxianus</i> +SDS	0.6±0.0	0.5±0.0

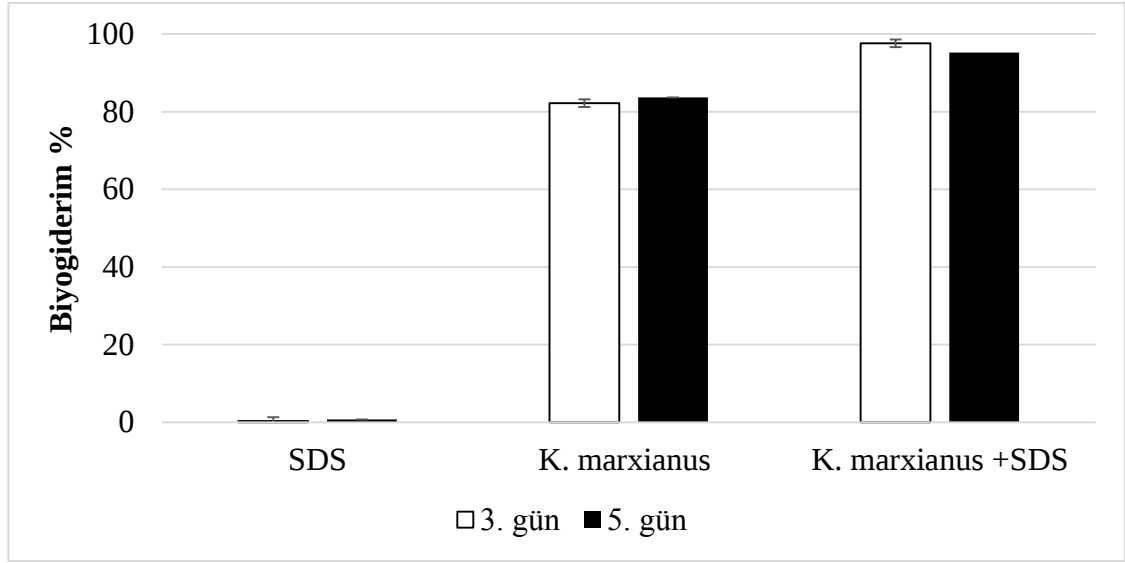
*(T:30 °C, çalkalama hızı: 100 devir/dakika, pH: 5)

Şekil 4.2’de, *K. marxianus* tarafından gerçekleştirilen en yüksek Cu (II) biyogiderimi inkübasyonun 5. gününde % 83.7 iken, ortama ilave edilen 0.1 mM SDS’in bu oranı inkübasyonun 3. gününde % 97.6’ya çıkardığı görülmektedir. Sonuç olarak SDS ilavesi ile giderimin % 13.9 arttığı görülmüş, bunun yanı sıra giderim daha kısa sürede elde edilmiştir.



Şekil 4.1 0.1mM CTAB içeren besiyerinde Cu (II) giderimi

(T:30 °C, çalkalama hızı: 100 devir/dakika, pH 5, C₀: 25 mg/L)



Şekil 4.2 0.1mM SDS içeren besiyerinde Cu (II) giderimi (%) .

(T:30 °C, çalkalama hızı: 100 devir/dakika, pH 5, C₀: 25 mg/L).

4.1.3 K. marxianus'un mikrobiyel gelişimine inkübasyon süresinin etkisi

Yapılan deneylerde SDS' nin Cu (II) biyogiderimini arttırdığı görüldükten sonra, mikrobiyel gelişim yaklaşık 25 mg/L Cu (II) ve 0.1 mM SDS içeren melaslı besiyerinde beş günlük inkübasyon süresi boyunca takip edilmiştir.

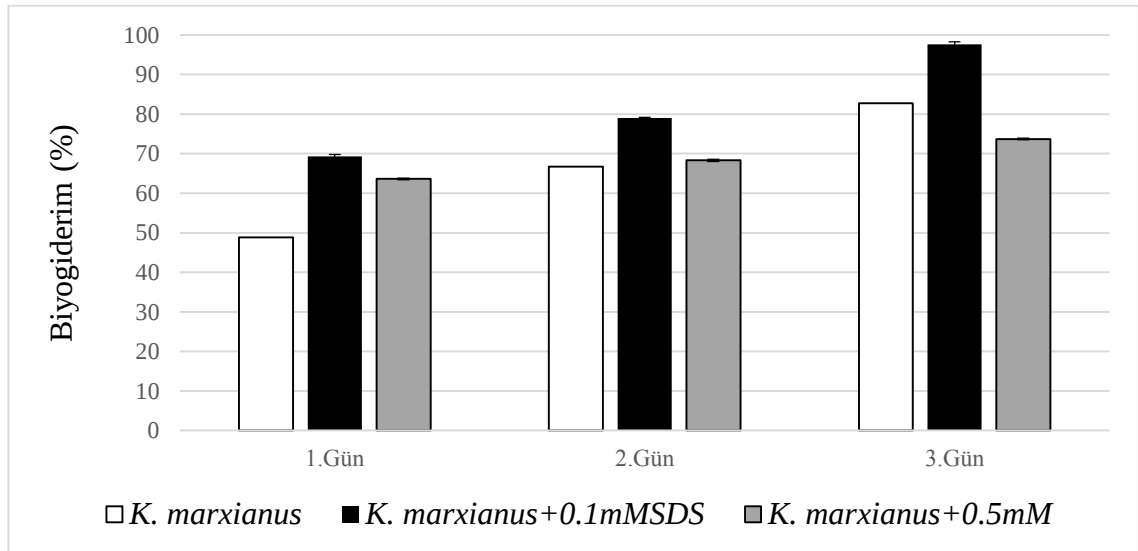
Çizelge 4.3'te besiyerine ilave edilen 0.1 mM SDS'in inkübasyon süresi boyunca mikrobiyel gelişme üzerinde herhangi bir olumsuz etki göstermediği görülmektedir.

Çizelge 4.3 SDS içeren ve içermeyen, 25mg/L Cu (II) varlığında melaslı besiyerlerindeki mikrobiyel gelişme (g/L)

İnkübasyon süresi (gün)	Mikrobiyel gelişim (g/L)	
	<i>K. marxianus</i>	<i>K. marxianus</i> + 0.1mM SDS
1	0.4±0.0	0.5 ±0.0
2	0.6 ±0.1	0.6 ±0.1
3	0.6 ±0.1	0.6 ±0.0
4	0.7 ±0.1	0.7 ±0.1
5	0.7 ±0.0	0.8 ±0.0

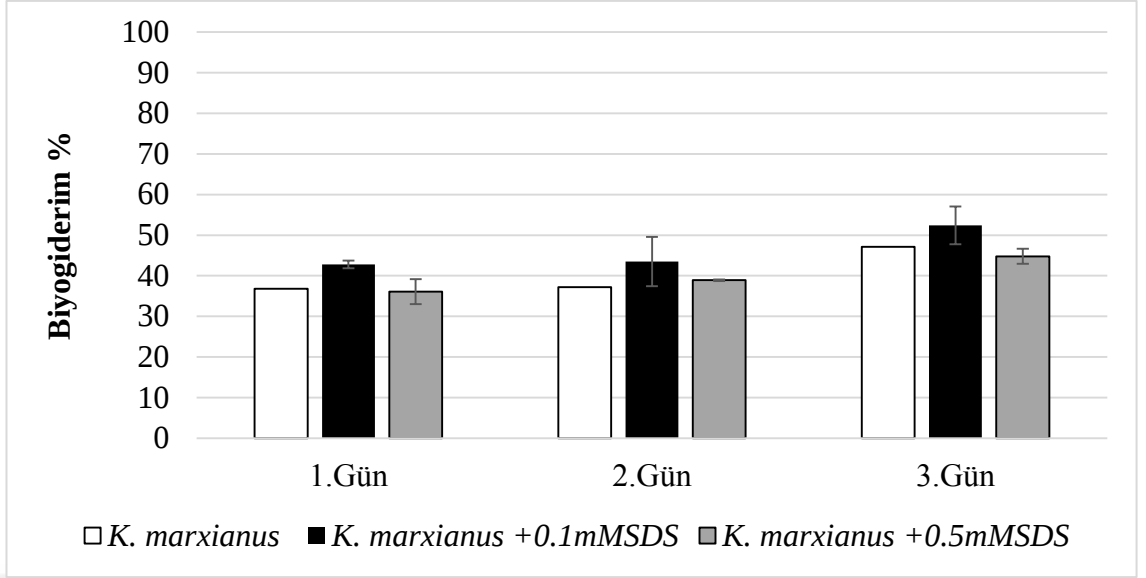
4.1.4 Başlangıç Cu (II) ve SDS konsantrasyonlarının biyogiderimine etkisi

Başlangıç Cu (II) ve SDS konsantrasyonlarının *K. marxianus* ile ağır metal giderimine etkisini belirlemek için yapılan çalışmalarda, yaklaşık 25, 50, 75 ve 100 mg/L Cu (II) içeren besiyerlerine 0.1 mM ve 0.5 mM SDS ilavesi yapılmıştır. Denenen tüm başlangıç Cu (II) konsantrasyonlarında SDS'nin tek başına giderim yapmadığı gözlenmiştir. 0.5 mM SDS ve yaklaşık 75 mg/L ve 100 mg/L Cu (II) içeren besiyerlerinde mikrobiyel gelişme görülmemiştir. Ek olarak Cu (II) konsantrasyonu arttıkça giderim kapasitelerinde azalma saptanmıştır (Şekil 4.4 - 4.7). 25 mg/L Cu (II) varlığında en yüksek giderim % 82.7 iken, aynı konsantrasyonda Cu (II) içeren ortama 0.1 mM SDS eklendiğinde giderim % 97.6 ulaşmıştır. 50 mg/L Cu (II) varlığında en yüksek giderim % 47.1 iken ortama 0.1 mM SDS eklendiğinde giderim % 52.4 değerine ulaşmıştır. 75 mg/L Cu (II) varlığında en yüksek giderim % 34.4 iken 0.1 mM SDS eklendiğinde giderim % 35 değerine ulaşmıştır. 100 mg/L Cu (II) varlığında en yüksek giderim % 22.7 iken 0.1 mM SDS eklendiğinde giderim % 26.6 değerine ulaşmıştır. En yüksek giderim verimleri denenen tüm konsantrasyonlar için, 3. günde ve 0.1 mM SDS varlığında bulunmuştur. Denenen tüm Cu (II) konsantrasyonlarında ortama eklenen 0.5 mM SDS biyogiderimi olumsuz yönde etkilemiştir.



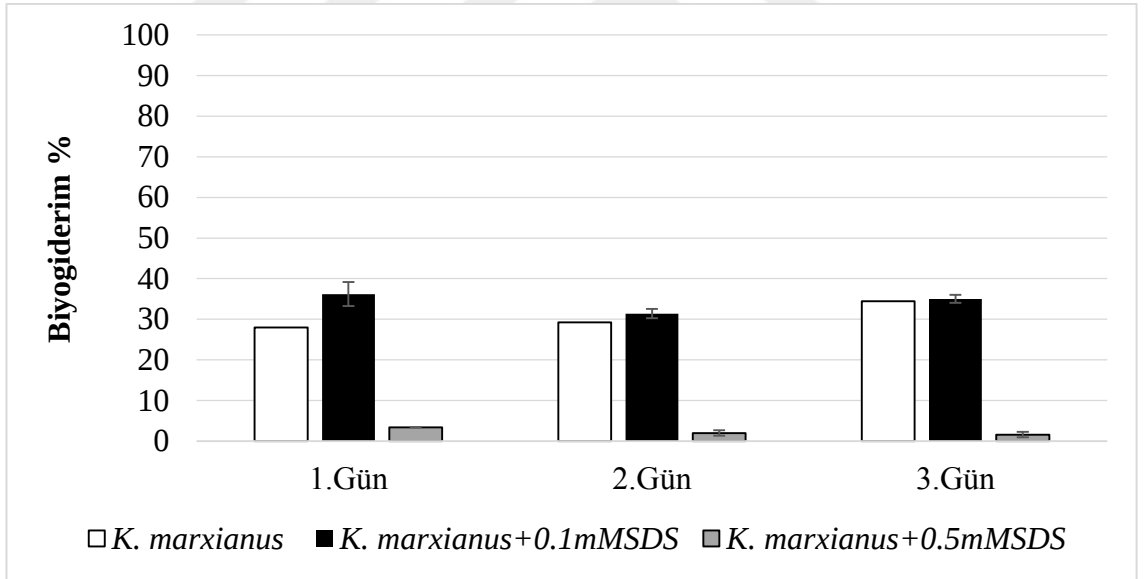
Şekil 4.4 *K. marxianus* mayasının 25 mg/L Cu (II), 0.1mM SDS, ve 0.5mM SDS varlığında biyogiderim verimi

(T:30 °C, çalkalama hızı: 100 devir/dakika, pH 5, C₀: 25 mg/L)



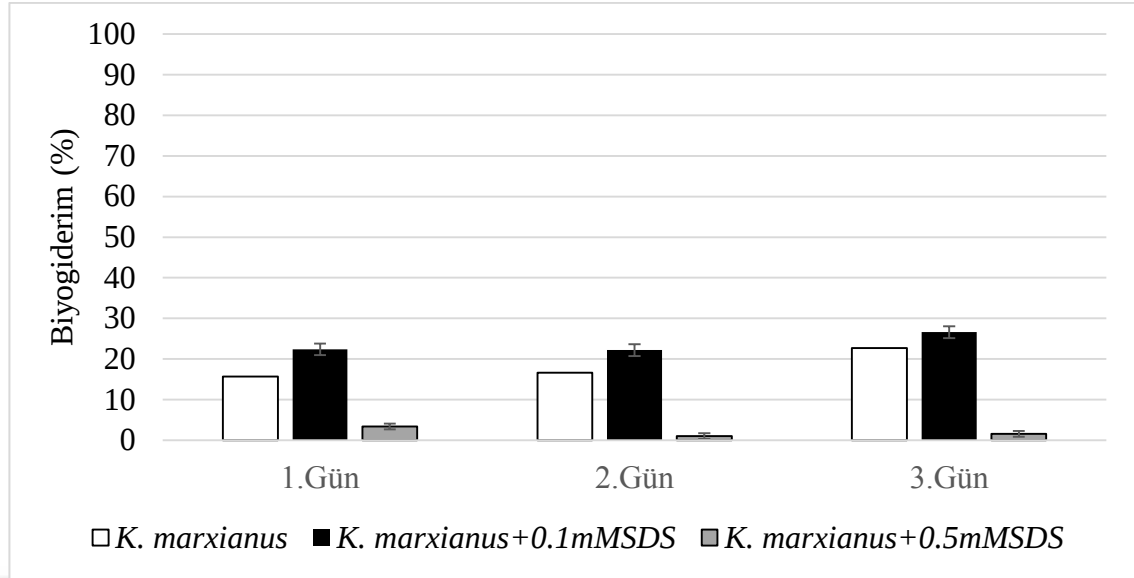
Şekil 4.5 *K. marxianus* mayasının 50 mg/L Cu (II), 0.1mM SDS, ve 0.5mM SDS varlığında biyogiderim verimi

(T: 30 °C, çalkalama hızı: 100 devir/dakika, pH 5, C₀ 50 mg/L)



Şekil 4.6 *K. marxianus* mayasının 75 mg/L Cu (II), 0.1mM SDS, ve 0.5mM SDS varlığında biyogiderim verimi

(T: 30 °C, çalkalama hızı: 100 devir/dakika, pH 5, C₀: 75 mg/L)



Şekil 4.7 *K. marxianus* mayasının 100 mg/L Cu (II), 0.1mM SDS,ve 0.5mM SDS varlığında biyogiderim verimi

(T:30 °C, çalkalama hızı: 100 devir/dakika, pH 5, C₀: 100.0 mg/L)

Çizelge 4.4 Artan konsantrasyonlarda Cu (II) ve SDS varlığında *K. marxianus* mayasının üçüncü gün mikrobiyel gelişimleri (g/L)

Cu (II) (mg/L)	Mikrobiyel gelişim (g/L)		
	<i>K. marxianus</i>	<i>K. marxianus</i> + 0.1 mM SDS	<i>K. marxianus</i> + 0.5 mM SDS
26.47	0.7±0.0	0.8±0.0	0.6±0.0
49.71	0.6±0.0	0.7±0.1	0.7±0.0
77.18	0.6±0.1	0.6±0.0	-
101.97	0.6±0.0	0.5±0.0	-

4.2 Cu(II) Biyosorpsiyon Deneyleri

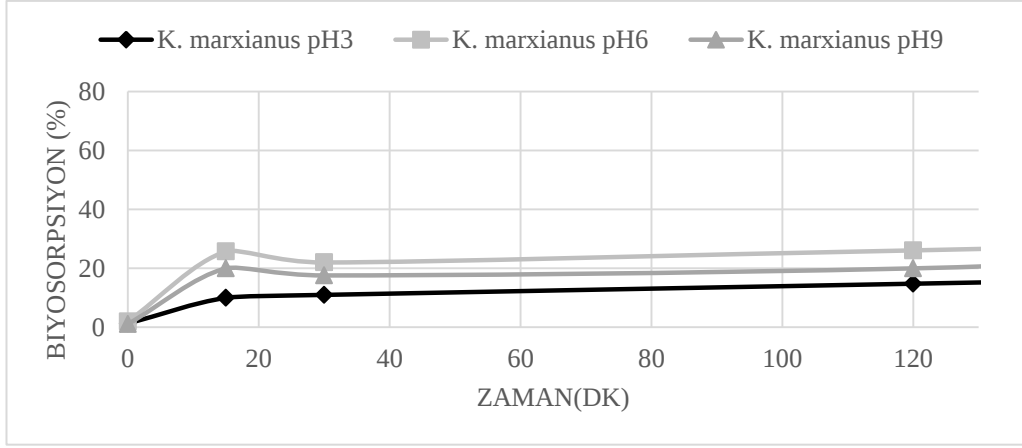
4.2.1 Başlangıç pH değeri ve başlangıç Cu (II) konsantrasyonunun biyosorpsiyon kapasitesine etkisi

Yaklaşık 25, 50, 75 ve 100 mg/L Cu (II) içeren 1 g/L *K. marxianus* biyokütlesi ile yapılan deneylerde surfaktanların biyogiderime etkisini belirlemek amacıyla 0.1 mM SDS içeren ve içermeyen ortamlarda biyosorpsiyon kapasitesi araştırılmıştır.

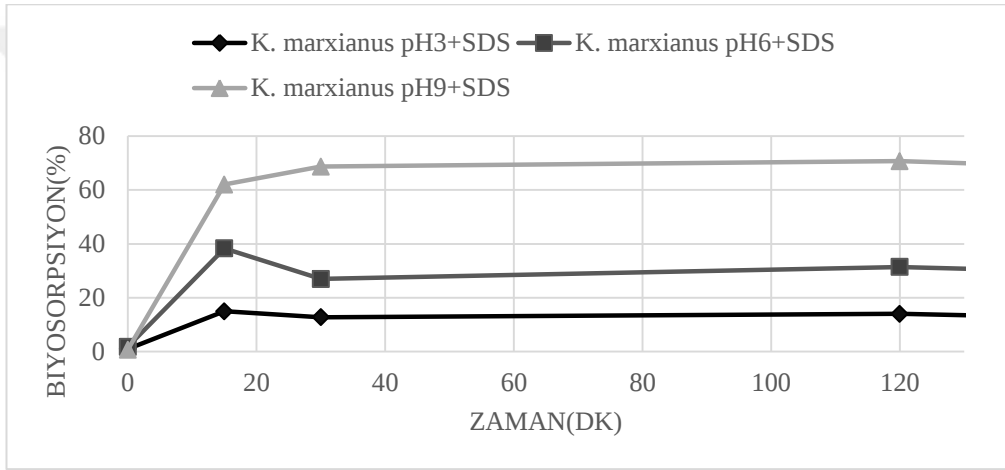
Ortamın başlangıç pH değerinin biyosorpsiyona etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda 3, 6 ve 9 olmak üzere üç farklı pH değeri denenmiştir. Biyosorpsiyon deneylerinde 24 saat (1440 dakika) boyunca örnekler alınmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde 120 dakikadan sonra yapılan ölçümlerde giderimin değişmediği gözlenmiş ve bu zamana ait sonuçlar değerlendirilmiştir.

Şekil 4.8.a,b’de farklı pH değerlerinde yaklaşık 25 mg/L Cu (II) içeren, 0.1 mM SDS ilave edilmemiş ve edilmiş ortamlarda 120 dakika boyunca elde edilen biyosorpsiyon verimleri gösterilmiştir. Şekil 4.8.a’da SDS içermeyen ortamlarda denen her üç pH değeri için de en yüksek biyosorpsiyon veriminin 15. dakikada elde edildiği gözlenmiştir. Bu değerler pH 3, 6, ve 9 için sırasıyla % 10, % 25.7 ve % 20 olarak elde edilmiştir. Sonuçta sadece maya hücrelerinin kullanıldığı biyosorpsiyon deneylerinde en yüksek biyogiderimin pH 6’da bulunmuştur.

Şekil 4.8.b’de ise ortama ilave edilen 0.1 mM SDS’nin artan pH değerlerinde biyosorpsiyon kapasitesi üzerine etkili olduğu gösterilmiştir. Ortamda maya hücreleri ve surfaktanın birlikte bulunduğu durumda da en yüksek biyosorpsiyon 15. dakikada gözlenmiştir. Bu değerler pH 3, 6, ve 9 için sırasıyla % 15, % 38.3, % 62 olarak bulunmuştur. Ortama surfaktan ilavesinin surfaktan içermeyen sadece maya biyokütlesi içeren ortama göre biyosorpsiyon için optimum pH değerini 6 dan 9’a çıkardığı, bununla birlikte giderimi de pH 6 için % 25.7 den % 38.3’e, pH 9 için ise % 20’den % 62’ye çıkardığı gözlenmiştir.



(a)

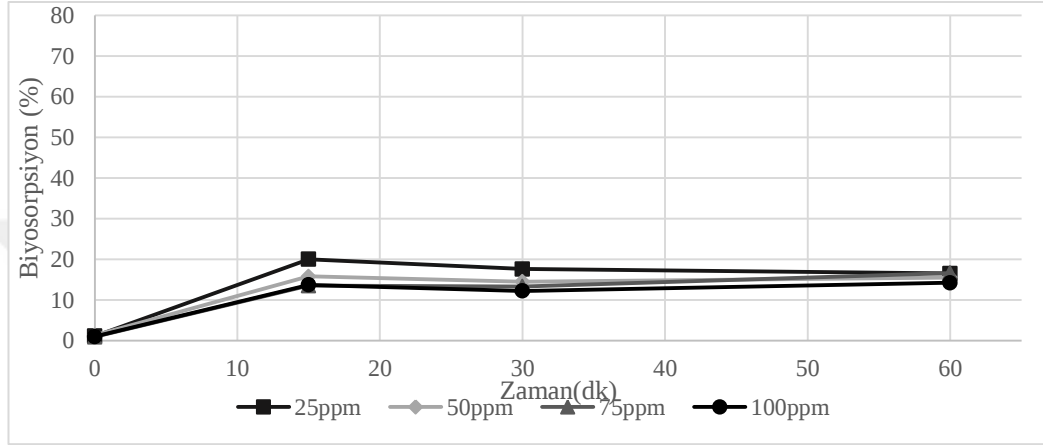


(b)

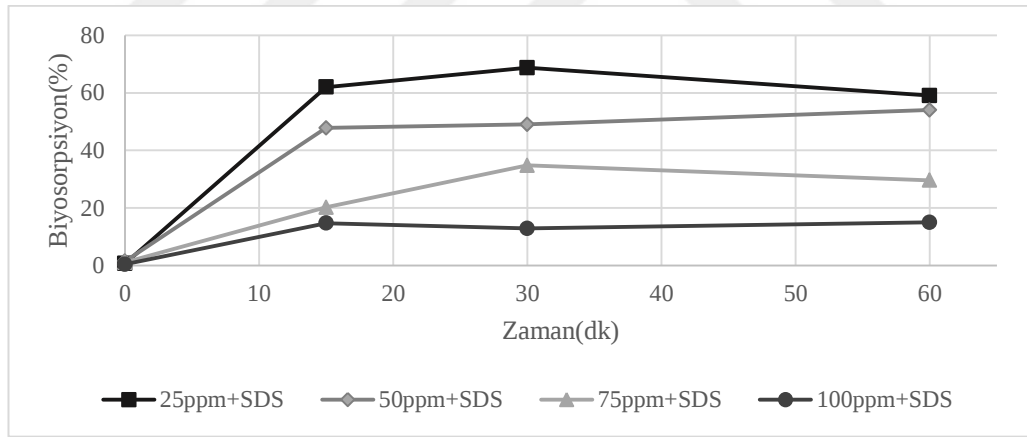
Şekil 4.8.a. *K. marxianus*'un pH 3,6 ve 9'da yaklaşık 25 mg/L Cu (II) varlığında zamana bağlı biyosorpsiyon kapasitesi (%), b. *K. marxianus*'un pH3, 6 ve 9'da yaklaşık 25, 50, 75, 100 mg/L Cu (II) ve 0.1mM varlığında zamana bağlı biyosorpsiyon kapasitesi (%)

Başlangıç Cu (II) konsantrasyonunun biyosorpsiyona etkisinin belirlendiği çalışmalarda tüm deneyler pH 9'da yapılmıştır. Şekil 4.9.a,b sırasıyla 0.1 mM SDS içermeyen ve içeren ortamlarda yaklaşık 25, 50, 75 ve 100 mg/L Cu (II) varlığında 1 g/L kuru hücreye tekabül eden yaş *K. marxianus* biyokütlesi tarafından 60 dakika boyunca yapılan biyosorpsiyon değerlerini göstermektedir. Denenen tüm konsantrasyonlarda ortamda SDS yokken en yüksek biyosorpsiyon değerleri 120. dakikada 25, 50, 75 ve 100 mg/L Cu (II) için sırasıyla % 20, % 15.8, % 13.7 ve % 13.5 olarak bulunmuştur.

Ortama 0.1 mM SDS ilave edilmesiyle birlikte 25 ve 50 mg/L Cu (II) içeren ortamlarda en yüksek biyosorpsiyon 120 dakikada sırasıyla % 70.7, % 54.0, olarak bulunmuştur. 75 mg/L Cu (II) içeren besiyerinde en yüksek giderim 30 dakikada % 34.8 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca 100 mg/L Cu (II) varlığında en yüksek biyosorpsiyon verimi 120. dakikada % 19.9 olarak elde edilmiştir.



(a)



(b)

Şekil 4.9.a. *K. marxianus*'un pH 9'da yaklaşık 25, 50, 75, 100 mg/L Cu (II) ve zamana bağlı biyosorpsiyon kapasitesi (%), b. *K. marxianus*'un pH 9'da yaklaşık 25 mg/L Cu (II) ve 0.1mM SDS varlığında zamana bağlı biyosorpsiyon kapasitesi(%)

Artan Cu (II) konsantrasyonlarında biyosorpsiyon veriminin düştüğü, 0.1 mM SDS ilavesinin 100 mg/L'de çok belirgin olamamakla birlikte denenen tüm konsantrasyonlar için verimi arttırdığı görülmüştür.

4.2.2 K. marxianus'un biyoakümülyasyon ve biyosorpsiyon kapasitelerinin karşılaştırılması

K. marxianus'un biyoakümülyasyon ve biyosorpsiyon kapasitelerini karşılaştırmak adına, iki giderim mekanizmasının en yüksek olduğu süreler seçilmiştir. Bu bağlamda 3. gündeki biyoakümülyasyon değerleri ile 120. dakikadaki biyosorpsiyon değerleri karşılaştırılmıştır. Biyoakümülyasyonda 25 mg/L Cu (II) varlığında % 82.7 olan giderim 0.1 mM SDS eklendiğinde % 97.6 değerlerine ulaşmıştır. Biyosorpsiyonda ise SDS ilavesi yapılmadığında 25 mg/L Cu (II) varlığında % 28.3 olan giderim, ortama 0.1 mM SDS ilave edildiğinde % 70.7 değerine çıkmıştır. Bu durum biyoakümülyasyonun, biyosorpsiyona nazaran daha yüksek miktarda Cu (II) giderdiğini, buna karşın giderim süresinin arttığını ortaya koymaktadır (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7 *K. marxianus* mayasının biyoakümülyasyon ve biyosorpsiyon kapasitelerinin karşılaştırılması (%)

	Biyoakümülyasyon (%)		Biyosorpsiyon (%)	
	25 mg/L Cu (II)	100 mg/L Cu (II)	25 mg/L Cu (II)	100 mg/L Cu (II)
Sadece <i>K.marxianus</i>	% 82.7±2.4	% 22.7±0.0	% 28.3±1.4	% 15.6±0.5
kullanılan biyokütle, g/L	0.7±0.1	0.6±0.0	1	1
<i>K.marxianus</i> +0.1 mM SDS	% 97.6±1.5	% 26.6±1.1	% 70.7±1.9	% 19.9±1.5
kullanılan biyokütle, g/L	0.6±0.0	0.5±0.0	1	1

*(T:30 °C, çalkalama hızı: 100 devir/dakika, pH: 5, biyoakümülyasyon: 3. gün, biyosorpsiyon: 120. dakika)

Çizelge 4.8 *K. marxianus* mayasının 1 g/L biyokütlesi ile gerçekleştirilen biyoakümülyasyon ve biyosorpsiyon süreçlerinde gram hücre başına biriktirilen Cu (II) miktarlarının karşılaştırılması

	qm (mg/g)			
	Biyoakümülyasyon		Biyosorpsiyon	
	25 mg/L Cu (II)	100 mg/L Cu (II)	25 mg/L Cu (II)	100 mg/L Cu (II)
Sadece <i>K.marxianus</i>	24.1	38.6	08.1	15.8
<i>K.marxianus</i> +0.1 mM SDS	50.0	52.0	18.9	20.0

*(T:30 °C, çalkalama hızı: 100 devir/dakika, pH: 5, biyoakümülyasyon: 3. gün, biyosorpsiyon: 120. dakika)

Biyoakümülyasyonda 3. günde ve biyosorpsiyonda 120. dakikadaki giderimler dikkate alınarak yapılan karşılaştırmada 25 mg/L Cu (II) varlığında hem biyoakümülyasyon hem de biyosorpsiyon deneylerinde SDS ilavesinin qm değerlerini nerdeyse iki kattan fazla artırdığı ortaya konulmuştur. Biyoakümülyasyon Sadece *K. marxianus*'un 25 mg/L başlangıç Cu (II) varlığında qm değeri 24.1 iken 0.1 mM SDS ilavesi ile bu değerin 50.0 olduğu saptanmıştır. 100 mg/L Cu (II) varlığında ise biyoakümülyasyon için 38.6 olan qm değeri 52.0 yükselmiştir. Biyosorpsiyon deneylerinde 25 mg/L Cu (II) varlığında *K. marxianus*'un tek başına 8.1 olan qm değeri 0.1 mM SDS ilavesi ile 18.9 olarak bulunmuştur. Ortamda 100 mg/L Cu (II) bulunurken qm değeri sadece *K. marxianus* için 15.8 olarak hesaplanırken, 0.1 mM SDS ilavesi ile qm değeri 4.2 mg/g artarak 20.0'a ulaşmıştır (Çizelge 4.8).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Ağır metal kirliliğinin artışı ucuz, hızlı ve çevre dostu giderim metotlarına duyulan ihtiyacı artırmıştır. Bu ihtiyacı en iyi karşılayan metotlardan biri olan biyogiderim alanı son yıllarda oldukça dikkat çekici çalışmalara konu olmuştur. Bu konuda yapılan araştırmalar özellikle canlı ve ölü biyokütle ile yapılmıştır. Her iki yöntem de biyogiderimin potansiyeli hakkında umut vaat eden sonuçlar ortaya koymuştur. (Dönmez ve Aksu 2002). Biyogiderimin potansiyelinin artırılması için çeşitli metotlar uygulanmıştır. (Yang vd. 2003, Baker vd. 2008, Schoborg vd 2014). Az sayıda çalışmada bu metotlara ek olarak surfaktan kullanılmış, doğru doz ve içerikteki surfaktanlarla biyogiderim kapasitesinin dikkate değer miktarda arttığı gözlenmiştir (Mina vd. 2004, Bila vd. 2005).

Biyobirikim canlı biyokütle ile yapıldığı için canlılığı etkileyen her türlü faktörün giderim üzerinde etkisi olmaktadır. Bu faktörleri saymak gerekirse: Besiyeri içeriği, pH, sıcaklık ve çalkalama hızı gibi faktörlerden bahsedilebilir. Bu çalışmada kullanılan besiyeri şeker fabrikası atığı olan melastan elde edilmiştir ve melas mikroorganizmaların gelişimi için karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. Literatürdeki çalışmalarda melaslı besiyerinin mayaların gelişimi için uygun ve destekleyici bir ortam olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca bu besiyerinin en büyük avantajlarından biri de ekonomik değeri düşük, depolaması ve saklanması kolay bir ham maddeden elde edilmesidir. Yüksek sükroz oranı ve karbon kaynağı olarak kullanılabilmesi açısından da bu besiyeri ideal bir besiyeridir (Karatay ve Dönmez 2010).

Mayalar her ne kadar endüstriyel alanda bolca kullanılsa da ağır metal biyogiderimi için sıkça başvuru alan mikroorganizmalardan değildir. Literatürde mayalarla beraber kimyasal ajan kullanımı yolu ile yapılmış giderim çalışması yok denecek kadar azdır. Buna karşın sadece mayalar ile yapılan ağır metal biyogideriminde hızlı bir şekilde biyokütle oluşturan ve düşük maliyetli maya türlerinin kullanıldığı bilinmektedir (Lu ve Wilkins 1996, Stoll ve Duncan 1996). Bu yüzden bu tez çalışmasında hızlı üreyebilen ve ortam koşullarından nispeten az etkilenen *K. marxianus* türü maya kullanılmıştır.

Yapılan biyobirikim çalışmalarında *K. marxianus* mayasının en yüksek miktarda Cu (II) tuttuğu inkübasyon süresi araştırılmıştır. Bu mayanın en yüksek giderimi 4. günde yaptığı gözlenmiştir. Bunun yanı sıra ortama 0.1 mM SDS ilavesi halinde giderimin SDS içermeyen ortamda bulunan en yüksek değere çıkması bir gün sürmüştür. Ayrıca SDS ilavesi Cu (II) giderimini aktif alımda % 13.9, pasif alımda ise % 42.4 iyileştirmiştir (Çizelge 4.5). Yapılan deneyler SDS'nin biyogiderim süresini kısalttığı gözlenmiştir.

Biyobirikim üstünde surfaktan etkisi hakkında yapılan çalışmalarda anyonik surfaktanların biyobirikimi arttırdığı görülmüştür (Ahn vd. 2009). Söz konusu çalışmada katyonik surfaktanların ise biyogiderim üstünde negatif etkisine rastlanmıştır. Bu durum, Cu (II), ortam ve surfaktanın iyonik yüklerine bağlanmıştır (Çizelge 4.4).

Başlangıç Cu (II) konsantrasyonunun üremekte olan maya hücreleri ile giderimindeki değişim araştırıldığında ise, Cu (II) konsantrasyonu arttıkça giderimin azaldığı gözlenmiştir. Bunun mayaların Cu (II) tutma kapasitelerinin sınırından kaynakladığı düşünülmektedir. Bu sınırın mayaların canlılıklarını devam ettirmek için kullandıkları metabolik yolların Cu (II) tarafından baskılanması sonucu, aktif Cu (II) alımının sonlanması sebep gösterilebilir. Ayrıca maya hücresinin yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, eksopolisakkaritler gibi metal tutma kapasitesine sahip mekanizmaların Cu (II) taşıma kapasitesinin sınırlı olduğu bilinmektedir (Chan vd. 1991).

Başlangıç SDS konsantrasyonunun biyobirikime etkisinin araştırılması için 0.1 ve 0.5 mM olmak üzere iki farklı konsantrasyonda deneyler yapılmıştır. En yüksek giderimin %86.2 ile 0.1mM SDS'li besiyerinde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.6-4.9). Surfaktanların özellikle yüksek konsantrasyonlarda canlı hücreler üzerindeki letal etkisi olduğu bilinmektedir. Bu nedenle yüksek surfaktan konsantrasyonlarında aktif Cu (II) alımı durmaktadır.

Biyosorpsiyona pH'ın etkisinin belirlenmesi için 3 farklı pH değeri (3,6 ve 9) denenmiştir. En iyi giderim (% 28.3) surfaktansız ortamda pH 6'da, surfaktanlı ortamda ise pH 9'da gözlenmiştir. Bunun sebebinin ortamdaki H⁺ iyonları ile rekabete giren

surfaktanın giderim potansiyelindeki pozitif yönde etkisinin gösterememesi olduğu düşünülmüştür.

Biyosorpsiyon çalışmalarında aynı zamanda Cu (II) konsantrasyonunun etkisi de araştırılmıştır. Cu (II) konsantrasyonu yükseldikçe giderimim düştüğü gözlenmiştir (Şekil 4.9.a-4.12.c). Bunu sebebinin ise ölü biyokütlede fonksiyonel grupların Cu (II) tutma kapasitelerinin sınırlı olmasından ileri geldiği düşünülmektedir. Biyosorpsiyon çalışmalarında zamanın Cu (II) giderimine etkisi gözlenmiştir. Cu (II) tutumu süresinin genelde 30.dk'da maksimum olduğu (%B 70.7) ardında geri salınımına uğradığı görülmüştür. SDS'in biyogiderim hızı üzerinde pozitif etkisi görünmese de SDS'li ortamda çok daha yüksek giderim kapasiteleri görülmüştür. Bunun nedeni olarak SDS'in hidrofobik kuyruk kısımları ile Cu^{+2} iyonlarına tutunup, hidrofilik kısımları ile ise hücre yüzeylerine tutunması olduğu düşünülmektedir. Hücre yüzeylerinin ortamda SDS'in çıpalanabileceği yüzeyler olarak iş gördüğü söylenebilir. Ayrıca SDS çeşitli atom altı bağlar ile ortamın elektronegatifliğini değiştirerek fonksiyonel grupların daha efektif çalışmasına yol açmaktadır (Kratochvil ve Volesky 1998).

Tüm bu bulgu ve bilgiler ışığında ağır metal biyogiderimin mikroorganizmalarla oldukça verimli bir şekilde gerçekleştirebileceği ortaya konulmuştur. Mayaların ökaryotik hücre yapısına sahip olmaları, toksisiteye dirençleri, düşük maliyetli besiyerlerinde üreyebilmeleri ve hızlı çoğalmaları bakımından ağır metal biyogiderimi için uygun model organizmalar olduğu söylenebilir. *K. marxianus* mayasının mayalar içerisinde hızlı bölünen mayalardan biri olması yüksek sıcaklıklara dirençli olması ve düşük karbon kaynağı bulunması durumunda bile üreyebilmesi; biyogiderimde hızlı ve etkili bir çözümdür. Giderim için sıkça kullanılan anyonik surfaktanlardan biri olan SDS'in giderimi gerçekleştirebilmesi için ağır metalleri bağlayabilecekleri bir matriks olması gerekmektedir (Ahn vd. 2009). Bu matriks için maya hücreleri en uygun adaylardan biri olarak görülmektedir.

Yapılan çalışmalar sonucu *K. marxianus*'un Cu (II) gideriminde umut vaat eden bir mikroorganizma olduğu ortaya konmuştur. Metabolizma mühendisliği, besiyeri modifikasyonları ve yeni kimyasal ajanların araştırılması gibi farklı çalışmalarla

mayaların giderim kapasiteleri artırılabilir ve giderimin toplam maliyeti düşürülebilir. Maya hücrelerindeki fonksiyonel gruplarının belirlenmesi ve çalışma mekanizmalarının anlaşılması için ileri deneyler yapılabilir.



KAYNAKLAR

- Abbanat, D.R., Godchaux, W. and Leadbetter, E.R. 1988. Surface-induced synthesis of new sulfonolipids in the gliding bacterium *Cytophaga johnsonae*. *Archives of Microbiology*, 149(4); 358-364.
- Ahn, C.K., Park, D., Woo, S.H. and Park, J.M. 2009. Removal of cationic heavy metal from aqueous solution by activated carbon impregnated with anionic surfactants. *Journal of Hazardous Materials*, 164(2-3); 1130-1136.
- Ahuja, P., Gupta, R. and Saxena, R.K. 1999. News & Notes: sorption and desorption of cobalt by *Oscillatoria angustissima*. *Current Microbiology*, 39(1); 49-52.
- Aksu, Z. and Donmez, G. 2000. The use of molasses in copper (II) containing wastewaters: effects on growth and copper (II) bioaccumulation properties of *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochemistry*, 36(5); 451-458.
- Allison, D.G., Evans, D.J., Brown, M.R. and Gilbert, P. 1990a. Possible involvement of the division cycle in dispersal of *Escherichia coli* from biofilms. *Journal of Bacteriology*, 172(3); 1667-1669.
- Allison, D.G., Brown, M.R.W., Evans, D.E. and Gilbert, P. 1990. Surface hydrophobicity and dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, 71(1-2); 101-104.
- Anonim 1896. Türkiye çevre sorunları vakfı, Türkiye çevre sorunları vakfı yayınlar S.75.
- Barceloux, D.G. and Barceloux, D. 1999. Copper. *Journal of toxicology: clinical Toxicology*, 37(2); 217-230.
- Bar-Ness, R., Avrahamy, N., Matsuyama T. and Rosenberg, M. 1988. Increased cell surface hydrophobicity of a *Serratia marcescens* NS 38 mutant lacking wetting activity. *J. Bacteriol.* 170:4361–4364.
- Barnett, J.A. and Entian, K.D. 2005. A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism. *Yeast* 22: 835–894.
- Basnakova, G. and Macaskie, L.E. 1997. Microbially enhanced chemisorption of nickel into biologically synthesized hydrogen uranyl phosphate: A novel system for the removal and recovery of metals from aqueous solutions. *Biotechnology and Bioengineering*, 54(4); 319-328.
- Baudet, C., Sprott, G.D. and Patel, G.B. 1988. Adsorption and uptake of nickel in *Methanothrix concilii*. *Archives of microbiology*, 150(4); 338-342.
- Beebe, J.L. and Umbreit, W.W. 1971. Extracellular lipid of *Thiobacillus*
- Bendinger, B., Rijnaarts, H.H.M., Altendorf, K. and Zehnder, A.J.B. 1993. Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3973–3977
- Bentley, P.K., Gates, R.M.C., Lowe, K.C., de Pomerai, D.I. and Walker, J.A.L. 1989. *Biotechnol. Lett.*, 11: 111-114

- Blank, L.M., Lehmbeck, F. and Sauer, U. 2005. Metabolic-flux and network analysis in fourteen hemiascomycetous yeasts. *FEMS Yeast Res.* 5, 545–558.
- Boopathy, R. 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource technology*, 74(1); 63-67.
- Brady, D. and Duncan, J.R. 1994. Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41(1); 149-154.
- Brierley, C.L. 1990. Bioremediation of metal-contaminated surface and groundwaters. *Geomicrobiology Journal*, 8(3-4); 201-223.
- Bryant, R.D., Costerton, J.W. and Laishley, E.J. 1984. The role of *Thiobacillus albertis* glycocalyx in the adhesion of cells to elemental sulfur. *Can. J. Microbiol.* 30:81–90
- Bugg, T.D.H. and Brandish, P.E. 1994. From peptidoglycan to glycoproteins: common features of lipid-linked oligosaccharide biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 119:255–262.
- Busscher, H.J., Bellon-Fontaine, M.N., Mozes N., van der Mei, H.C.J. 162 *neu microbiol. rev.* Sjollem, O. Cerf, and P.G. Rouxhet. 1990. Deposition of *Leuconostoc mesenteroides* and *Streptococcus thermophilus* to solid substrata in a parallelplate flow cell. *Biofouling* 2(1);55–63.
- Busscher, H.J., Neu, T.R. ve van der Mei, H.C. 1994. Biosurfactant production by thermophilic dairy streptococci. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41:4–7.
- Chan, S. S., Chow, H. and Wong, M.H. 1991. Microalgae as bioabsorbents for treating mixture of electroplating and sewage effluent. *Biomedical and Environmental Sciences: BES*, 4(3); 250-261.
- Chen, J.S., Li, L., Wang, J. Y., Barry, D.A., Sheng, X.F., Zu Gu, W. and Chen, L. 2004. Water resources: groundwater maintains dune landscape. *Nature*, 432(7016); 459.
- Chen, M., Xu, P., Zeng, G., Yang, C., Huang, D. and Zhang, J. 2015. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: applications, microbes and future research needs. *Biotechnology Advances*, 33(6); 745-755.
- Cicek, N. 2003. A review of membrane bioreactors and their potential application in the treatment of agricultural wastewater. *Canadian Biosystems Engineering*, 45, 6-37.
- Conant, G.C. and Wolfe, K.H. 2007. Increased glycolytic flux as an outcome of whole-genome duplication in yeast. *Mol. Syst. Biol.* 3: 129.
- Cooper, S.T.E.P.H.E.N. 1991. Synthesis of the cell surface during the division cycle of rod-shaped, gram-negative bacteria. *Microbiological reviews*, 55(4); 649-674.
- Cordano, A., Baertl, J.M. and Graham, G.G. 1964. Copper deficiency in infancy. *Pediatrics*, 34(3); 324-336.
- Corder, S.L. and Reeves, M. 1994. Biosorption of nickel in complex aqueous waste streams by cyanobacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 45(1); 847-859

- Cowan, M. and Busscher, H. J. 1993. Flow chamber study of the adhesion of *Prevotella intermedia* to glass after preconditioning with mutans streptococcal species: kinetics and spatial arrangement. *Microbios*, 73(295), 135-144.
- D. Luo C.L. and Li, X.D. 2008 The use of chelating agents in the remediation of metal-contaminated soils: a review, *Environ. Pollut.* 153(1); 3–13.
- Das, D., Basak, G., Lakshmi, V. and Das, N. 2012. Kinetics and equilibrium studies on removal of zinc (II) by untreated and anionic surfactant treated dead biomass of yeast: Batch and column mode. *Biochemical Engineering Journal*, 64: 30-47.
- Dean, D. A. and Sell, K.W. 1972. Surface antigens on *Schistosoma mansoni*. II. Adsorption of a Forssman-like host antigen by schistosomula. *Clinical and Experimental Immunology*, 12(4); 525.
- Deborde, M. and Von Gunten, U. R. S. 2008. Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment—kinetics and mechanisms: a critical review. *Water Research*, 42(1-2); 13-51.
- Doyle, R.J. Chaloupka, J. and Vinter, V. 1988. Turnover of cell walls in microorganisms. *Microbiological Reviews*, 52(4); 554.
- Dönmez, G. and Aksu, Z. 1999. The effect of copper (II) ions on the growth and bioaccumulation properties of some yeasts. *Process Biochemistry*, 35(1-2); 135-142.
- Dyar, M. T. 1948. Electrokinetical Studies on Bacterial Surfaces: II. Studies on Surface Lipids, Amphoteric Material, and Some Other Surface Properties. *Journal of Bacteriology*, 56(6); 821.
- Fakoussa, R.M. 1988. Production of water-soluble coal-substances by partial microbial liquefaction of untreated hard coal. *Resources, Conservation and Recycling*, 1(3-4), 251-260.
- Fakoussa, R.M. 1989. Comparison of the mechanics of lignite- and hard coal-degradation by microorganisms, p. 330–347. In P. E. Bayer (ed.), *Proceedings of bioprocessing of fossil fuels*. Publication 8-10.8. US Department of Energy, Washington, D.C.
- Fitzgerald, D.J. 1998. Safety guidelines for copper in water. *The American journal of Clinical Nutrition*, 67(5); 1098S-1102S.
- Flores, C.L., Rodríguez, C., Petit, T. and Gancedo, C. 2000. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), 507-529.
- Fu, F. and Wang, Q. 2011. Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review. *Journal of Environmental Management*, 92(3); 407-418.
- Fukuhara, H. 2006. *Kluyveromyces lactis*—a retrospective. *FEMS Yeast Research*, 6(3), 323-324.
- Gadd, G.M. 1988. Accumulation of metals by microorganisms and algae. *Biotechnology*. Vol. 6b, *Special Microbial Processes*, 401-433.

- Garnham, G.W., Codd, G.A. and Gadd, G.M. 1992. Kinetics of uptake and intracellular location of cobalt, manganese and zinc in the estuarine green alga *Chlorella salina*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37(2); 270-276.
- Gerson, D.F. 1993. The biophysics of microbial surfactants: growth on insoluble substrates. *Biosurfactants: production properties applications*, 269-286.
- Godchaux, W. and Leadbetter, E.R. 1988. Sulfonolipids are localized in the outer membrane of the gliding bacterium *Cytophaga johnsonae*. *Archives of Microbiology*, 150(1); 42-47.
- Groeneveld, P., Stouthamer, A. H. and Westerhoff, H.V. 2009. Super life—how and why ‘cell selection’ leads to the fastest-growing eukaryote. *The FEBS Journal*, 276(1); 254-270.
- Harris, G.B. and Krause, E. 1993. The disposal of arsenic from metallurgical processes: its status regarding ferric arsenate. *Extractive Metallurgy of Copper, Nickel and Cobalt.*, 1, 1221-1237.
- Hazra, C., Kundu, D. and Chaudhari, A. 2012. Biosurfactant-assisted bioaugmentation in bioremediation. In: Satyanarayana T, Johri BN, Prakash A, editors. *Microorganisms in environmental management: microbes and environment*. New York: Springer;. p. 631–664.
- Herrero, M. and Stuckey, D.C. 2015. Bioaugmentation and its application in wastewater treatment: a review. *Chemosphere*, 140, 119-128.
- Hildebrand, P.D. 1989. Surfactant-like characteristics and identity of bacteria associated with broccoli head rot in Atlantic Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 11(3); 205-214.
- Holmberg, K., Jönsson, B., Kronberg, B. and Lindman, B. 2003. *Surfactants and polymers in aqueous solution (Vol. 2)*. Chichester: Wiley.
- Hong, J., Wang, Y., Kumagai, H. and Tamaki, H. 2007. Construction of thermotolerant yeast expressing thermostable cellulase genes. *Journal of Biotechnology*, 130(2); 114-123.
- Imura, Y., Hara, S. and Otsuka, K.I. 1980. Fatty acids as hydrophobic substance on cell surface of film strain of *Saccharomyces*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44(6); 1223-1229.
- Imura, Y., Hara, S. and Otsuka, K.I. 1981. Fatty acids associated with the cell wall in film strains of *Saccharomyces*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(5); 1113-1119.
- Fountain, J.C., Starr, R.C., Middleton, T., Beikirch, M., Taylor, C., Hodge, D., Jacob, A., Skala, R.A., Omaye, J.H. and Turnlund, J.R. 1987. Effect of varying ascorbic acid intakes on copper absorption ve ceruloplasmin levels of young men. *The Journal of nutrition*, 117(12); 2109-2115.
- Jenkinson, H.F. 1992. Adherence, coaggregation, and hydrophobicity of *Streptococcus gordonii* associated with expression of cell surface lipoproteins. *Infection and Immunity*, 60(3); 1225-1228.

- Johannsen, E. 1980. Hybridization studies within the genus *Kluyveromyces* van der Walt emend. van der Walt. *Antonie van Leeuwenhoek*, 46(2); 177-189.
- Jones, G.E. and Starkey, R.L. 1961. Surface-active substances produced by *Thiobacillus thiooxidans*. *Journal of Bacteriology*, 82(5); 788.
- Karlsson, K., Viklander, M., Scholes, L. and Revitt, M. 2010. Heavy metal concentrations and toxicity in water and sediment from stormwater ponds and sedimentation tanks. *Journal of Hazardous Materials*, 178(1-3); 612-618.
- Kelner, G.S., Lee, M., Clark, M.E., Maciejewski, D., McGrath, D., Rabizadeh, S. and Maki, R.A. 2000. The copper transport protein Atox1 promotes neuronal survival. *Journal of Biological Chemistry*, 275(1); 580-584.
- King, A.T., Mulligan, B.J. and Lowe, K.C. 1989. Perfluorochemicals and cell culture. *Nature Biotechnology*, 7(10); 1037.
- Kratochvil, D. and Volesky, B. 1998. Advances in the biosorption of heavy metals. *Trends in Biotechnology*, 16(7); 291-300.
- Kocaer, F.O. and Alkan, U. 2002. Boyarmadde İçeren Tekstil Atıksularının Aritim Alternatifleri. *Uludağ Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 7, 47-55.
- Koch, A.L. 1988. Biophysics of bacterial walls viewed as stress-bearing fabric. *Microbiological reviews*, 52(3); 337.
- Kumar, A., Bisht, B.S., Joshi, V.D. and Dhewa, T. 2011. Review on bioremediation of polluted environment:: A management tool. *International Journal of Environmental Sciences*, 1(6); 1079.
- Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. (eds) 1998. *The yeasts: a taxonomic study*, 4th edn. Elsevier, Amsterdam
- Kurtzman, C.P. and Robnett, C.J. 2003. Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Research*, 3(4); 417-432.
- Lachance, M.A. 2007. Current status of *Kluyveromyces* systematics. *FEMS yeast research*, 7(5); 642-645.
- Lachance, M.A. 1998. *Kluyveromyces* van der Walt emend. van der Walt. In *The Yeasts* (Fourth Edition) (pp. 227-247).
- Linder, M.C. and Hazegh-Azam, M. 1996. Copper biochemistry ve molecular biology. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 63(5); 797S-811S.
- Linder, M.C., Wooten, L., Cerveza, P., Cotton, S., Shulze, R. and Lomeli, N. 1998. Copper transport. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 67(5); 965S-971S.
- Litchfield, C. 2005. Thirty years and counting: bioremediation in its prime. *AIBS Bulletin*, 55(3); 273-279.
- Llorente, B., Malpertuy, A., Blandin, G., Artiguenave, F., Wincker, P. and Dujon, B. 2000. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 12. *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*. *FEBS Letters*, 487(1), 71-75.

- Lodder J. and Kreger-van Rij, N.J.W. 1952 The yeasts: a taxonomic study. NHPC, Amsterdam
- Lowe, N.M., Woodhouse, L.R., Randolph, J.M., Sutherland, B., Trunlund, J.R., King, J.C. and Jackson, M.J. 1998. Effect of a zinc-deficient diet on the exchangeable zinc pool in human subjects. In Proceedings-Nutrition Society of London (Vol. 57, No. 1, pp. 69A-69A).
- Lüderitz, O.T.T.O., Westphal, O.T.T.O., Staub, A M. and Nikaido, H.I.R.O.S.H.I. 1971. Isolation and chemical and immunological characterization of bacterial lipopolysaccharides. Microbial toxins, 4, 145-233.
- Luza, S.C. and Speisky, H.C. 1996. Liver copper storage and transport during development: implications for cytotoxicity. The American Journal of Clinical Nutrition, 63(5); 812S-820S.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. 1997. Brock Biology and Microbiology, 8th ed. Prentice Hall, New Jersey, USA.
- Matsunaga, T., Takeyama, H., Nakao, T. and Yamazawa, A. 1999. Screening of marine microalgae for bioremediation of cadmium-polluted seawater. Journal of Biotechnology, 70(1-3); 33-38.
- Matsuyama, T.O.H.E.Y., Kaneda, K., Nakagawa, Y., Isa, K., Hara-Hotta, H. and Yano, I. 1992. A novel extracellular cyclic lipopeptide which promotes flagellum-dependent and-independent spreading growth of *Serratia marcescens*. Journal of Bacteriology, 174(6); 1769-1776.
- Matsuyama, T., Sogawa, M. and Nakagawa, Y. 1989. Fractal spreading growth of *Serratia marcescens* which produces surface active exolipids. FEMS microbiology letters, 61(3); 243-246.
- Mehta, S.K. and Gaur, J.P. 2001. Characterization and optimization of Ni and Cu sorption from aqueous solution by *Chlorella vulgaris*. Ecological Engineering, 18(1); 1-13.
- Mizrahi, A. 1975. Pluronic polyols in human lymphocyte cell line cultures. Journal of Clinical Microbiology, 2(1); 11-13.
- Mortimer, R.K. 2000. Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome. Genome research, 10(4); 403-409.
- Mulligan, C.N., Yong, R.N. and Gibbs, B.F. 2001. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. Engineering Geology, 60(1-4); 371-380.
- Neu, T.R. 1987. Hydrophobe polysaccharide und Tenside von Bakterien Isolierung, Charakterisierung, Struktur und mögliche Funktionen bei der Adhäsion an hydrophobe Grenzflächen. Ph.D. thesis no. 744. University of Tübingen, Tübingen, Germany.
- Neu, T.R. 1992. Microbial "footprints" and the general ability of microorganisms to label interfaces. Can. J. Microbiol. 38(10)1005–1008.
- Neu, T.R. and Marshall, K.C. 1991. Microbial "footprints" a new approach to adhesive polymers. Biofouling 3(2)101–112.

- Neu, T.R. and Poralla, K. 1987. Screening for bacteria with hydrophobic cell surfaces—a strategy for isolating surface-active molecules, p. 397–399. In O. M. Neijssel, R. R. van der Meer, ve K. C. A. M. Luyben (ed.), *Proceedings of the Fourth European Congress on Biotechnology*, vol. 3. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Neu, T.R. and Poralla, K. 1990. Emulsifying agents from bacteria isolated during screening for cells with hydrophobic properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32.(5);521–525.
- Neu, T.R., Hartner, T. and Poralla, K. 1990. Surface active properties of viscosin: a peptidolipid antibiotic. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32.(5);518–520.
- Nguyen, C.M., Rathman, J.F. and Scamehorn, J.F. 1986. Thermodynamics of mixed micelle formation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 112(2); 438-446.
- Nguyen, H.V. and Gaillardin, C. 2005. Evolutionary relationships between the former species *Saccharomyces uvarum* and the hybrids *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus*; reinstatement of *Saccharomyces uvarum* (Beijerinck) as a distinct species. *FEMS Yeast Res.* 5,(4-5); 471–483.
- Nies, D.H. 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(6); 730-750.
- Nieuwenhuijsen, M.J., Toledano, M.B., Eaton, N.E., Fawell, J. and Elliott, P. 2000. Chlorination disinfection byproducts in water and their association with adverse reproductive outcomes: a review. *Occupational and Environmental Medicine*, 57(2); 73-85.
- Nonklang, S., Ano, A., Abdel-Banat, B.M., Saito, Y., Hoshida, H. and Akada, R. 2009. Construction of flocculent *Kluyveromyces marxianus* strains suitable for high-temperature ethanol fermentation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73(5); 1090–1095.
- Pecota, D.C., Rajgarhia, V. and Da Silva, N.A. 2007. Sequential gene integration for the engineering of *Kluyveromyces marxianus*. *J. Biotechnol.* 127(3); 408–416.
- Pérez-Rama, M., Alonso, J.A., López, C.H. and Vaamonde, E.T. 2002. Cadmium removal by living cells of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Bioresource Technology*, 84(3); 265-270.
- Mayans, M.O., Coadwell, W.J., Beale, D., Symons, D.B.A. and Perkins, S.J. 1995. Demonstration by pulsed neutron scattering that the arrangement of the Fab and Fc fragments in the overall structures of bovine IgG1 and IgG2 in solution is similar. *Biochemical Journal*, 311(1); 283-291.
- Pitta, T.P., Leadbetter, E.R. and Godchaux, W. 1989. Increase of ornithine amino lipid content in a sulfonolipid-deficient mutant of *Cytophaga johnsonae*. *J. Bacteriol.* 171(2);952–957.
- Pugsley, A.P. 1993. The complete general secretory pathway in gramnegative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57(1);50–108
- Raymond, R.L., Jamison, V.W. and Hudson, J.O. 1975. Final Report on Beneficial Stimulation of Bacterial Activity in Ground Waters Containing Petroleum Products. Sun Ventures, Incorporated.

- Rebello, S., Asok, A.K., Mundayoor, S. and Jisha, M.S. 2014. Surfactants: toxicity, remediation and green surfactants. *Environmental chemistry letters*, 12(2); 275-287.
- Ribeiro, O., Gombert, A.K., Teixeira, J.A. and Domingues, L. 2007. Application of the Cre-loxP system for multiple gene disruption in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *J. Biotechnol.* 131(1); 20–26.
- Rietschel, E.. (ed.). 1984. Handbook of endotoxins, vol. 1. Chemistry of endotoxins. Elsevier Science Publishers, Amsterdam
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. and Nigam, P. 2001. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource technology*, 77(3); 247-255.
- Rosenberg, E., Gottlieb A. and Rosenberg, M. 1983. Inhibition of bacterial adherence to hydrocarbons and epithelial cells by emulsan. *Infect. Immun.* 39(3);1024–1028.
- Rubio-Teixeira, M. 2006. Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces* LAC genes. *Biotechnol. Adv.* 24(2); 212–225.
- Sag, Y. and Kutsal, T. 1995. Biosorption of heavy metals by *Zoogloea ramigera*: use of adsorption isotherms and a comparison of biosorption characteristics. *The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal*, 60(1-3); 181-188.
- Sandstead, H.H. 1995. Requirements and toxicity of essential trace elements, illustrated by zinc and copper. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 61(3); 621S-624S.
- Santona, L., Castaldi, P. and Melis, P. 2006. Evaluation of the interaction mechanisms between red muds and heavy metals. *Journal of Hazardous Materials*, 136(2); 324-329.
- Savvaiddis, I., Hughes, M.N. and Poole, R.K. 1992. Differential pulse polarography: a method of directly measuring uptake of metal ions by live bacteria without separation of biomass and medium. *FEMS Microbiology Letters*, 92(2); 181-186.
- Scannell, D.R., Butler, G. and Wolfe, K.H., 2007. Yeast genome evolution – the origin of the species. *Yeast* 24(11);929–942.
- Schaffrath, R. and Breunig, K.D., 2000. Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genet. Biol.* 30(3); 173–190.
- Schmolka, I.R.J. *Am. Oil. Chem. Soc.* 1977. 54(3); 110-116
- Scott, J.A., Karanjkar, A.M. and Rowe, D.L. 1995. Biofilm covered granular activated carbon for decontamination of streams containing heavy metals and organic chemicals. *Minerals Engineering*, 8(1-2); 221-230.
- Snell, F.D. and Snell, C.T. 1959. Colorimetric methods of analysis: including photometric methods. Vol. 2A. Van Nostrand.
- Stephens, G. M. and Dalton, H. 1987. Is toxin production by coryneform bacteria linked to their ability to utilize hydrocarbons. *Trends Biotechnol.* 5(1);5–7.

- Tabak, H.H., Lens, P., van Hullebusch, E.D. and Dejonghe, W. 2005. Developments in bioremediation of soils and sediments polluted with metals and radionuclides– 1. Microbial processes and mechanisms affecting bioremediation of metal contamination and influencing metal toxicity and transport. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 4(3); 115-156.
- Tangahu, BV., Sheikh Abdullah, S.R., Basri, H., Idris, M., Anuar, N. and Mukhlisin, M. 2011. A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *International Journal of Chemical Engineering*,
- Teixeira, R.M. 2014. *Viva terra sociedade de defesa, pesquisa e educação ambiental*. São Paulo.
- Tetz, V.V., Rybalchenko, O.V. and Savkova, G.A. 1993. Surface films of *Escherichia coli* colonies. *FEMS Microbiol. Lett.* 107(2-3);1–240.
- Thomashow, M.F. and Rittenberg, S.C. 1978. Intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J: attachment of long-chain fatty acids to *Escherichia coli* peptidoglycan. *J. Bacteriol.* 135(3);1015–1023.
- Torres, M., Goldberg, J. and Jensen, T.E. 1998. Heavy metal uptake by polyphosphate bodies in living and killed cells of *Plectonema boryanum* (cyanophyceae). *Microbios*, 96(385); 141-147.
- Traven, A., Jelacic, B. and Sopta, M. 2006. Yeast Gal4: a transcriptional paradigm revisited. *EMBO Rep.* 7(5);496–499.
- Tsezos, M., Remoudaki, E. and Angelatou, V. 1995. A systematic study on equilibrium and kinetics of biosorptive accumulation. The case of Ag and Ni. *International biodeterioration and biodegradation*, 35(1-3); 129-153.
- Uauy, R., Olivares, M. and Gonzalez, M. 1998. Essentiality of copper in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 67(5); 952-959.
- Valeur, A., Tunlid, A. and Odham, G. 1988. Differences in lipid composition between free-living and initially adhered cells of a Gram-negative bacterium. *Arch. Microbiol.* 149(6);521–526.
- Van Hamme, J.D., Singh, A. and Ward, O.P. 2006. Physiological aspects: Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnology Advances*, 24(6); 604-620.
- van Hoek, M.J. and Hogeweg, P. 2009. Metabolic adaptation after whole genome duplication. *Mol. Biol. Evol.*
- Waddell, J., Elvehjem, C.A., Steenbock, H. and Hart, E.B. 1928. Iron in nutrition vi. iron salts and iron-containing ash extracts in the correction of anemia. *Journal of Biological Chemistry*, 77(2); 777-795.
- Wang, Y. 2012. Optimization of cadmium, zinc and copper biosorption in an aqueous solution by *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Chemistry*, 01.
- Whitfield, C. and Valvano, M.A. 1993. Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in Gram-negative bacteria. *Adv. Microb. Physiol.*(35);135–246.

- Winge, D.R., and Mehra, R.K. 1990. Host defenses against copper toxicity. In International review of experimental pathology (31); 47-83.
- Wicken, A.J. and Knox, K.W. 1980. Bacterial cell surface amphiphiles. Biochim. Biophys. Acta 604(1);1-26.
- Wolfe, K.H. and Shields, D.C. 1997. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. Nature 387(6634);-713.
- Wolkin, R.H. and Pate, J.L. 1985. Selection for nonadherent or nonhydrophobic mutants co-selects for nonspreading mutants of *Cytophaga johnsonae* and other gliding bacteria. J. Gen. Microbiol. 131(4);737-750.
- Wuana, R.A. and Okieimen, F.E. 2011. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. Isrn Ecology
- Yesilada, O., Cing, S. and Asma, D. 2002. Decolourisation of the textile dye Astrazon Red FBL by *Funalia troglia* pellets. Bioresource technology, 81(2); 155-157.
- Zhang, Y. and Miller, R. M. 1994. Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. Appl. Environ. Microbiol. 60(6); 2101-2106.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hüseyin Kaan KABADAYI
Doğum Yeri : Ankara
Doğum Tarihi : 08.11.1992
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce (2017 YÖKDİL: 62,50)

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Gazi Çiftliği Lisesi (2010)
Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2010-2015)
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı
(Eylül 2015- Haziran 2018)

Uluslararası Kongreler

Bioremoval of copper (II) ions by *Candida* sp. in molasses medium” The 2nd IWA Regional Symposium on World’s Water Resources: Past, Present and Future, March, 22-24, 2017 Çeşme/İzmir

“Reactive black 5 removal with *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of sugar beet molasses medium” The 2nd IWA Regional Symposium on World’s Water Resources: Past, Present and Future, March, 22-24, 2017 Çeşme/İzmir

Diğerleri

Aldığı Burslar

TÜBİTAK Başlangıç Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı (Kod: 3001), (2017-2018)