

**T. C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DEMİR BİYOGİDERİMİ İÇİN ETKİN
MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU VE
BİYOGİDERİM KAPASİTELERİNİN
İNCELENMESİ**

**ESRA KARLIK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**GEBZE
2010**

T. C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DEMİR BİYOGİDERİMİ İÇİN ETKİN
MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU VE
BİYOGİDERİM KAPASİTELERİNİN
İNCELENMESİ

ESRA KARLIK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. MELEK ÖZKAN

GEBZE
2010



YÜKSEK LİSANS TEZİ JÜRİ ONAY SAYFASI

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 15/01/2010 tarih ve 2010/03 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 04/02/2010 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Esra KARLIK'ın tez çalışması Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr. Melek ÖZKAN

ÜYE

: Yrd. Doç. Dr. Salim ÖNCEL

ÜYE

: Doç. Dr. Sedef Tunca GEDİK

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI: DEMİR BİYOGİDERİMİ İÇİN ETKİN MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU VE BİYOGİDERİM KAPASİTELERİNİN İNCELENMESİ

YAZARIN ADI: ESRA KARLIK

Günümüzde hızlı sanayileşmenin doğal bir sonucu olarak ağır metal içerikli atıklar çevrede olumsuz etkilere yol açmaktadır. Ağır metal içerikli atıklar doğada uzun süreli kalabilme özelliklerine bağlı olarak besin zincirine kolayca girebilmekte ve canlıların sağlığını tehdit etmektedir. Ağır metallerin gideriminde son yıllarda mekanik ve kimyasal yöntemlere göre daha ekonomik olan biyoteknolojik methodlar geliştirilmektedir.

Bu tez çalışmasında, ağır metal sınıfına giren ancak bir geçiş metali olan demirin arıtımında kullanılabilecek etkin mikroorganizmaların izolasyonu yapılmıştır. Yüksek konsantrasyonda demir ihtiva eden suların hem evsel hem endüstriyel alanda kullanımı uygun değildir. Çevre Koruma Ajansı (US Environmental Protection Agency (EPA)) tarafından belirlenen değerlere ve ülkemizde uygulanan Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliğine göre 0,3 mg/L'den daha fazla demir içeren sularda demir miktarının giderilmesi gerekmektedir. Kocaeli'nin Darıca ilçesi sınırları içerisinde sanayileşmenin yoğun olduğu ve ağır metal içeriğinin yüksek olduğu düşünülen beş farklı noktadan alınan toprak numunesinden demir gideriminde kullanılabilecek mikroorganizmalar izole edilmiştir. Topraktan izole edilen karışık kültürlerin demir giderim kapasiteleri analiz edilmiş ve en yüksek demir giderimi sağlayan dört izolat (N-1a, N-3a, N-4c, N-5b) sonraki çalışmalar için seçilmiştir. Seçilen dört izolat ile üç farklı sıcaklık değeri (25 °C - 30 °C - 37 °C), üç farklı pH değeri (pH 6,0 - pH 4,5 - pH 2,8), iki farklı demir konsantrasyonu (20 ppm, 50 ppm), anaerobik koşulların etkisi ve çalkalanarak üreme etkisi incelenmiştir. Kültürlerle yapılan deneylerde demir giderimi atomik absorpsiyon spektrofotometre cihazı kullanılarak tayin edilmiştir.

Her dört izolat da 50 ppm demir konsantrasyonuna sahip besiyerinde daha yüksek demir giderimi gerçekleştirmiştir. pH 2,8 de hücrelerin iyi üreme sağlayamamalarından dolayı demir giderim verimleri düşük bulunmuştur. Benzer şekilde inkübasyon sıcaklığı 25 °C'ye düşürüldüğünde izolatların demir (II) giderim verimleri düşmüştür. İzolatlar çalkalanarak üretildiklerinde demir giderim verimlerinde genel olarak bir artış görülmüştür. İzolatların anaerobik ortamda da ürediği ve demir giderimi yaptığı ancak aerobik koşullara kıyasla giderim veriminin düşük olduğu tespit edilmiştir. Çalkalanarak üremesi sağlanan N-1a ve N-4c izolatları için en yüksek demir giderim verimi gösterdikleri optimum koşullar sırasıyla, 30 °C'de pH 4,5'te inkübasyonun 24. saatinde % 100 olarak ve 30 °C'de pH 6,0'da inkübasyonun 144. saatinde % 100 olarak ölçülmüştür. N-3a izolatı için en yüksek demir giderimi 30 °C ve pH 4,5'te inkübasyonun 72. saatinde % 97,27 olarak belirlenirken, N-5b 30 °C'de ve pH 4,5'te inkübasyonun 96. saatinde % 100 verimle demir (II) giderimi gerçekleştirmiştir.

Mikroskopik incelemeler ve koloni morfolojisine bakılarak yapılan incelemeler sonucunda izolatların kısa veya uzun çubuksu yapıya sahip bakteriler olduğu saptanmıştır. N-5b ve N-4c hücrelerinin inkübasyonun ileri saatlerinde uzadıkları, N-1a hücrelerinin ise kalın ve segmentli filamentler oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu bakterilerin üreme profilleri incelendiğinde N-1a'nın pH 4,5'te diğer izolatlara kıyasla daha düşük bir hızda ürediği görülmüştür. N-1a izolatının filament görüntüleri literatürde varolan bazı filamentli bakterilerin görüntüleri ile kıyaslanmış ve farklı bir yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu izolatların yeni bir bakteri türü olup olmadıkları ileride gerçekleştirilecek olan moleküler karakterizasyon çalışmaları sonucunda belirlenebilecektir.

SUMMARY

TITLE OF THESIS: ISOLATION OF EFFECTIVE MICROORGANISMS FOR IRON BIOREMOVAL AND DETERMINATION OF THEIR BIOREMOVAL CAPACITY

AUTHOR: ESRA KARLIK

As a possible result of the rapid industrialization, nowadays, we experience harmful effects of heavy metal contamination on the environment. Depending on its feature of hard decomposition in the nature, heavy metals may participate into the food chain easily and threat our health. For the treatment of the heavy metal contamination, biotechnological methods are being developed in recent years, which are more economical in comparison with the mechanical and chemical ones.

In this study, effective microorganisms were isolated in order to remove iron which is transition metal in heavy metal class. Waters containing high concentrations of iron are not to be used in domestic and industrial fields. According to Environmental Protection Agency criteria and Water Pollution Control Regulations are applied in Turkey, it is required to remove excess iron from the waters with more than 0,3 mg/L iron. Soil samples were collected from the five different areas within the district of Kocaeli, Darıca, exposed intensive industrialization and considered to be contaminated by heavy metals. Microorganisms which are resistant to iron and having high iron removing capacity were isolated from collected soil samples. Iron removing capacities of the mixed cultures isolated from the soil were analyzed and the four isolates with the highest iron removing capacities (N-1a, N-3a, N-4c, N-5b) were selected for further analysis. Those four isolates were studied in terms of the effects of three different temperatures (25 °C - 30 °C - 37 °C), three different pH values (pH 6,0 - pH 4,5 - pH 2,8), two different iron concentrations (20 ppm, 50 ppm), anaerobic conditions and proliferation effect of shaking on iron removal capacity. Change in iron concentration in the cultures, were monitored by means of the atomic absorption spectrophotometer instrument.

Four of the isolates showed highest iron removing efficiency in 50 ppm iron (II) containing cultures. Because of unhealthy growth of the isolated microorganisms at pH 2,8, the bioremoving capacity of the isolates was found to be very low at that pH value. Similarly, when the incubation temperature was dropped to 25 °C iron (II) removing capacity of the isolates decreased. Shaking the cultures caused an improvement in iron (II) removal. The isolates were shown to grow in anaerobic conditions, however, their iron removing capacity was lower as compared to their capacities obtained at aerobic conditions. The highest efficiency of iron removing for isolates named as N-1a and N-4c was obtained in their shaking cultures at 30 °C. N-1a removed iron(II) with 100 % efficiency at 24th hour of the incubation at pH 4,5. 100 % efficiency was reached for the N-4c at the 144th hour of incubation at pH 6,0. N-3a showed its highest iron removing efficiency of 97,27 % at 72th hour of the incubation at 30 °C and at pH 4,5 in shaking conditions. For N-5b 100 % efficiency was obtained at non-shaking conditions at pH 4,5, at 30 °C.

Microscopic examinations and colony morphologies of the isolates showed that they are short or long rod shaped bacteria. At the late hours of incubation, elongation of N-5b and N-4c cells was observed under the microscope. N-1a cells also elongated at late hours but they also form thick and segmented filaments. When the filaments' structure was compared with that of other filamented bacteria it was thought that the structure of N-1a filaments had some differences. Further molecular characterization is necessary for finding out whether those isolates are a novel bacterial species or not.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince çalışmalarımın her safhasında ve özellikle bu tez çalışmasının en iyi şekilde aktarılabilmesi için engin bilgi, deneyim ve önerilerinden yararlandığım saygı değer tez danışmanım Doç. Dr. Melek ÖZKAN'a sağladığı tüm imkanlar ve desteği için en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında her tür konuda bilgi birikimine ve deneyimlerine başvurduğum, Sayın Yrd. Doç. Dr. Salim ÖNCEL'e ilgisinden ve özellikle atomik absorbsiyon cihazı ile yapılan ölçümlerdeki sonsuz yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman yardım ve desteklerini gördüğüm Çevre Mühendisliği Bölümü hocalarıma teşekkür ederim.

Her zaman bana destek olan ve bilgi paylaşımında bulunduğum sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Pınar KARAGÖZ, Arş. Gör. Derya Y. Köseoğlu İMER, Arş. Gör. Ercan GÜRBULAK başta olmak üzere bölümümüzdeki tüm arkadaşlarıma ve ayrıca Kimya Bölümü Arş. Gör. Duygu AYDIN'a teşekkür ederim.

Tüm sıkıntılı zamanlarımda sayfalarına sığındığım 9. ve 10. günlüklerime ve sayfaları doldurabilmemi sağlayan kalemime teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her türlü maddi ve manevi desteği sağlayan, bu tezin hazırlanma süreci boyunca sabır ve ilgilerini benden esirgemeyen babam A. Fazıl KARLIK, annem Gülin KARLIK, tez çalışmama yön veren düşünceleri benimle paylaşan kardeşim Özge KARLIK'a sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	iv
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR/SİMGELER DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Ağır Metal Kirliliği	3
2.2. Ağır Metallerin Özellikleri	4
2.2.1. Demir Elementi ve Genel Özellikleri	5
2.2.2. Demir Elementinin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri	8
2.2.3. Demir Oksidasyonu	9
2.2.3.1. Oksijen ile Oksidasyon	10
2.3. Ağır Metallerin Giderim Yöntemleri	12
2.4. Mikroorganizmalar	12
2.4.1. Mikroorganizmaların Büyüme Evreleri	13
2.4.2. Mikroorganizmaların Ağır Metal Gideriminde Kullanılması	15
2.5. Adsorpsiyon	16
2.6. Biyosorpsiyon	18
2.6.1. Mikroorganizmalarla Ağır Metal Adsorblanma Mekanizması	19
2.6.2. Mikroorganizmalarda Metal Toksisitesi ve Mikrobiyal Direnç Mekanizmaları	21
2.6.3. Demir Gideriminde Mikroorganizmaların Kullanımı	22
2.7. Anaerobik ve Aerobik Arıtım	29
3. MATERYAL – YÖNTEM	31
3.1. Materyal	31

3.1.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar	33
3.1.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	34
3.1.2.1. LB (Luria Broth) Besiyeri	34
3.1.2.2. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltileri	35
3.1.2.3. Sentetik Atık Su	35
3.1.2.4. Sülfirik Asit (H_2SO_4) Çözeltisi	36
3.1.2.5. NaCl Çözeltisi	36
3.2. Yöntem	36
3.2.1. Toprak Numunelerinden Mikroorganizmaların İzolasyonu	36
3.2.2. Saf Kültürlerin Elde Edilmesi	37
3.2.3. Anaerobik Ortamda Kültürlerin Ekimi	37
3.2.4. Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre Cihazı ile Demir Tayini	38
3.2.4.1. Kalibrasyon Eğrisinin Çıkarılması	40
3.2.5. Elde Edilen Karışık Kültürlerde Demir Gideriminin İncelenmesi	40
3.2.6. Karışık Kültürlerden İzole Edilen Saf Kültürlerde Demir Gideriminin İncelenmesi	41
3.2.7. Demir(II) % Giderim Verimliliğinin Hesaplanması	41
3.2.8. Mikroorganizmaların Üreme Eğrilerinin Çıkarılması	42
3.2.9. Mikroorganizmaları Tanımlanma Çalışmaları	42
4. DENEYSEL BULGULAR	43
4.1. Elde Edilen Karışık Kültürlerde Demir Gideriminin Belirlenmesi	43
4.1.1. Sentetik Atık Suda Karışık Kültürler ile Demir Giderimi	44
4.2. Karışık Kültürlerden İzole Edilen Saf Kültürlerin Demir Giderim Kapasitelerinin Belirlenmesi	46
4.3. Bazı İnkübasyon Koşulları ve Besiyeri Parametrelerinin İzolatların Üremeleri ve Demir Giderim Kapasitelerine Olan Etkisi	48
4.3.1. Farklı pH ve Demir(II) Konsantrasyonunda Çalkalanarak Üreyen Kültürlerin Üreme Profilleri ve Demir (II) Giderim Verimleri	48
4.3.2. Farklı Sıcaklıklarda ve Farklı pH'larda Çalkalanmadan Üreyen Kültürlerin Üreme Profilleri ve Demir (II) Giderim Verimleri	53
4.3.3. Anaerobik Koşullarda İzolatların Üreme Profilleri ve Demir Giderim Verimleri	57
4.4. Yüksek Demir(II) Giderimi Gösteren İzolatları Tanımlama Çalışmaları	62

4.4.1 Koloni Morfolojilerinin Kıyaslanması	62
4.4.2. İzolatların Işık Mikroskopunda İncelenmesi	65
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	70
KAYNAKLAR	74
ÖZGEÇMİŞ	82

KISALTMALAR/SİMGELER DİZİNİ

µl:	Mikrolitre
ml:	mililitre
µg:	Mikrogram
mg:	Miligram
nm:	Nanometre
ppm:	Miligram/Litre
ppb:	Mikrogram/Litre
AAS:	Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre
UV:	Ultra viyole
°C:	Santigrat derece
°K:	Kelvin derece
rpm:	Devir/Dakika, dakikada devir sayısı
Fe ⁺² :	Demir(II) iyonu (Ferrous)
Fe ⁺³ :	Demir(III) iyonu(Ferrik)
LA:	Luria Agar besiyeri
LB:	Luria Broth besiyeri
sp:	Tür
CFU:	Colony Forming Units (Koloni oluşturabilen hücre)
EPA:	US Environmental Protection Agency (Çevre Koruma Ajansı)
C _{kontrol} :	Her deneyde karışık kültürlerle paralel olarak yapılan 20 ppm veya 50 ppm demir konsantrasyonuna sahip bakteri içermeyen LB besiyerinin başlangıç demir konsantrasyonu (mg/L)
C _{son} :	İnkübasyon süresinin ardından her bir kültürde sıvı kısmında kalan demir konsantrasyonu (mg/L)
DNA:	Deoksiribo nükleik asit
RNA:	Ribo nükleik asit
PHB:	Polihidroksibütirat

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Çözelti pH'sı ve Fe^{+2} oksidasyon hızı arasındaki ilişki	11
2.2 Kesikli kültürde bakteriyel üreme eğrisi	13
2.3 Demir oksidasyonu yapan <i>Gallionella</i> bakterisinin görüntüsü	25
2.4 Demir oksidasyonu yapan <i>Leptothrix</i> bakterisinin görüntüsü	26
2.5 <i>Desulfonema limicola</i> bakterisinin mikroskopik görüntüsü	27
2.6 <i>Beggiota</i> bakterisinin filament yapıları (A), (B) ve (C)	27
2.7 <i>Sphaerotilus natans</i> türünün mikroskoptaki görüntüleri	28
2.8 Tür 021N bakterisinin filament görüntüleri	28
2.9 <i>Thiothrix I</i> bakterisinin filament görüntüleri	29
3.1 Bakır işleme fabrikası arkası, Numune 1 ve Numune 2'nin alındığı bölge, Kuşbakışı görüntüsü (A), Yakından görünüş (B)	31
3.2 Hurda metallerin toplandığı ve Numune 3'ün alındığı bölge	32
3.3 Hurda metallerin yüklendiği ve Numune 4, Numune 5'in alındığı bölge, Kuşbakışı görüntüsü (A), Yakından görünüş (B), Numune 5'in alındığı bölgenin yakından görünüşü (C)	32
3.4 Fe^{+2} Kalibrasyon Eğrisi	40
4.1 20 ppm Fe(II) içeren LB besiyerinde karışık kültürlerin üreme eğrisi	43
4.2 20 ppm Fe(II) içeren LB besiyerinde karışık kültürlerin % demir giderimi	44
4.3 20 ppm demir(II) içeren sentetik atık suda karışık kültürlerin üreme eğrisi	45
4.4 Sentetik atık suda karışık kültürler ile demir(II) giderimi	45
4.5 20 ppm demir(II) içeren LB besiyerinde N-4 ve N-5 karışık kültürlerinden seçilen izolatların üreme eğrisi	46
4.6 20 ppm demir(II) içeren LB besiyerinde N-4 ve N-5 karışık kültürlerinden elde edilen türlerin % demir (II) giderimi	47
4.7 30 °C'de, 20 ppm demir konsantrasyonunda, pH 6,0'da ve 150 rpm'de çalkalanarak üreyen saf kültürlerin üreme eğrisi (A) ve % demir(II) giderimi	

(B)	49
4.8 30 °C’de 20 ppm demir konsantrasyonunda pH 4,5’de 150 rpm’de çalkalanarak üreyen saf kültürlerin üreme eğrisi (A) ve % demir(II) giderimi (B)	50
4.9 30 °C’de 20 ppm demir konsantrasyonunda pH 2,8’de 150 rpm’de çalkalanarak üreyen saf kültürlerin üreme eğrisi (A) ve % demir(II) giderimi (B)	50
4.10 30 °C’de 50 ppm demir konsantrasyonunda pH 6,0’da 150 rpm’de çalkalanarak üreyen saf kültürlerin üreme eğrisi (A) ve % demir(II) giderimi (B)	51
4.11 30 °C’de 50 ppm demir konsantrasyonunda pH 4,5’te 150 rpm’de çalkalanarak üreyen saf kültürlerin üreme eğrisi ve % demir(II) giderimi	52
4.12 30 °C’de 50 ppm demir konsantrasyonunda pH 2,8’de 150 rpm’de çalkalanarak üreyen saf kültürlerin üreme eğrisi (A) ve % demir(II) giderimi (B)	53
4.13 25 °C’de 50 ppm demir konsantrasyonunda pH 6,0’da üreyen saf kültürlerin üreme eğrisi (A) ve % demir(II) giderimi (B)	54
4.14 30 °C’de 50 ppm demir konsantrasyonunda pH 6,0’da üreyen saf kültürlerin üreme eğrisi (A) ve % demir(II) giderimi (B)	54
4.15 37 °C’de 50 ppm demir konsantrasyonunda pH 6,0’da üreyen saf kültürlerin üreme eğrisi (A) ve % demir(II) giderimi (B)	55
4.16 25 °C’de 50 ppm demir konsantrasyonunda pH 4,5’te üreyen saf kültürlerin üreme eğrisi (A) ve % demir(II) giderimi (B)	56
4.17 30 °C’de 50 ppm demir konsantrasyonunda pH 4,5’te üreyen saf kültürlerin üreme eğrisi (A) ve % demir(II) giderimi (B)	57
4.18 37 °C’de 50 ppm demir konsantrasyonunda pH 4,5’da üreyen saf kültürlerin üreme eğrisi (A) ve % demir(II) giderimi (B)	57
4.19 Anaerobik koşullarda 30 °C’de 20 ppm demir konsantrasyonunda pH 6,0’da üreyen saf kültürlerin üreme eğrisi (A) ve % demir(II) giderimi (B)	58
4.20 Anaerobik koşullarda 30 °C’de 50 ppm demir konsantrasyonunda pH 6,0’da üreyen saf kültürlerin üreme eğrisi (A) ve % demir(II) giderimi (B)	59

4.21	Anaerobik koşullarda 30 °C’de 50 ppm demir konsantrasyonunda pH 4,5’da üreyen saf költürlerin üreme eğrisi (A) ve % demir(II) giderimi (B)	60
4.22	Anaerobik şartlarda 30 °C’de 50 ppm Fe ⁺² konsantrasyonunda pH 6,0’da (A) ve pH 4,5’te izolatlarda gözlenen siyah renk oluşumu	60
4.23	N-1a izolatına ait koloniler	63
4.24	N-3a izolatına ait koloniler	63
4.25	N-4c izolatına ait koloniler	64
4.26	N-5b izolatına ait koloniler	64
4.27	N-1a izolatının ışık mikroskopunda 100x objektif ile alınan görüntüsü	65
4.28	N-3a izolatının ışık mikroskopunda 100x objektif ile alınan görüntüsü	66
4.29	N-4c izolatının ışık mikroskopunda 100x objektif ile alınan görüntüsü	66
4.30	N-5b izolatının ışık mikroskopunda 100x objektif ile alınan görüntüsü	67
4.31	N-1a izolatının 20 ppm Fe(II) varlığında pH 4,5’te ve 30 °C’de filament formasyonu (7. gün) (A) 100x objektif ile (B) 40x objektif ile filament oluşumunun başlaması görüntüsü (C) 40x objektif ile filament oluşumu görüntüsü	68
4.32	pH 6,0’da 37 °C de 50 ppm Fe(II) varlığında uzama gösteren N-4c hücrelerinin 100x objektifle çekilmiş görüntüsü (8. gün)	69
4.33	pH 4,5’te 30 °C de 50 ppm Fe(II) varlığında uzama gösteren N-5b hücrelerinin 100x objektifle çekilmiş görüntüsü (8. gün)	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Değişik ekosistemlerde belirlenmiş bulunan karakteristik ağır metal miktarlarının değişim sınırları	4
2.2. Değişik atık su örneklerinde demir metali miktarı ve pH değerlerinin değişim sınırları	8
3.1 Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler	34
3.2 Luria Broth besiyeri bileşimi	35
4.1 Farklı koşullarda izolatların biyogiderim verimleri	61
4.2 Saf kültürlerin koloni morfolojilerine ait özellikler	62

1. GİRİŞ

Dünyada giderek artan nüfusla birlikte gelişen teknoloji ve hızlı sanayileşme ile sağladığı rahatlık, çevre kirliliği problemini de beraberinde getirmektedir. Hızlı nüfus artışıyla birlikte artan yerleşim alanları ve sanayi tesislerinden kaynaklanan katı, sıvı ve gaz formundaki atıklar, doğanın dengesini bozan ve canlılığı tehdit eden boyutlara ulaşmıştır. Doğal kaynakların tahribi, çevre kirliliği konusunda yapılan saptamalar, bozulan ve yok olan çevre değerlerinin gündeme gelmesine neden olmuştur. Sanayileşme ile oluşan maddelerin, doğa ve insan için, düzeltilmesi mümkün olmayan zararlara sebep olduğu artık anlaşılmıştır. Çevre kirliliğini artıran ve ekolojik dengenin bozulmasına yol açan sanayi kollarının başında atık sularında ağır metal içeren kuruluşlar gelmektedir. Söz konusu sanayi kuruluşları, süreçleri gereği çeşitli ağır metalleri kullanmakta ve atıklarında yüksek konsantrasyonlarda civa, çinko, kobalt, bakır, demir, kurşun, krom, arsenik ve gümüş gibi ağır metal iyonlarını içermektedirler.

Doğanın sınırlı ve yavaş bir yenilenme kapasitesine sahip olmasından dolayı çevre sorunlarının çözümüne yönelik teknolojilerin geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir. Bu teknolojilerden biri olan çevre biyoteknolojisi, canlı organizmaların ve onlardan elde edilen ürünlerin, zararlı atıkların arıtımında ve çevre kirliliğinin önlenmesinde kullanılmasını kapsamaktadır. Fiziksel veya kimyasal prosesler yüksek miktarlarda metal içeren atıkların arıtılması için elverişli ve ekonomik sayılabilir ancak düşük konsantrasyonlarda metal içeren büyük hacimlerdeki atıksuların arıtımında biyolojik yöntemlerin daha ekonomik olduğu rapor edilmektedir [Wang ve Chen, 2009; Volesky, 2001]. Çevre biyoteknolojisi, sanayi atıklarından ağır metalleri uzaklaştırmak için mevcut konvansiyonel fiziksel ve kimyasal yöntemler yanında doğal bir alternatif sunmaktadır.

Son yıllarda biyoteknolojik uygulamalar, atıksuların arıtılmasında ve ağır metal gideriminde oldukça yaygın şekilde kullanılmaktadır. Fiziksel, kimyasal ve biyolojik arıtım yöntemlerine büyük maliyetler harcanmasına rağmen evsel ve endüstriyel atıkların arıtılması sonucu oluşan konsantre arıtma çamurlarının ve katı atıkların bertaraf edilmesi başka bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle bir çok atık türünün arıtılmasında biyolojik arıtım yöntemleri geliştirilmektedir. Doğada kendiliğinden

oluşabilen bu arıtım yöntemi teknolojik imkanlardan yararlanılarak pek çok atığın hızlı ve kontrollü bir şekilde arıtılmasına olanak tanımaktadır.

Demir metalinin gideriminde kullanılan kimyasal oksidasyon yöntemi yüksek alkali madde ihtiyacı nedeniyle maliyeti yüksek ve çevreyi kirleten bir yöntem olduğundan bu yönteme alternatif olarak demirin gelişen biyoteknolojik yöntemlerle giderimi üzerindeki bilimsel çalışmalar artmaktadır.

Bu çalışmada ağır metallerce kirlenmiş olduğu düşünülen sanayi bölgelerinden demir biyogideriminde kullanılabilecek etkin mikroorganizmaların izolasyonu yapılmıştır. Darıca ilçesi çevresinde konumlanan sanayi bölgelerinden toplanan beş farklı toprak numunesinden izole edilen karışık ve saf kültürlerin Fe^{+2} giderim verimliliği farklı koşullar altında ölçülerek demir (II) metaline dirençli ve demir gideriminde kullanılabilecek izolatlar elde edilmiştir. Bu izolatların farklı koşullarda demir (II) giderim kapasiteleri incelenmiş ve koloni morfolojilerine ve mikroskoptaki görüntülerine bakılarak ön karakterizasyonları yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ağır Metal Kirliliği

Hızlı nüfus artışının doğal kaynaklar ve ekolojik ortam üzerinde yarattığı baskı çevre kirliliği şeklinde karşımıza çıkmaktadır. Çevre kirliliği yaratan en önemli kirletici gruplarından birini ağır metaller ve tuzları oluşturmaktadır. Toprak veya su kaynaklarına karışan bazı kirletici maddeler, uzaklaştırılabildikleri veya biyolojik olarak parçalanabildikleri halde, ağır metallerin parçalanarak giderimleri söz konusu değildir. Alıcı ortamlara girmiş bulunan ağır metaller, yüksek oranlarda birikime sebep olmaları, kimyasal ve biyolojik süreçleri olumsuz yönde etkilemeleri nedeniyle en tehlikeli kirletici grubu olarak nitelendirilirler. Ağır metallerin özellikle su ortamındaki besin zincirinde birikerek organizmadan organizmaya artan konsantrasyonlar halinde taşındığı bilinmektedir [Straub et.al., 2001]. Bir metalin toksisitesi, makromolekül, metabolit ve hücre organelleriyle birlikte biyolojik sistemlerdeki dinamik yaşam proseslerine zarar verme kapasitesine dayanır [Ağcasulu, 2007]. Ağır metaller, metabolik reaksiyonları yavaşlatarak canlı organizmalara toksik etki gösterir. Ağır metal içeren çözeltilerin toksik etkisi organizmanın türüne, üreme zamanına, su ortamının ısı, ışık, tuzluluk gibi fiziksel değişkenlerine ve metalin cinsine göre değişir. Ancak genel olarak metallerin hepsi, birden fazla organ ve sistemi etkilediği için tek bir biyokimyasal proses etkilenmemektedir [Förstner ve Wltmann, 1981]. Bu büyük tehlike insanlar tarafından fark edildiğinden beri ağır metal kirliliği oluşturan endüstri kuruluşlarından oluşan atıkların bertarafı ile ilgili çalışmalar önem kazanmıştır.

Bilim adamlarına göre antropojenik kaynaklı olarak atmosferden diğer ekosistemlere dağılan arseniğin 22 bin ton, kadmiyumun 70 bin ton, kurşunun 400 bin ton, bakırın 56 bin ton, çinkonun ise 214 bin ton civarında olduğu ifade edilmektedir. Değişik ekosistemlerde belirlenen karakteristik miktarlarının alt ve üst sınırları Çizelge 1.1’de verilmiştir. Bu çizelgede ağır metal miktarlarının dünyanın değişik yerlerinde ne kadar farklılık gösterdiği görülmektedir [Çepel, 1997].

Çizelge 2.1. Değişik ekosistemlerdeki bazı ağır metal miktarlarının değişim sınırları (Çepel, 1997)

Element	mg/kg kuru toprak
As	0,1-40
Ag	0,01-0,8
B	2,0-100
Fe	7000- 550,000
N	200-2500
Cr	5,0-3000
Ni	10-1000
Cu	2-100
Pb	2-200
Zn	10-300

2.2. Ağır Metallerin Özellikleri

Sayısız kullanım yeri olan metaller biyolojik anlamda üç gruba ayrılabilir;

- Esansiyel elementler: Canlının yaşaması için mutlaka gerekli olan metallerdir. Sıvı ortamlarda hareketli katyonlar olarak taşınırlar. Örneğin kalsiyum, potasyum, sodyum, magnezyum vb.
- Yan elementler (Geçiş elementleri): Düşük konsantrasyonlarda esansiyel olan fakat yüksek konsantrasyonlarda toksik etki yapan elementlerdir. Örneğin demir, bakır, kobalt, manganez, çinko, molibden, krom vb.
- Eser elementler (Metaloitler): Metabolik aktivite için genelde gerekli olmayan ve oldukça düşük konsantrasyonlarda, hücrede toksik etki yapan elementlerdir. Örneğin kadmiyum, arsenik, civa, kurşun, kalay, selenyum, berilyum vb.

Bu üç gruptan yan ve eser elementler genelde ağır metal olarak adlandırılır. Özgül ağırlığı 5 g/cm^3 'den büyük ve atom numarası 22'den 92'ye kadar olan elementler ağır metal olarak tanımlanır. Organizmanın sağlıklı büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan ağır metallerin miktarı organizmanın ağırlığının % 0,01'inden az olmalıdır [Förstner ve

Wlittmann, 1981]. Bu elementler doğaları gereği yerkürede genellikle karbonat, oksit, silikat ve sülfür halinde stabil bileşik olarak veya silikatlar içinde hapis olarak bulunurlar [Kahvecioğlu ve ark., 2003].

2.2.1. Demir Elementi ve Genel Özellikleri

Günümüzde demir elementinin toplumun genel gereksinim metali olması nedeniyle bir ülkenin demir-çelik üretimi ve tüketimi o ülkenin ekonomik gücüyle ve gelişmişliği ile yakından ilgilidir. Demir yataklarının potansiyeli, işletilebilme ve değerlendirilebilme olanakları ülke ekonomisi için oldukça önemlidir. Dünyadaki demir cevheri rezervleri yaklaşık 160 milyar tondur. Metal demir içeriği olarak toplam dünya rezervi 80 milyar ton dolayındadır. Çin (21 milyar ton), Ukrayna (30 milyar ton), Brezilya (21 milyar ton), Rusya (25 milyar ton), Avustralya (18 milyar ton), ABD (6,9 milyar ton), Kazakistan (8,3 milyar ton), İsveç, Hindistan, Kanada ve Güney Afrika Cumhuriyeti demir potansiyeli açısından dünyada önemli ülkelerdir [Mineral Commodity Summaries, 2005]. Dünyada 50 kadar ülkede demir cevheri üretilmektedir. Çin, Avustralya, Brezilya, Rusya, Ukrayna ve Hindistan dünya demir cevheri üretiminin yaklaşık %70'ini gerçekleştirmektedir. Türkiye 1939 yılında 140.000 ton/yıl ile başlayan demir-çelik üretimini 1999 yılında 14 milyon ton/yıl üretime taşıyarak büyük bir kalkınma sağlamıştır [Maden Mühendisleri Odası, Demir-Çelik Sektörü Raporu, 2005].

Demir elementi periyodik cetvelin 8. grubu, 4. periyodunda yer alan bir geçiş metalidir. Elektron konfigürasyonu $[Ar] 3d^6 4s^2$ 'dir. Atom numarası 26, yoğunluğu $7,86 \text{ g/cm}^3$ ($298 \text{ }^\circ\text{K}$ 'de), mol kütlesi $55,847 \text{ g/mol}$ 'dür. Kaynama noktası $2862 \text{ }^\circ\text{C}$, erime noktası $1538 \text{ }^\circ\text{C}$ 'dir. +2, +3, +4, +6 değerlerine sahip olan demir elementi oksit, hidroksit, klorür, asetat, karbonat, sülfid, nitrat, sülfat gibi anyonlarla ve çok sayıda inorganik kompleks iyonla birleşerek organometalik bileşikler meydana getirebilir. Demir yer kabuğunda en çok bulunan 4. elementtir ve yer kabuğunun kütlece % 5,1'ini oluşturur. Bu demirin büyük bir çoğunluğu, hematit (Fe_2O_3), manyetit (Fe_3O_4), siderit (FeCO_3) ve takonit mineralleri içinde oksitli olarak bulunur [Müller et al., 2006].

Metalik demir elde etmek için, cevherdeki safsızlıkların kimyasal redüksiyon yoluyla uzaklaştırılmaları gerekir. Demir, aslında büyük ölçüde karbonlu bir alaşım olarak kabul

edilen çelik yapımında kullanılır. Demir, karbonla birlikte 1420 – 1470 °K sıcaklığa kadar ısıtıldığında sıvı bir eriyik oluşur, bu eriyik % 96,5 demir ve % 3,5 karbon içeren bir alaşımdır. Demir elementi kimyasal yönden oldukça aktif bir metaldir, reaksiyonlarda en çok karşılaşılan formları ise Fe^{+2} (Ferrous) ve Fe^{+3} (Ferrik) formlarıdır. Hangi formda bulunacağı çevresel koşullara bağlıdır. Fe^{+2} ve Fe^{+3} iyonları arasındaki redoks değişimi, anoksik topraklarda ve sedimentlerdeki redoks proseslerinde önemli role sahiptir. İki değerlikli demir tuzları su ortamında çözülmüş halde bulunurlar. İki değerlikli demir tuzlarının oksitlenmesi suda çözünmeyen, kırmızı renkte üç değerli demir tuzlarının oluşumuna yol açar. Oksijen varlığında, Fe^{+2} iyonu yalnızca asidik şartlar altında stabildir, nötr pH’lerde hızlı bir şekilde Fe^{+3} formuna okside olur [Şengül ve ark., 1986; Spanierman S. C., 2009].

Derin yer altı tabakalarından gelen demir ve mangan elementlerini içeren sular, hareketleri esnasında toprak içerisindeki azotlu ve kükürtlü formlardan geçerken bu bileşiklerin indirgenmesine sebep olurlar ve kendileri oksitlenirler. Oksidasyon olayı suda çözülmüş oksijen vasıtasıyla da oluşabilir [Köseoğlu, 2005]. Demir ihtiva eden suların hem evsel hem endüstriyel alanda kullanımı uygun değildir. Çevre Koruma Ajansı-US Environmental Protection Agency (EPA)’nın belirlediği değerlere göre 0,3 mg/L’den daha fazla demir içeren sularda demir miktarının giderilmesi gerekmektedir. Bu amaçla özel tasfiye tesisleri yapılmaktadır [Saatçioğlu, 1998].

Sudaki demir katyonları havanın oksijeni ile reaksiyona girer ve Fe^{+2} ’nin Fe^{+3} formuna oksitlenmesi suda çözünmeyen renkli kolloidler oluşturur. Oksitlenmenin hızı oldukça yavaş olduğundan su ortamında renkli ve bulanık görünüm uzun süre devam eder. Bu reaksiyonlar, su ortamının pH’sı 6,0’dan yukseke daha büyük boyutlarda meydana gelir. Reaksiyon hızları, su içerisinde bulunan bazı inorganik iyonların katalitik etkisi ve çeşitli mikroorganizmaların gerçekleştirdiği reaksiyonlarla da artabilmektedir [Gagnon, 2009; Winter, 2009].

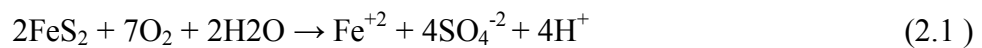
Su ortamında demirin aşırı miktarda bulunmasının oluşturduğu problemleri aşağıdaki gibi sıralayabiliriz:

- Yüksek demir konsantrasyonları içme suyunda istenmeyen renk ve bulanıklığa neden olduğundan bu sular estetik nedenlerle kötü sular olarak adlandırılırlar.

- Fazla demir ihtiva eden sularda metalik bir tat oluşur.
- Tekstil, kağıt, deri ve plastik gibi endüstriyel ürünlerde leke oluşumuna neden olur.
- Su borularının iç cidarlarında zamanla biriken demir yük kayıplarının artmasına sebep olur.
- Suyun ulaştırılmasının sağlandığı borular içerisinde demir bakterilerinin çoğalmasıyla borularda kesit daralması ve bakteri kütlelerinin koparak içme suyunun kirlenmesine, tesisat aksamalarının tıkanmasına meydan verebilir.

Demir elementinin çözünmüş olarak su ortamlarına karışması dört maddeyle açıklanabilir;

1. Oksijenden yoksun fakat CO₂ bakımından zengin sularda, Fe⁺² (ferrous demir) katyonları bulunur.
2. Düşük konsantrasyonlarda demir ihtiva eden, iyi kaliteli su içeren kuyuların yakınlarında organik atık kaynaklarının bulunması halinde, toprak içerisinde oluşan anaerobik koşullar nedeniyle bu suların zamanla çok kötü kaliteli sulara dönüştüğü gözlenmiştir.
3. Yeterli derinliği bulunan suni göllerde su tabakalaşması halinde alt tabakanın anoksik olmasıyla meydana gelebilecek anaerobik koşullar nedeniyle demir bu alt tabakadaki su ortamında birikir. Bu sebeple, sonbahar ayında göl tabakalaşmasının tersine döndüğü günlerde rezervden çekilen sular demir bakımından yoğun olur.
4. Yer altı suyunun aşırı şekilde çekildiği akifere su vermek gerektiğinde, oksijence zengin olan yüzey suyunun, akifere verilmesinden sonra yer altı suyunun demir konsantrasyonlarında artış olduğu izlenmiştir. Akifere geri basılan yüzey suyundaki oksijenin çözünmeyen pirit bileşiklerini okside ederek;



reaksiyonu ile Fe⁺²'yi arttırması sonuncunda çözünen demir sülfat oluşur [Şengül, 1986].

Otomotiv, gemi gövdesi yapımı ve binaların yapısal bileşeni olarak kullanımı başta olmak üzere, düşük fiyatı ve yüksek mukavemet özelliklerinden dolayı demir elementinden pek çok alanda yararlanılır. Endüstriyel kaynaklı madencilik ve cevher işleme tesisleri, demir-çelik ve metal işleme endüstrileri, boya ve dezenfektan tesisleri, petrol rafineleri, tekstil üretim sistemleri, kimyasal üreticilerinin çıkış suları yüksek konsantrasyonda demir içeren atık sularıdır.

Çizelge 2.2. Değişik atık su örneklerinde demir metali miktarı ve pH değerlerinin değişim sınırları (Korac ve Kamberovic, 2005; Jordanov et al., 2007; Strasser, 1994)

	pH	Demir
BOR MADENİ	3,6 - 7,7	0,21- 85,4 mg/L
BAKIR MADENİ	5,2 - 6,7	0,35 - 4,44 mg/L
ANAEROBİK ATIK ÇAMUR	3,3	96 g/kg

En çok karşılaşılan demir bileşikleri ve kullanım alanlarını belirtecek olursak; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (demir(II) sülfat hekza hidrat) sulu sülfirik asit ile metalik demirin birleşiminden oluşmaktadır ve mürekkep, boya, dezenfektan üretiminde kullanılmaktadır. $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (demir(III) klorür hepta hidrat) aşındırma bileşeni ve boya endüstrisinde sabitleştirici olarak kullanılan yeşil-kahverengi yapıda kristal bir bileşiktir. Fe_2O_3 (demir oksit), boya pigmenti ve cila olarak kullanılan kırmızı-kahverengi bir tozdur [Koby, 2001].

2.2.2.Demir Elementinin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

İnsanda bağışıklık sistemin güçlenebilmesi kanda oksijen taşıyan kırmızı kan hücrelerinin (hemoglobin) ve çeşitli enzimlerin üretilmesine bağlıdır. Bu yüzden, demir gibi bazı minerallerin insan vücudunda bulunması gereklidir. Demir elementinin

vücutta fazla miktarlarda bulunması zehirleyicidir, çünkü aşırı miktarlarda alınan +2 değerlikli demir (ferrous demir) vücuttaki peroksitlerle reaksiyona girerek serbest radikallerin oluşumuna sebep olur. İnsan vücudu demirin emilimini çok sıkı kontrol eden bir mekanizmaya sahip olmasına rağmen bu mekanizmanın demirin vücuttan atılmasına ilişkin fizyolojik bir etkisi yoktur. Vücutta bulunan aşırı miktardaki demir, sindirim sistemi organlarının florasına zarar verebilir ve sindirim sisteminden emilerek kan dolaşım sistemine girer. Dolaşım sisteminde bulunan fazla miktardaki demir kalp, karaciğer ve diğer organların hücrelerine zarar vermeye başlar ve bu oluşum sonucunda, uzun süreli organ hasarları veya aşırı dozdan ölümler meydana gelebilir [Spanierman, 2009]. İnsanlarda demirin toksik etkisi demir miktarı 20 mg/kg'ı geçtiğinde görülmeye başlar. Kilogram başına 60 miligram demir öldürücüdür [Muslu, 1985].

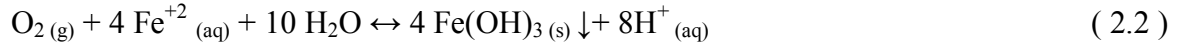
2.2.3.Demir Oksidasyonu

Su içerisinde bulunan diğer zararlı ve istenmeyen maddelerin bertarafında kullanılan kimyasal oksidasyon işlemi demir elementinin su ortamından uzaklaştırılması için de yaygın olarak kullanılmaktadır. Oksidasyon, serbest halde veya bir bileşiğin yapısında bulunan bir elementin değerliğinin redoks reaksiyonları esnasında elektron vermesi sonucunda yükseltilmesi olayıdır. Oksidasyon yöntemiyle atık sudaki renk ve koku giderimi de sağlanmış olur [Samsunlu, 2006]. Su temininde demir gidermek için günümüzde kullanılan arıtım metodlarının bir çoğunda çözünür Fe^{+2} çözünemeyen Fe^{+3} 'e okside edilir [Koby, 2001].

Fe^{+2} 'nin oksidasyon hızı üzerinde yapılmış pek çok araştırma literatürde mevcuttur. Genel olarak bu çalışmalar içerisinde oksitleyici olarak oksijen kullanılmıştır; diğer oksitleyiciler hakkında çok az kinetik bilgi mevcuttur. Bununla birlikte literatürde klor ve permanganatın kullanıldığı reaksiyon tanklarının yapılmasının daha yararlı olduğu konusunda bazı yorumlar yapılmıştır [Tünay, 2000].

2.2.3.1. Oksijen ile Oksidasyon

Demirin oksijen ile reaksiyonu sonucu oksidasyon gerçekleşmektedir.



Stokiyometrik oran olarak, 1,0 mg/L demirin oksidasyonu için 0,14 mg/L oksijenin gerektiği görülmektedir.

Nötr pH'larda bikarbonat çözeltilerinde oksijen ile Fe^{+2} 'nin oksidasyonu araştırılmış [Koby, 2001] ve reaksiyonun hız eşitliği aşağıdaki şekilde tanımlanmıştır:

$$d [\text{Fe}^{+2}] / dt = k [\text{Fe}^{+2}] [\text{OH}^-]^2 P_{\text{O}_2} \quad (2.3)$$

Eşitliği açıklayacak olursak;

$d [\text{Fe}^{+2}] / dt$: Fe^{+2} 'nin oksidasyon hızı (mol/L.dk)

k : reaksiyon hız sabiti

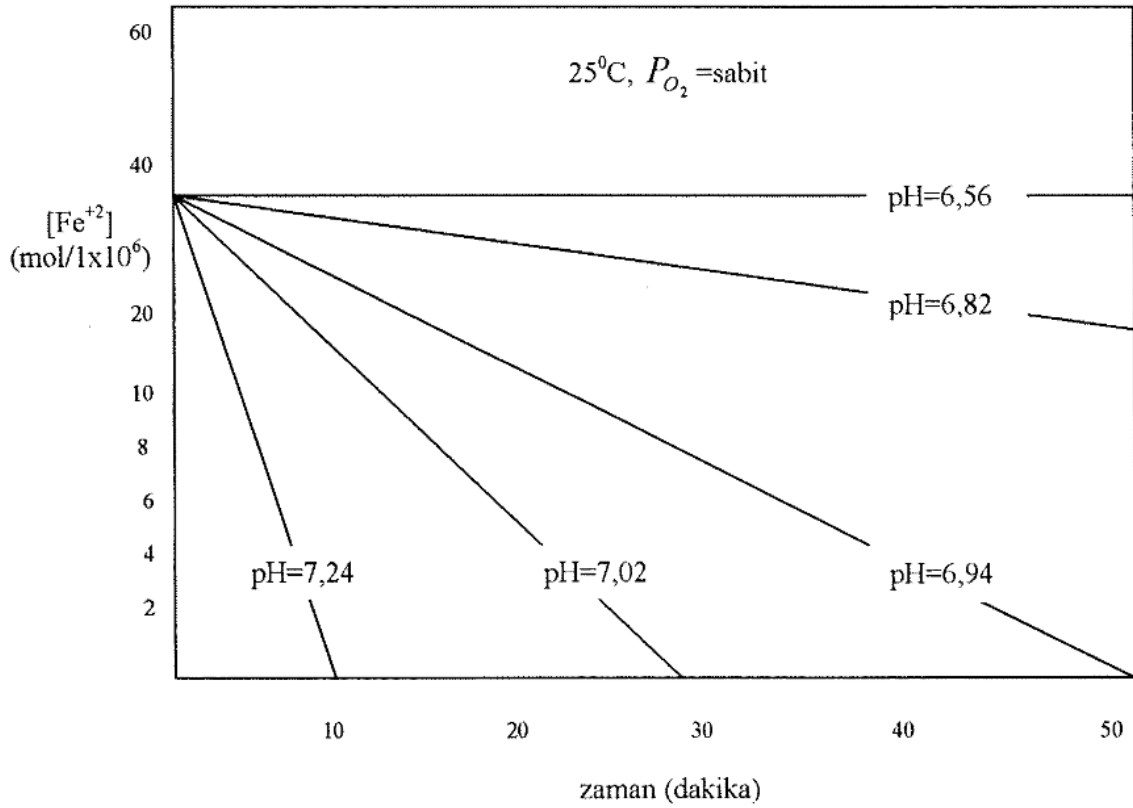
20,5 °C'de sabitin değeri $8,0 \times 10^{13}$ (L²/mol².atm.dk) olarak bulunmuştur.

P_{O_2} : Oksijenin kısmi basıncı (gaz fazında). Genellikle 0,21 atm olarak kabul edilir.

$[\text{Fe}^{+2}]$: Fe^{+2} konsantrasyonu (mol/L)

$[\text{OH}^-]$: Hidroksil anyonu konsantrasyonu (mol/L)

Fe^{+2} 'nin oksidasyon hızı ile hidrojen iyonu konsantrasyonu arasında ters bir orantı bulunur. pH'nın azalmasıyla, hidrojen konsantrasyonu artarken oksidasyon hızı düşer. pH 5'in altındaki değerlerde oksidasyon pratik olarak gerçekleşmez ve pH 5,5'e kadar çok yavaş gerçekleşir. Sonuç olarak Fe^{+2} 'nin oksidasyon hızı pH'nın artması ile artar (Şekil 2.1) [Tünay, 2000].



Şekil 2.1. Çözelti pH'sı ve Fe^{+2} oksidasyon hızı arasındaki ilişki [Koby, 2001]

P_{O_2} 0,21 atm ve sıcaklık 20 °C iken bikarbonat ile tamponlanmış sularda Fe^{+2} oksidasyon reaksiyonunun % 90'ının tamamlanması için gerekli süre pH 6,9'da 43 dakika, pH 7,2'de ise 8 dakikadır. Katalizör yardımıyla oksidasyon hızı arttırılabilir. Reaksiyon hızını arttırmada kullanılabilecek katalizörler; Cu^{+2} , HPO_4^{-2} , H_3SiO_4 'dir. Fe^{+3} ile kompleks yapan maddeler de reaksiyon hızını artırıcı etki yapabilmektedir.

Sularda bulunan çözünmüş silis (H_4SiO_4) demir oksidasyonuna katalitik etki yapabilmektedir. Silis Fe^{+3} iyonlarını kompleks olarak bağlar ve çözeltide tutar. Su ortamında yüksek konsantrasyonlarda bulunan tanik ve humik asitler Fe^{+3} oksidasyonunu zorlaştırır. Koşullar stabil olduğunda reaksiyon hızı sıcaklıkla birlikte artar; bu artış her 15 °C'ye karşılık iki kat olarak gözlenmiştir [Çabuk, 2007].

Oksijen dışında iki değerlikli demirin oksitlenmesinde kullanılan başka ajanlar da vardır. Cl_2 ve hipoklorit en etkili oksitleyicilerdir. Ayrıca potasyum permanganat maddesi de demir oksidasyonu için kullanılan önemli bir kimyasaldır.

2.3. Ağır Metallerin Giderim Yöntemleri

Ağır metallerin gerek endüstriyel atık sularından ve gerekse ağır metal ile kirlenmiş/kirletilmiş çevresel su kaynaklarından uzaklaştırılmasında çeşitli kimyasal ve fiziksel süreçler kullanılmaktadır [Boysan, 2008]. Yöntem seçiminde metalin türü, suda bulunma şekli ve derişimi gibi faktörler önem taşımaktadır [Yılmaz, 2006]. Kimyasal çöktürme, kimyasal oksidasyon, kimyasal indirgenme, elektro-kimyasal yöntemler, buharlaştırma yoluyla geri kazanım, filtrasyon, iyon değıştirme, membran teknolojisi endüstriyel atık sularından ağır metalleri uzaklaştırmak için kullanılan bazı metodlardır [Gavrilescu, 2008]. Biyoteknolojik yöntemlerin gelişmesi ve çok daha verimli sonuçlar alınabilmesi sayesinde bu geleneksel yöntemlere yeni alternatifler oluşturulmuştur. Biyosorpsiyon ve adsorpsiyon yöntemleri ağır metal gideriminde en çok kullanılan biyoteknolojik yöntemlerdir. Bu yöntemleri, maliyetlerinin düşük olması ve kullanılacak materyal olanağının çok olması çekici kılmaktadır.

2.4. Mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar genellikle mikroskop altında görülebilen ve çoğunlukla tek hücreli olan canlılardır. Bu tanımına göre; bakteriler, mantarlar, arkealar, protistler ve algler mikroorganizmalar grubunda yer almaktadır. Biyoteknolojik uygulamalarla mikroorganizmalardan gıda üretiminde, atık arıtma sistemlerinde ve genetik mühendisliğine dayalı modern teknolojilerde yararlanılmaktadır.

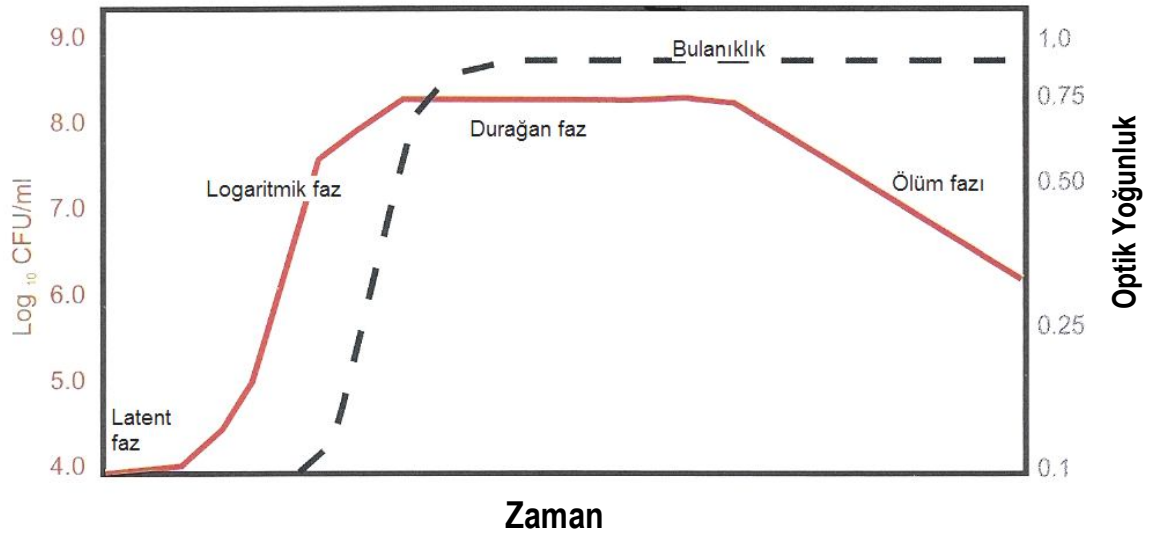
Mikroorganizmalar doğada, hava, su ve toprak ortamında, bazı gıda maddeleri içerisinde, yüksek yapılı canlıların deri yüzeyi ve bağırsak florasında bulunabilirler. Mikroorganizmaları canlılıklarının devam ettirilmesi, saf kültürlerinin elde edilmesi, biyolojik ve metabolik ürünlerinden yararlanılması gibi amaçlarla doğal ortamları dışında çoğaltmak mümkündür. Mikroorganizmalar, uygun besiyeri ve çevresel koşullar altında, türlerine özgü bir hızla ürerler. Koşulların uygunluğu devam ettiği sürece paralel olarak çoğalma da sürekli olur [Dursun ve ark., 2003]. Mikroorganizmaların büyümesine etki eden faktörlerden sıcaklık, pH, oksijen ihtiyacı gibi faktörler mikroorganizma türüne göre değışkenlik gösterir, her mikroorganizmanın belirli sıcaklık ve pH değeri bir gelişme

optimumu vardır [Scragg, 1991; Arda, 2000]. Optimal koşulların değişmesi (pH, osmotik basınç, oksijen, yüzey gerilimi, vs.) ve besiyerinde toksik metabolitlerin birikmesi, miktarı az olan besiyerinde üremeyi kısa bir süre sonra baskılar ve durdurur [Dursun ve ark., 2003].

Mikroorganizmalar mikroskobik derecede çok küçük olduklarından yüzey/hacim oranı çok yüksektir. Bu özellikleri nedeniyle hızlı büyürler, kısa ömürlüdürler ve her türlü çevre şartlarına çabuk uyum sağlarlar. Endüstriyel alanda kullanılabilecek çok değerli ve çeşitli ürünler sentezleyebilen mikroorganizmalar ideal biyolojik sistemlerdir [Boysan, 2008].

2.4.1. Mikroorganizmaların Büyüme Evreleri

Mikroorganizmaların büyüme evreleri lag faz (latent dönem veya alışma evresi), log faz (üreme dönemi, logaritmik veya eksponensiyel faz), durağan faz ve ölüm fazı olarak dört evreye ayrılır. Bu evreler Şekil 2.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Kesikli kültürde bakteriyel üreme eğrisi

A) Latent faz: Bu fazda yeni ortama alışmak için mikroorganizmalar yeni enzimler sentezlerler ve ortama alışmaya çalışırlar. Ortama alışamayan mikroorganizmaların ölmesi nedeniyle mikroorganizma sayısında azalmalar da görülebilir. Ortama adapte olanlar ve gerekli proteinleri sentezleyenler ise belirli bir alışma (latent) döneminden sonra bölünerek üremeye başlarlar. Bu dönemin uzunluğu veya kısalığı mikroorganizmaların türüne bağlı olmakla beraber, çevresel koşullara (pH, ısı, osmotik basınç, yüzey gerilimi, oksijen, vs.), besiyerinin bileşimine, ekilen mikroorganizmaların ilk alındığı kültürün yaşına da bağlıdır.

B) Üreme fazı (logaritmik faz): Latent fazı geçen mikroorganizmaların logaritmik bir hızla bölünerek çoğaldığı evredir. Mikroorganizmanın bölünmesi, biyokimyasal aktivite ile paralellik gösterir. Bu fazda fizyolojik olarak çok aktif olan mikroorganizmalar, fiziksel ve kimyasal etkenlere karşı çok duyarlıdırlar. Logaritmik fazın sonlarına doğru besin ve enerji kaynaklarının ortamda sınırlı olması nedeniyle mikroorganizmalar tarafından kullanılarak azalması, metabolik artıkların ve toksik maddelerin birikmesi, osmotik basıncın ve yüzey geriliminin değişmesi, oksijenin azalması, besiyerinde bulunan karbonhidratların fermente olarak ayrışması sonucu oluşan çeşitli organik asitlerin ortamın pH'sını düşürmesi gibi başlıca faktörler üremeyi olumsuz yönde etkiler ve bölünme hızı yavaşlar.

C) Durağan faz: Logaritmik fazın sonlarında oluşan olumsuz koşullar nedeniyle üreme giderek yavaşlar ve durma döneminde ölen hücre sayısı çoğalan hücre sayısına eşit hale gelir. Mikroorganizmaların popülasyonu bir süre sayıca değişmeden kalır ve sonra azalmaya başlar. Bu fazda bulunan tüm mikroorganizmalarda bölünme birden durmaz. Durağan döneminin uzunluğu veya kısalığı, besiyerinin miktarı ve bileşimi, üreyen mikroorganizmaların türü ve çevresel koşullara göre değişiklik gösterebilir.

D) Ölüm fazı: Durma devresi değişmedikçe, mikroorganizmalar uygun olmayan koşullar altında ölmeye başlarlar ve ölen hücrelerin sayısı çoğalan hücrelerin sayısını aşar. Ancak, bütün mikroorganizmalar ölmeyebilirler. Bazıları canlılıklarını koruyabilir. Bu nedenle de canlılık eğrisi sıfıra ulaşmaz.

Katı ortamda ekilen mikroorganizmalar, sıvı besi yerlerine oranla daha sınırlı bir üreme şansına sahiptirler. Genellikle katı besiyerine ekilen mikroorganizmalar, koloniler

oluşmaya başladıktan sonra büyüme ve üreme açısından olumsuz yönde etkilenirler. Kolonilerin rengi, kokusu, yapısı, şekli, büyüklüğü, parlaklığı, besi yerine yapışma durumu, hemoliz yapma özelliği ve diğer karakterleri farklılıklar gösterir ve bu özellikler, mikroorganizmaların cinslerine, türlerine, besiyerlerine ve çevresel koşullara göre değişebilir [Dursun ve ark., 2003].

2.4.2 Mikroorganizmaların Ağır Metal Gideriminde Kullanılması

Hem canlı hem de ölü mikroorganizmalar metalleri tutma özelliğine sahiptirler. Algler, mayalar, mantarlar ve bakteriler, yapıları yüzeylerinde ağır metal adsorplayabilme yeteneği olan mikrobiyal türlerden bazılarıdır. Düşük pH’larda biyoarıtım sağlayabilmek için en sık kullanılan biyokütle türleri arasında bakteriler bulunmaktadır. Canlı veya ölü birçok mikrobiyal hücre türü metallerin hem çözünen hem de katı hali için etkin birer biyoakümülatördürler. Metal toplayıcı biyoprosesler, ölü biyoküteller tarafından tutunma ile ya da yaşayan hücrelerin biyoakümülasyonu ile gerçekleşebilmektedir [Cossich et al, 2003; Kratochvil et al, 1998]. Mikroorganizmaların hücre yüzeyi anyonik yapılar nedeniyle negatif yüklüdür ve bu nedenle metal katyonlarını bağlama yeteneğine sahiptirler. Çeşitli mikrobiyal türlerin atıklarda bulunan metal iyonlarının biyosorpsiyonunda oldukça verimli oldukları gözlemlenmiştir. Mantarlar, mayalar, yosunlar, algler ve bakteriler gibi pek çok mikrobiyal türün yüksek miktarlarda ağır metal biriktirebildikleri bilinmektedir. Ağır metal gideriminde kullanılan canlı ve ölü biyoküteller (mikroorganizma, bitki vs.) biyosorbent veya adsorbent terimi ile ifade edilirler. Bakterilerin yüzey / hacim oranlarının yüksek olması nedeniyle çok iyi biyosorbentler olduğu ileri sürülmektedir [Beveridge et al., 1989; Nuzhat et al., 2001; Maier et al., 2000].

Literatürde ağır metal iyonlarının adsorbsiyonunda mikroorganizmaların kullanılması ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır. İlk çalışmalar Polikarpov (1966) tarafından gerçekleştirilen radyoaktif elementlerin sulu ortamda mikroorganizmalar tarafından doğrudan adsorblanabildiğini göstermesi ile başlamıştır. Polikarpov, mikroorganizmaların bu özelliğinin yaşam fonksiyonlarından bağımsız olduğunu iddia etmiştir. Zajic ve Chiu (1972), yaptıkları çalışmalarda, uranyum giderebilen bir fungal kültürü atıktan izole etmeyi başarmıştır. Beveridge ve Murray (1980), *Bacillus Subtilis*’in saf hücre duvarını

yüksek atom numaralı elementleri adsorpladığını ve adsorplanan elementlerin geri kazanılabileceğini göstermiştir. Thezos ve Volesky (1981), uranyum ve toryum adsorpsiyonunda değişik türde mikroorganizmalar kullanılarak, farklı sıcaklık ve pH değerlerinde adsorpsiyon izotermi çıkarmış, sonuçları aktif karbon ve iyon değiştirici reçineler ile yapılan adsorpsiyon çalışmalarıyla karşılaştırılmış ve mikroorganizmaların daha etkin adsorptif özelliklere sahip olduklarını kanıtlamışlardır.

2.5. Adsorpsiyon

Adsorpsiyon, akışkan fazda çözünmüş haldeki belirli bileşenlerin (iyon yada molekül) bir katı adsorban (adsorbent) yüzeyine tutunması olayıdır [Tsezos ve Volesky, 1981]. Adsorpsiyon işleminde adsorplanan türlere yani yüzeye tutunan maddelere adsorbant denir. Yüzeyinde adsorpsiyon gerçekleşen madde ise adsorplayıcı, yani adsorbenttir. Diğer bir anlamıyla tutan maddedir. Yüzeye tutunan taneciklerin yüzeyden ayrılması olayı desorpsiyon olarak adlandırılır. Adsorpsiyon işleminin ilerleyişi, adsorbant ve adsorbentin etkileşimine ve oluşturdıkları sistemin özelliklerine bağlıdır. Adsorpsiyon olayı sabit sıcaklık ve sabit basınçta kendiliğinden gerçekleştiği için, adsorpsiyon sırasındaki serbest entalpi değişimi daima negatif işaretlidir. Diğer taraftan, gaz yada sıvı ortamında daha düzensiz olan tanecikler katı yüzeyinde tutunarak daha düzenli hale geldiğinden, adsorpsiyon sırasındaki entropi değişimi de daima negatiftir [Akpınar, 1998].

Farklı kimyasal yapıdaki maddeler farklı adsorpsiyon özellikleri gösterirler [Yılmaz, 2006]. Adsorplanan madde yüzeyi ile adsorplanan kimyasal arasındaki çekim kuvvetlerine bağlı olarak gerçekleşen üç çeşit adsorpsiyon işlemi tanımlanmaktadır [Brady ve Duncan, 1994]:

- Fiziksel Adsorpsiyon: Katı yüzey ile adsorplanan madde molekülleri arasındaki çekim kuvvetleri sonucu oluşan adsorpsiyon olayıdır. Fiziksel adsorpsiyonda yüzeye tutunmayı zayıf Vander Waals kuvvetleri sağlar. Bu adsorpsiyon türü, katı yüzey ile adsorplanan madde molekülleri arasındaki çekim kuvvetlerinin etkisiyle gerçekleşir. Adsorbent katının kristal örgüsü içine girmez ve çözünmez fakat yüzeyi tamamen kaplar. Düşük sıcaklık aralığında oluşabildiği gibi çok tabakalı ve

rejenerasyonu kolay bir adsorpsiyon türüdür. Adsorpsiyon sonucu, ekzotermik olarak yoğunlaşma enerjisinden biraz fazla ısı açığa çıkar. Aktivasyon enerjisi düşük, bağlar tersinir ve zayıftır.

- Kimyasal Adsorpsiyon: Adsorplanan madde ile katı yüzey arasındaki fonksiyonel grupların kimyasal etkileşimi veya kimyasal bağ oluşumu ile görülen adsorpsiyon tipidir. Kimyasal adsorpsiyon, tersinmez ve tek tabakalı olup genellikle yüksek sıcaklık aralığında gerçekleşir, ayrıca rejenerasyonu da oldukça zordur. Adsorpsiyon sırasında açığa çıkan ısı, reaksiyon ısısından daha büyüktür ve aktivasyon enerjisi de yüksektir.
- İyonik Adsorpsiyon: Elektrostatik çekim kuvvetlerinin etkisiyle, yüzeydeki yüklü bölgelere iyonik özelliklere sahip adsorbantların tutunması olarak tanımlanabilir. Burada adsorplayan ile adsorplananın iyonik güçleri ve moleküler büyüklükleri önemlidir. İyonlar eş yüklü ise daha küçük hacme sahip olan iyon tercih edilerek yüzeye tutulur [Akpınar, 1998].

Fiziksel, kimyasal ve iyonik adsorpsiyon arasında kesin bir ayrım yapılamaz, üçü aynı anda veya ardarda görülebilir. Adsorpsiyonu pH, sıcaklık, yüzey alanı, çözünen maddenin cinsi ve özellikleri gibi parametreler etkilemektedir.

Bu üç faktörü açıklayacak olursak;

- pH: Hidronyum ve hidroksil iyonları kuvvetle adsorbe olduklarından, diğer iyonların adsorpsiyonu çözelti pH'sından etkilenir. Ayrıca asidik veya bazik bileşiklerin iyonizasyon dereceleri de adsorpsiyonu etkiler.
- Sıcaklık: Adsorpsiyon işlemi genellikle ısı veren bir tepkime biçiminde gerçekleşir. Bu nedenle azalan sıcaklık ile adsorpsiyon büyüklüğü artar. Açığa çıkan ısıнын genellikle fiziksel adsorpsiyonda yoğunlaşma veya kristalizasyon ısıları safhasında, kimyasal adsorpsiyonda ise kimyasal reaksiyon ısısı safhasında olduğu bilinmektedir.
- Yüzey alanı: Adsorpsiyon bir yüzey işlemi olduğundan, adsorpsiyon büyüklüğü spesifik yüzey alanı ile orantılıdır. Adsorplayıcının partikül boyutunun küçük, yüzey alanının geniş ve gözenekli yapıda olması adsorpsiyonu artırır.

2.6. Biyosorpsiyon

Biyosorpsiyon, çeşitli bileşenlerin (organik, inorganik, metal iyonu, vb.) biyolojik kökenli malzemeler tarafından (biyokütle, biyopolimer vb.) ortam pH'sına bağlı olarak aktif yada pasif alınımı olarak tanımlanır. Pasif alınımla, biyosorbent yüzeyindeki aktif merkezlere yüzey adsorpsiyonu, kompleks ve şelat oluşumu gibi mekanizmalarla gerçekleşirken, aktif alınımla kirleticinin hücre içine alınmasıdır ve kovalent bağ oluşumu, yüzey çöktürme, redoks reaksiyonları, hücre zarında sitoplazmaya taşınım ve sitoplazmadaki protein, lipid gibi yapılara bağlanma şeklinde olur [Lale ve ark., 2005].

Atıksuların toksik metallerden arındırılmasında biyosorpsiyon yeni bir yöntemdir. Biyosorpsiyon yöntemi, ısısal veya kimyasal yöntemlerle öldürülmüş mikroorganizmalar kullanılarak da yapılabilir. Biyosorpsiyon, biyolojik materyallerin sulu çözeltilerdeki atık maddeleri hücre yüzeyi veya içinde biriktirmesidir. Bakteriler, algler, mantarlar, küfler ve benzer canlılar biyolojik materyal olarak kullanılmaktadır. Metal biyosorpsiyonunda kullanılacak biyokütller seçilirken dikkat edilmesi gereken en önemli etken biyokütlenin kökenidir.

Bilindiği gibi endüstriyel atık sular çok sayıda ağır metal iyonunu ve organik kirleticiyi bir arada içermektedir. Literatürde çoklu metal iyonu karışımıyla ilgili çok sayıda biyosorpsiyon çalışması bulunmasına karşın, organik kirletici ve metal iyonu bir arada içeren atıksuların biyosorpsiyonla arıtımı üzerine araştırmalar oldukça yenidir.

Mikroorganizmalar adsorpsiyon işleminde adsorbent görevi görürler ve biyosorbent adını alırlar. Aktif çamur en yaygın kullanım alanına sahip biyosorbentlerdendir. Mikroorganizmanın ve adsorplanan bileşenin türü, mikroorganizmanın yüzey özellikleri ve yapısındaki bileşenler biyosorpsiyonu etkileyen parametrelerdendir. Ayrıca adsorpsiyonu etkileyen bütün parametreler biyosorpsiyonu da etkilemektedir [Pekin, 1983; Wu et al., 1999].

2.6.1. Mikroorganizmalarla Ağır Metal Adsorplanma Mekanizması

Mikroorganizmalarla metal adsorbsiyon kinetiği iki basamaktan oluşur. Birinci basamak organizma yüzeyinde fiziksel adsorbsiyon veya iyon değişimidir. Bu basamağa genellikle pasif giderim denir. Bu basamak çok hızlıdır ve mikroorganizma metal ile etkileştikten kısa bir süre sonra denge oluşur. Hızlı giderme genellikle yüzey adsorbsiyonu sonucudur [Tsezos ve Volesky, 1981]. Metal alımında ikinci basamak, metal iyonlarının hücre zarından içeri taşınımını da içeren, metabolik aktiviteye bağlı, daha yavaş, hücre içi giderim basamağıdır ve bu basamak aktif giderim adını alır.

Mikroorganizmaların, sulu ortamda hücre yüzeyine metal adsorplanmasını açıklamaya çalışan çeşitli hipotezler ileri sürülmektedir ve bu hipotezlerin birkaçının açıklamasını maddeler halinde belirtecek olursak;

- Metal iyonları hücre yüzeyindeki negatif yüklü reaksiyon alanları ile kompleks oluşturarak veya pozitif yüklü reaksiyon alanları ile yer değiştirerek adsorblanabilir. Bu olaya iyonik adsorbsiyon adı da verilir. Hücre duvarındaki polisakkaritler, sülfat, amino ve karboksil grupları sayesinde iyon değiştirme özelliğine sahiptirler. Çift değerlikli metal iyonları, polisakkaritlerin aynı yüklü iyonlarıyla yer değiştirir [Norberg ve Persson, 1984].
- Bazı mikroorganizmaların hücrelerinin dış zarlarından uzanan polimerler sentezleyebildikleri, bu polimerlerin çözültiden metal iyonlarını bağlayabilme yeteneğine sahip oldukları çeşitli çalışmalarda belirlenmiştir [Sağ ve Kutsal, 1995; Macaskie ve Dean, 1984].
- Hücre duvarındaki proteinler metali bağlamak üzere aktif bölgeler oluştururlar. Ağır metallerin proteinlere karşı kuvvetli ilgisi vardır. Proteinlerin peptid bağlarının azot ve oksijeni, hidroksil, amino, fosfat gibi grupları, iyonların metal iyonları ile yer değiştirmesi için uygundur [Norberg ve Persson, 1984]. Amfolit karakterde olan proteinlerinde, molekülün türüne göre belirli bir izoelektrik pH'sı vardır. Pozitif yüklü metal iyonlarının izoelektrik noktanın altında katyonik bir karakter taşıyan protein moleküllerinin içerdiği grupların aynı yüklü iyonlarıyla yer değiştirdikleri, izoelektrik noktanın üstündeki pH'larda ise negatif yüklü reaksiyon alanlarıyla kompleksler oluşturarak adsorblandıkları düşünülebilir

[Macaskie ve Dean, 1984]. Dolayısıyla ortam pH'ının ağır metal adsorbsiyonunda etkin bir parametre olması öngörülebilir.

- Bazı mikroorganizmaların yüzeylerinde yüksek molekül ağırlıklı polifosfatlar veya kimyasal olarak bunlara benzeyen gruplar, metali kompleksleri şeklinde kendilerine bağlarlar. Örneğin *Citrobacter cp.* hücrelerinde bulunan organik fosfattan, inorganik fosfatı serbest bırakan fosfataz enzimi ağır metalin, hücreye bağlı metal fosfat olarak çökmesini sağlar [Macaskie ve Dean, 1987; Yalcuk, 1999].

Ağır metal adsorpsiyonunda canlı hücreler kullanılmasının sağladığı yararlar aşağıda belirtilmiştir;

- Metal hücrelerin içinde toplandığından sabit bir konumdadır ve pH değişimine daha az duyarlıdır.
- Bu yöntem kuvvetli bağlanmış kompleksler halinde metallerin artımında özellikle tercih edilir.
- Metabolik aktivite, metalin değerliğini değiştirmede veya organik maddelerle kompleks oluşturmuş metalleri gidermede etkili olabilir [İleri ve ark., 1993].
- Canlı hücreler kullanılması halinde adsorbsiyonda etkili olan zinciri geliştirmek ya da metalin zehirli etkisini tolere edebilmek için genetik müdahale potansiyeli vardır.

Canlı hücrelerle çalışmanın tercih edilmeyen yönleri aşağıdaki gibi sıralanabilir [Tsezos ve Volesky, 1981];

- Ağır metallerin zehirlilik etkileri nedeniyle düşük metal konsantrasyonlarında çalışılması gereklidir.
- Besin ortamı bileşenlerine gereksinim duyulur.
- Tüketilmeyen besin ortamı bileşenleri de dış atımda yer alır.
- Sistem tanımlanamadığı için matematiksel modellemesinin güç olmasıdır.

Literatürde bugüne kadar yapılan araştırmalar göstermektedir ki kullanılan mikroorganizmanın hücre tipi ve hücrenin içerdiği temel bileşenler metal adsorpsiyonun mekanizmasını belirlemektedirler.

2.6.2. Mikroorganizmalarda Metal Toksisitesi ve Mikrobiyal Direnç Mekanizmaları

Bazı metaller mikrobiyal hücrelerin temel bileşeni ve metabolik faaliyetlerini sürdürebilmeleri için gerekli olmasına rağmen çok yüksek konsantrasyonlarda toksik etki gösterebilirler. Toksisite, protein ve nükleik asitler gibi reaktif sülfidril, karboksil ya da fosfat grupları içeren ligandlara metalin bağlanması sonucu oluşabilir. Mikroorganizmalarda protein, hücre zarı veya DNA gibi yaşamsal önemi olan yapılarda metalin bağlanması sonucu bozulmalar oluşabilir ve mikrobiyal hücrenin metabolik faaliyetleri yavaşlayabilir. Bu şekilde oluşabilen metal toksisitesine dirençli mikroorganizmalar yüksek metal konsantrasyonlarında yaşamlarını devam ettirebilirler. Metal toksisitesine yenik düşmemek için mikroorganizmaların geliştirdiği bu mekanizma onların detoksifikasyon yeteneğidir [Maier et al, 2000].

Mikroorganizmaların metal dirençliliği ve detoksifikasyon için geliştirdiği mekanizmaları aşağıdaki gibi sıralayabiliriz;

- Egzopolimerler: Bazı mikroorganizmalar metallere bağlanabilen egzopolimerler üreterek metal sekuestrasyonu olarak bilinen işlemi gerçekleştirirler.
- Ekstrahüresel yapılar: Bu yapılara metal bağlanması hücreye girmelerine engel olur.
- Fosforil ve fosfolipidler: Hücre yüzeyindeki fosfat içeren yapılar detoksifikasyon olayının gerçekleşmesini sağlarlar.
- Sidrofor: Metallerle kompleks oluşturan ikinci önemli ekstrahüresel moleküldür. Sidrofor demir molekülüne bağlanarak çözünmüş demir konsantrasyonunu düşürür ve demirin toksisitesini azaltmış olur. Farklı metallere bağlanabilen sidrofor molekülleri vardır. Siyanobakteriler de bakır toksisitesini engelleyen sidrofor molekülleri üretirler.
- Biyosurfaktanlar: Mikroorganizmalar tarafından üretilen ve kirlilik yaratan zararlı atıkların suda çözünmesine yardımcı olan biyolojik maddelerdir.
- Sümüksü tabaka: Hücrelerin dış yüzeylerini saran sümüksü tabaka metalin hücre içine girmesine engel olur.

Ağır metallerin mikroorganizmalara olan toksisiteleri mikrobiyolojik ve çevresel faktörlerin etkisi altındadır. Ağır metallerin organik maddelere bağlanması, çökmesi, kompleksleşmesi ve iyonik etkiler metallerin toksisitesini etkileyen faktörlerdir [Brady ve Duncan, 1994].

2.6.3 Demir Gideriminde Mikroorganizmaların Kullanımı

Literatürde demirin mikroorganizmalar kullanılarak oksitlemesinin yanı sıra organiklerin oksidasyonunun sağlanabilmesi için mikroorganizmalar kullanılarak demir indirgenmesi üzerinde de birçok çalışma yapılmıştır. 19. yüzyıldan beri, Fe(III) indirgenmesinin doğal çevrede enzimatik olmayan prosesler sonucunda gerçekleştiği düşünülmektedir. Çünkü o dönemlerde bir elektron alıcısı olarak Fe(III) ile organik maddenin tamamen karbon dioksit oksitlenmesinde gerekli enerjinin mikroorganizmalardan sağlandığı bilinmiyordu. Günümüzde birçok mikroorganizmanın Fe(III)'ün enzimatik indirgenmesinde aktif rol oynadığı bilinmektedir. Şimdiye kadar izole edilen ve demiri indirgeyebilen mikroorganizma türleri arasında *Pseudomonas* sp.; *Shewanella putrefaciens*; BrY; *Geobacter metallireducens*; *Desulfuromonas acetoxidans*; *Desulfovibrio* sp.; *Basillus* sp. türleri sayılabilir [Lee et al., 1998].

Demirin indirgenmesi veya oksitlenmesi endüstriyel proseslerde ihtiyaç duyulan bir işlem olmasına rağmen ortaya çıkan demir yüksek konsantrasyonlarda olduğu zaman çevre kirliliği yaratmaktadır. Pek çok araştırmacı ferrous demirin maden çıkış sularından biyolojik olarak arıtımı için geniş kapsamlı çalışmalarda bulunmuşlardır [Nemati et al., 1998; Nemati ve Webb, 1999; Mesa et al., 2002]. Ancak, pH 2,0 civarındaki asidik çözeltiler içerisinde, ferrous demirin maden çıkış sularındaki konsantrasyon aralığı kg/m^3 derecesindedir (içilebilir durumdaki sudaki demir miktarı g/m^3 cinsinden değerlendirilir). Ferrous demirin maden çıkış suları deşarjından arıtımı ve hidrometalurjik prosesler ile ilgili sayısız referans olmasına rağmen, ferrous demirin yer altı suyundan arıtımı ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Fiziko-kimyasal ve biyolojik demir oksidasyonunu birleştiren sistemler de birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Ancak, sadece birkaç çalışma içerisinde biyolojik demir oksidasyonunun toplam demir oksidasyonuna oranı hakkında veri vardır, içme suyundan demirin arıtımı için kullanılan bakteriler ile ilgili kinetik veri ise yoktur [Dimitrakos- Michalakos et al., 1997; Sogaard et al., 2000;

Mouchet, 1992]. Bunun en önemli nedenlerinden biri endüstriyel proseslerle karşılaştırıldığında yeraltı sularında bulunan düşük seviyelerdeki demirin basit bir havalandırma sistemiyle giderilebilmesi ve çökelme ile su ortamından ayrılabilmesidir.

Biyolojik demir arıtımının giderim hızını artırdığı bilinmektedir [Mouchet, 1992]. Buna rağmen demir gideriminde biyolojik sistemlerin kullanımının uygulanabilmesi için bir protokol geliştirilmemiştir. Demir oksidasyonunu artırmak amacıyla birkaç reaktör tasarımı denenmiştir. Bunlar döner biyolojik kontaktörler, akışkan yataklı reaktörler ve dolgu yataklı reaktörlerdir. Tekerlekopoulou ve arkadaşları (2006), içme sularından fizikokimyasal ve biyolojik yöntemlerle demir arıtımı için damlatmalı filtre kullanmışlar ve aşılama karışık kültür kullanımının demir oksidasyonunu artırdığını saptamışlardır. Bu çalışmada destek materyalinin yüzeyinde biyofilm gelişiminin demir oksidasyonunu artırdığı ve demir oksidasyonu için gereken filtre derinliğini önemli derecede azalttığı görülmüştür. Giriş suyundaki demir miktarındaki artışın filtre verimini etkilemediği ancak volumetrik akış hızındaki artışın filtrenin verimini düşürdüğü gösterilmiştir [Tekerlekopoulou et al., 2006].

2005 yılında Pacini ve arkadaşları yer altı sularındaki demir ve mangan giderimi için kullanılan pürüzlü filtre sisteminin biyolojik prosesin performansı üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Bu sistemin demir ve mangan gideriminde % 85 - % 95 verimlilik sağladığını rapor etmişlerdir [Pacini et al., 2005].

Demir gideriminde mikroorganizmaların kullanımı ile ilgili ilk çalışma Türkiye’de Aksu ve Kutsal (1990) tarafından yapılmış ve çalışmalarda mikroorganizma olarak yeşil alglerden *Chlorella vulgaris* kullanılmıştır. Fe^{+2} , Cu^{+2} , Pb^{+2} , Zn^{+2} ve Cr^{+2} iyonlarının akışkan yatak reaktörde ve kesikli karıştırmalı kapta incelenerek, sonuçların adsorpsiyon izotermine uygunluğu gösterilmiştir ve alglerin yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahip olduğu kanıtlanmıştır [Aksu ve Kutsal, 1990].

Mikroorganizmaların demir gideriminde kullanımlarına verilebilecek bir diğer örnek de bir mantar türü olan *Aspergillus niger*’ın kaolinde bulunan oksitlenmiş demirin biyoliçinde kullanılmasıdır. Kaolin porselen ve seramik yapımında kullanılan değerli bir kil olmasına rağmen demir oksit bileşenleri içerdiğinde rengi koyulaşmakta ve endüstriyel kullanımı düşmektedir. *A. niger* kaolindeki demir içeren safsızlıkların arıtımında

kullanılabilecek oksalik asit olmak üzere çeşitli organik asitler üretmektedir. Bu proses endüstriyel uygulamalar için önemli bir faktör olan kaolinin beyazlatılmasını sağlamaktadır [Cameselle et al., 2002].

Literatürde demir giderimine ilişkin yapılan biyogiderim çalışmaları genellikle manganın giderimini de içermektedir. Bunun nedeni demiri oksitleyen bakterilerin manganı da oksitleyebilmesi veya bu iki ayrı bakteri grubunun aynı ortamlarda kolonize olabilesidir. Demir ve mangan yeraltısularında bulunduğu estetik, organoleptik ve işletim problemlerine neden olur. Demir ve mangan su sistemlerinde dezenfeksiyon işleminde kullanılan kloru tüketmelerinin yanısıra biyofouling ve mikrobiyolojik nedenlerden kaynaklanan korozyonu tetiklerler. Yeraltısularında, demir ve mangan demir(II) ve mangan(II) olarak bulunur. Bu iki elementin giderim prosesleri fizikokimyasal veya biyolojik temellidir. Konvansiyonel fizikokimyasal prosesler ile biyolojik demir ve mangan giderimi karşılaştırıldığında, biyolojik proseslerin avantajları şu şekilde özetlenebilir; kimyasal kullanımı olmaması, yüksek filtrasyon hızı, doğrudan filtrasyon kullanım olanağı, düşük operasyon ve bakım maliyetleri [Mouchet, 1992].

Demir ve manganın biyolojik giderimi Fe-Mn okside eden bakterilerin kolonizasyonu ile oluşan biyofiltrasyon yatakları sayesinde gerçekleşir. Doğada demir okside eden bakteriler (IOB) ve mangan okside eden bakteriler (MnOB) yaygın bir şekilde bulunurlar. Yeraltısularında, bataklıklarda, gölcüklerde ve göllerin hipolimniyon tabakasında, sedimentlerde, toprak, kuyu ve su dağıtım sistemlerinde miktarları fazladır. Zaman geçtikçe bu bakteriler önemli ölçüde tıkanıklık problemlerine neden olabilirler [Ghiorse, 1984].

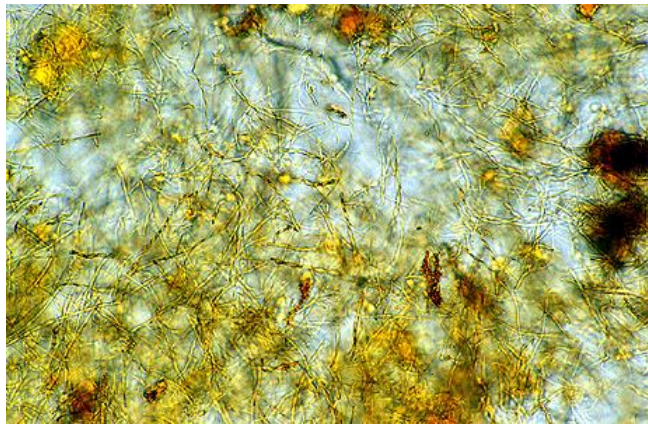
İşlenmemiş suda bulunan demir okside eden bakteriler ve mangan okside eden bakteriler uygun koşullar altında kum filtresinde üreyebilirler ve iki değerlikli demiri ve manganı okside edip demir(III) ve mangan(IV) formlarına dönüştürerek çökmelerine neden olurlar. 18. yüzyılın sonlarından beri çalışılmakta olan demir ve mangan okside eden bakteriler hücre dışı yapılarında demir hidroksit veya mangan oksit biriktirdikleri için fark edilmişlerdir. Pek çok araştırmacı bu mikroorganizmaların fizyolojisini, demir ve mangan giderim mekanizmalarını incelemişlerdir [Ghiorse, 1984; Hallbeck ve Pedersen, 1991; Corstjens et al., 1992; Sogaard et al., 2000]. Bununla beraber, pek çok açıdan demir

ve mangan birikimi hala çok az anlaşılmıştır. Başlıca demir okside eden bakteri grupları şöyledir [Czekalla et al., 1985; Mouchet, 1992];

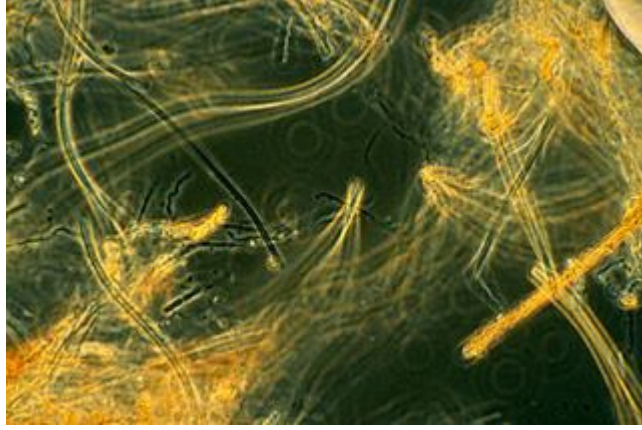
- Saplı (stalked) bakteriler; örneğin kemolitotrofik ve mikroaerofilik *Gallionella* sp.,
- Kılıflı bakteriler, örneğin fakültatif ototrofik-heterotrofik *Leptothrix* sp., *Sphaerotilus* sp. (Şekil 2.7, *Sphaerotilus natans*)
- Tek hücreli bakteriler, örneğin heterotrofik ve mikroskobik incelemede diğer türlere kıyasla daha zor tanınan *Siderocapsa*, *Siderocystis* ve diğerleri.

Sadece demiri okside eden saplı bakterilerin (*Gallionella*) haricinde, mangan okside eden grupların büyük bölümünün demir okside eden bakterileri de içerdiği rapor edilmiştir. Bu cinslerin bazı türleri, *Leptothrix*, *Crenothrix*, *Hyphomicrobium*, *Siderocapsa*, *Siderocystis* ve *Metallogenium*, demir veya manganı bağımsız bir şekilde okside edebilirler [Mouchet, 1992]. Demir okside eden bakteriler pH'ya bağlı olarak tamamiyle aerobik veya mikroaerofilik olabilirler [Mouchet, 1992; Gislette ve Mouchet, 1997]. Günümüzde, demir ve mangan artımında biyolojik prosesler Avrupa'da yaygın olarak kullanılmaktadır, ayrıca Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada'da da bazı arıtım tesisleri mevcuttur [Mouchet, 1995].

Demir oksidasyonu yapan bakterilerden *Gallionella* (Şekil 2.3) ve *Leptothrix* (Şekil 2.4)'in mikroskopik görüntüleri aşağıda gösterilmiştir [<http://images.google.com.tr/imgres.imgurl=http://faculty.plattsburgh.edu/jose.deondarza/MicroWorld/Bugs.jpg>].



Şekil 2.3. Demir oksidasyonu yapan *Gallionella* bakterisinin görüntüsü



Şekil 2.4. Demir oksidasyonu yapan *Leptothrix* bakterisinin görüntüsü

Yukarıda mikroskopik görüntüleri verilen bakteriler filamentsi değişik yapılar oluşturmaktadır. Metalleri veya sülfürlü bileşikleri elektron alıcısı veya enerji kaynağı olarak kullanan bakterilerin bazılarında filament oluşumu gözlenmektedir.

Bakterilerde filament oluşumu genellikle zor çevresel koşullara karşı bir defans mekanizmasıdır [Hanh ve ark. 1999]. Filamentli bakterilerin hacimlerine göre yüzeyleri fazladır. Bu nedenle, düşük oksijen seviyeleri ve düşük besin maddesi konsantrasyonlarında yaşayabilirler. Bu tür bakterilerin, zor çevresel şartlara ve yüksek sülfürlü madde konsantrasyonlarına dayanabilme kapasiteleri de fazladır [Kırlı, 2001].

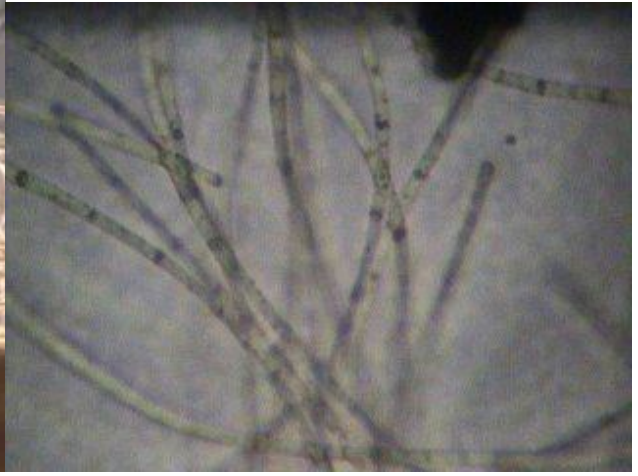
Filament yapıya sahip bakterilere örnek olarak *Desulfonema limicola*, *Beggiota*, *Sphaerotilus natans*, *Thiothrix I* ve Tür 021N verilebilir. Şekil 2.5'te mikroskopik görüntüsü verilmiş olan *D. limicola* sülfat indirgeyen bakteri grubuna ait bir bakteri türüdür. Şekil 2.6'da filament yapısı görülen *Beggiota* ise H_2S oksidasyonu yaparak sülfür granüllerini hücre içinde depolar.



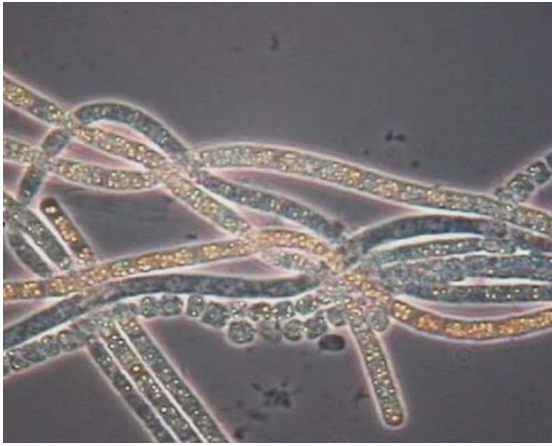
Şekil 2.5. *Desulfonema limicola* bakterisinin mikroskopik görüntüsü [Hann et al., 1999]



-A-



-B-

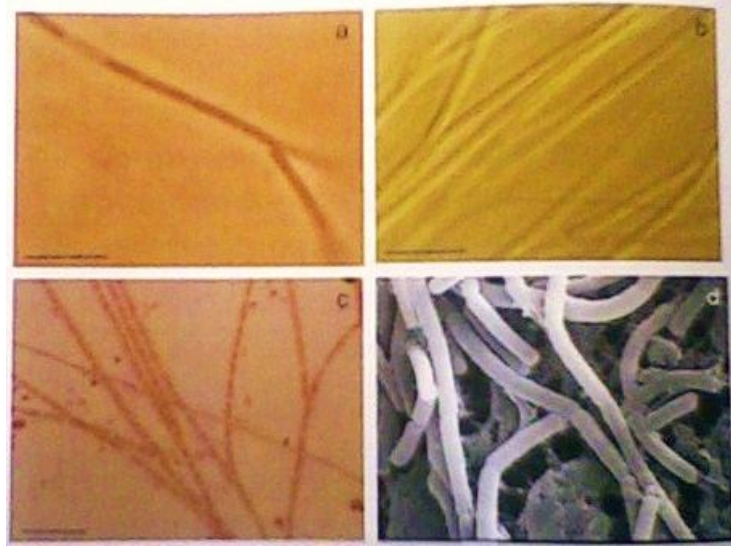


-C-

Şekil 2.6. *Beggiota* bakterisinin filament yapıları (A), (B) ve (C)

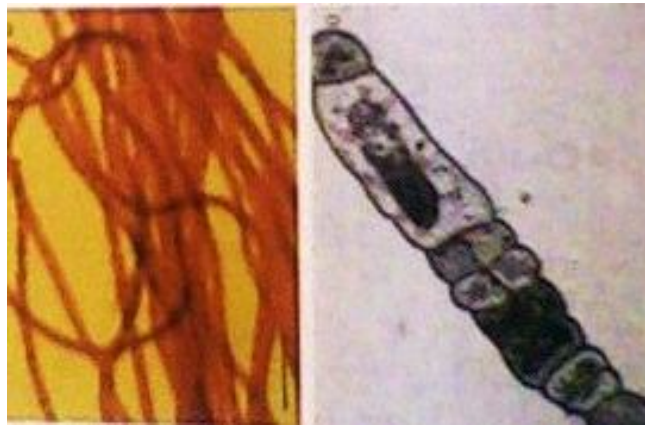
Filamentli diğer bir bakteri türü olan *Sphaerotilus natans* çubuk dikdörtgen şeklinde, sık ve dar aralıklı boğumlar oluşturur (Şekil 2.7). *Sphaerotilus natans* türü yeterli derecede azot veya oksijen bulunan ortamda polihidroksibütirat (PHB) maddesini

granüller halinde biriktirebilen bir mikroorganizmadır [Seviour, 1999]. *Sphaerotilus natans* diğer kılıflı bakteriler gibi (örneğin *Leptothrix*) 16S rRNA dizisinin temelinde Proteobakterilerin β alt grubuna ait bir türdür [Corstjens ve Muyzer, 1993].



Şekil 2.7. *Sphaerotilus natans* türünün mikroskoptaki görüntüleri [Seviour, 1999]

Şekil 2.8’de görülen Tür *021N* filament oluşturan bakteri çubuk veya disk şeklinde hücrelere sahip olan kemoheterotrof bir bakteridir. Nadiren sülfür granülleri ve PHB granülleri oluşturduğu görülür. Geniş bir substrat çeşitliliğinden beslenebilir. Alışılmadık üstün yapı ve hücrelerinde tamamlanmamış bölümler gözlenebilir. 16S rRNA dizi verileri farklı bölgelerden elde edilen *021N* izolatlarının filogenetik çeşitliliği hakkında fikir verir [Seviour, 1999].



Şekil 2.8. Tür *021N* bakterisinin filament görüntüleri [Seviour, 1999]

Filament oluşturan bir bakteri olan *Thiothrix I* türü kemootorofik bir mikroorganizmadır. *Thiothrix I* sülfürü granülleri içerisinde depolar. Şekil 2.9'daki resimde *Thiothrix I* türünün düzenli geniş hücre yapılarında koyu renkte sülfür granülleri gözlenmektedir [Seviour, 1999].



Şekil 2.9. *Thiothrix I* bakterisinin filament görüntüleri [Seviour, 1999]

2.7. Anaerobik ve Aerobik arıtım

Aerobik arıtma sistemleri enerji maliyetlerinin hızla artmaya başladığı 1970'li yıllara kadar atıksu arıtımında en çok kullanılan sistemlerdi. Artan enerji maliyetleri, mevcut arıtma sistemlerinin yatırım ve işletme giderleri bakımından yeniden incelenmesini gündeme getirmiş ve böylece anaerobik arıtma sistemleri geliştirilmiştir. Anaerobik arıtım, organik atıkların oksijensiz ortamda biyolojik süreçlerle parçalanmak suretiyle, CH_4 , CO_2 , NH_3 ve H_2S gibi son ürünlere dönüştürülmesi olarak tanımlanmaktadır. Yakın zamana kadar sadece biyolojik arıtma çamurlarının çürütülmesinde uygulanan havasız arıtma süreci, son yıllarda endüstriyel ve evsel atıksuların arıtılmasında da yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır [Öztürk, 1999].

Demir, toprak ve kayalar içerisinde Fe_2O_3 ve FeS_2 (pirit) gibi çözünmez +3 değerlikli demir bileşikleri halindedir. Anaerobik şartlar altında +2 yükseltgenme basamağına indirgenebilir. Yer altında demir içeren sular hava ile temas ettiklerinde bulanık, renkli bir hal alır. Yeraltı suları oksijen oranı az, karbondioksit oranı fazla olduğundan fazla

miktarda demir ihtiva ederler. Bazı jeolojik yapılar demiri, demir karbonat (siderit) halinde bulundurabilir. Sideritin sudaki çözünürlüğü normal şartlar altında çok az olmasına rağmen yer altı suyunun taşıdığı CO_2 , sideriti kolayca çözer ve bikarbonatlara dönüştürür. Fe^{+2} iyonlarının çözünerek su ortamına karışması, iyi kalite su veren ve düşük konsantrasyonlarda Fe^{+2} içeren kuyuların çevresine organik atıklar yığılması ve toprakta oluşan anaerobik koşullar yüzünden kısa sürede suyun kalitesini düşürebilir. Yeterli derinliğe sahip olan suni göllerde su tabakalaşması nedeni ile alt tabakanın (hipolimnion) anoksik olması sonucu ortaya çıkabilecek anaerobik koşullar yüzünden demirin bu alt tabakalarda bulunan suda konsantre olmasına yol açabilir. Bu sebeple, göl tabakalaşmasının bahar aylarındaki dikey sirkülasyonunu izleyen günlerde rezervuardan çekilen sular Fe^{+2} iyonu bakımından zengin olabilir [http://www.cem.yildiz.edu.tr/5-belgeler/ders_notlari/0413021-KTI/kti-dn03.pdf].

Havadaki oksijenden kaynaklanan demir oksidasyonunun ve buna bağlı olarak demirin çökmesi gibi bir problemin olmaması anaerobik ortamlarda demirin biyolojik olarak arıtım şansını da artırmaktadır. Fazla miktarda demir (II) içeren suların arıtımında geleneksel kimyasal arıtlara alternatif olarak doğal ortamlarından izole edilmiş etkin mikroorganizmaları içeren anaerobik biyolojik arıtım tekniklerinin kullanılması daha ucuz ve çevreyi daha az kirleten bir teknoloji geliştirilmesine imkan sağlayabilir.

3. MATERİYAL - YÖNTEM

3.1. Materyal

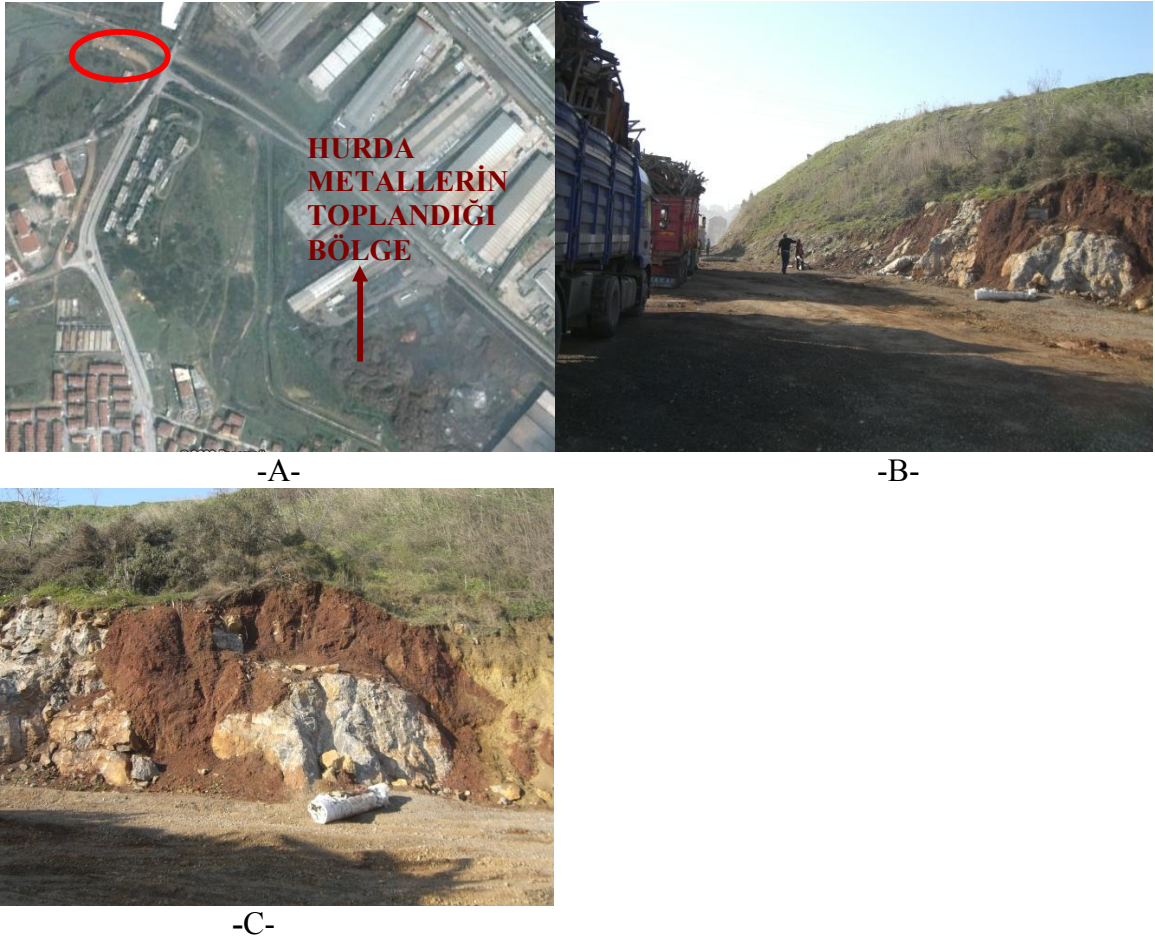
Darıca ilçesi sınırları içerisindeki, ağır metallerce kirlenmiş olduğu düşünülen beş ayrı bölgeden toprak numunesi alınarak bakteri izolasyonunu gerçekleştirmek üzere Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoteknoloji Laboratuvarına getirilmiştir. Toprak numunelerinin alındığı bölgelerde metal sanayisine ait çok sayıda fabrika bulunmaktadır. Ayrıca toprak numunelerinin derlendiği bölgelerde hurda metallerin taşındığı yoğun bir trafik yükü ve hurdaların depolandığı geniş alanlar söz konusudur. 25 Şubat 2008 tarihinde belirlenen araştırma alanının beş farklı noktasından numuneler alınmıştır. Beş farklı numune alma noktası tespit edilirken ağır metal kirliliğinin yoğun olduğu düşünülen noktalar seçilmesine özen gösterilmiştir. Bu noktalar Şekil 3.1, Şekil 3.2 ve Şekil 3.3'te gösterilmiştir. Toprak numuneleri toprak yüzeyinin 4-5 cm derinliğinden alınıp steril plastik kutular içine konulmuştur. Bu toprak örnekleri daha sonra demir içeren besiyerlerine ekilerek demir gideriminde kullanılabilecek mikroorganizmaların özenleştirilmesi yapılmıştır.



Şekil 3.1. Bakır işleme fabrikası arkası, Numune 1 ve Numune 2'nin alındığı bölge, Kuşbakışı görüntüsü (A), Yakından görünüş (B)



Şekil 3.2. Hurda metallerin toplandığı ve Numune 3'ün alındığı bölge



Şekil 3.3. Hurda metallerin yüklendiği ve Numune 4, Numune 5'in alındığı bölge, Kuşbakışı görüntüsü (A), Yakından görünüş (B), Numune 5'in alındığı bölgenin yakından görünüşü

3.1.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

Toprak numunelerinden mikroorganizmaların izole edilmesi, üremelerinin takip edilmesi, mikroskopik olarak incelenmesi ve giderilen demir konsantrasyonunun tespit edilmesi için çok sayıda cihaz ve ekipman kullanılmıştır. Aşağıda bu çalışmalar sırasında kullanılan temel cihaz ve ekipmanlar belirtilmiştir.

- Atomik Absorpsiyon Spektrofotometre, Grafit Fırın Kontrolör (Perkin-Elmer THGA SIMAA 6000 Simultaneous Multielement)
- Atomik Absorpsiyon Spektrofotometre (Perkin-Elmer, Burner 1100)
- UV-Visible Spektrofotometre (GBC-Cintra20)
- pH-metre (HANNA Instruments pH 211 Microprocessor)
- Hassas Terazı (Ohaus AV 64)
- İnkübatör (Binder)
- Santrifüj (Hettich Zentrifügen-EBA 20)
- Vorteks (Yellowline)
- Mikroskop (Zeiss Primo Star Axio Cam)
- Anaerobik Kabin (Bactron I Shel Lab Anaerobic Chamber, 14 Cu.Ft. 120V)
- Saf su cihazı, (Millipore (Milli-Q Academic A 10)
- Su Banyosu (Grant)
- Manyetik Karıştırıcı (Clifton Cerastır)
- Derin Dondurucu, -20 °C (Siemens)
- Buzdolabı, +4 °C (Arçelik)
- Otoklav (Astell)
- Lamimar Hava Akışlı Kabin (Elicent-Legrand)
- Mikropipet, 100 µl-1000 µl (Eppendorf Research)
- Karıştırıcı (SI4 Shel Lab Benchtop Shaking Incubator, 4 Cu.Ft. 120V)
- Fotoğraf Makinesi (Casio EX-Z120 7,2 Mega pixels)

3.1.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler Ve Çözeltiler

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler

Madde Adı	Firma Adı
Demir (II) -Sülfat-7-hidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Merck
Pepton	Merck
Yeast Extract (Maya Ekstraktı)	Merck
Sodyum Klorür (NaCl)	Merck
Agar	Merck
Gliserol	Merck
Sülfirik Asit (H_2SO_4)	Merck
Glikoz	Merck
Üre	Merck
Amonyum Klorür (NH_4Cl)	Merck
Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4)	Merck
Dipotasyum Hidrojen Fosfat (K_2HPO_4)	Merck
Demir(III) –Klorür-6-hidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Merck
Magnezyum Sülfat-7-hidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Merck
Kalsiyum Klorür (CaCl_2)	Merck
Sodyum Bikarbonat (NaHCO_3)	Merck

Deneysel çalışmalarda Luria Broth besiyeri, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi, sentetik atık su, kalibrasyon çözeltisi, sülfirik asit çözeltisi, NaCl çözeltisi kullanılmıştır. Çözelti ve solüsyonların hazırlanışı aşağıda açıklanmaktadır.

3.1.2.1. LB (Luria Broth) Besiyeri

Bu tez çalışması sırasında toprak numunelerinden izole edilen mikroorganizmalar için besiyeri olarak LB (Luria Broth) besiyeri seçilmiştir. LB (Luria Broth) besiyeri bileşimi Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Luria Broth besiyeri bileşimi

Luria Broth (LB) Besiyeri	
Pepton	10 g
Yeast ekstrakt (Maya özütü)	5 g
NaCl	10 g
Su	1 L

Hazırlanan LB besiyerinin pH'si sülfirik asit kullanılarak 6,0, 4,5 ve 2,8 olacak şekilde ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edildikten sonra kullanılmıştır.

Anaerobik ortamda yapılacak çalışmalar için hazırlanan LB besiyerleri önce anaerobik kabin (Bactron I Shel Lab Chamber) içerisinde oksijenden yoksun hale getirilip, kapakları kapatıldıktan sonra kabin dışına çıkarılmış ve 121 °C de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Katı besiyeri (Luria Agar) hazırlamak için besiyerine 15 g/L olacak şekilde agar ilave edildikten sonra otoklavlanmış ve sıcaklığı yaklaşık 50 °C'ye düştükten sonra petri kaplarına dökülerek donması beklenmiştir.

3.1.2.2. FeSO₄.7H₂O Çözeltileri

Demir(II) stok çözeltisi demir miktarı 500 mg/L olacak şekilde hazırlanmıştır. Bunun için 250 mg FeSO₄.7H₂O önceden otoklavlanmış 100 ml distile suda çözülmüştür. Fe⁺² yüksek sıcaklıkta Fe⁺³'e dönüştüğü için demir otoklavlanmamış, otoklavlanarak steril edilmiş distile su içerisine bek alevi yanında steril bir şekilde eklenmiş ve çözünmesi sağlanmıştır.

3.1.2.3. Sentetik Atık Su

Sentetik atık su içinde mikroorganizmaların demir giderim aktivitesini belirlemek amacıyla aşağıdaki içeriğe sahip sentetik atık su hazırlanmıştır. 1,0 litre sentetik atık su 1200 mg glikoz, 53 mg üre, 101 mg NH₄Cl, 35 mg KH₂PO₄, 15 mg K₂HPO₄, 0,5 mg FeCl₃.6H₂O, 100 mg MgSO₄.7H₂O, 7,5 mg CaCl₂, 294 mg NaHCO₃ içermektedir. Hazırlanan sentetik atık su 121 °C de 15 dakika otoklavlandıktan sonra kullanılmıştır.

3.1.2.4. Sulfirik Asit (H_2SO_4) Çözeltisi

Besiyeri ve demir solüsyonlarının pH'larını ayarlayabilmek için % 95 - 98 oranında derişik sulfirik asitten 10 ml alınmış 1000 ml'ye seyreltilerek kullanılmıştır.

3.1.2.5. NaCl Çözeltisi

% 0,9 konsantrasyona sahip NaCl çözeltisini hazırlamak için 0,9 g sodyum klorür tartılarak balon joje içerisine alınmış ve distile su ile 100 ml'ye seyreltilerek çözelti haline getirilmiştir. Hazırlanan bu çözelti 121 °C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra izolatların seyreltilmesinde kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Toprak Numunelerinden Mikroorganizmaların İzolasyonu

Steril ortamda laboratuvara getirilen 5 adet toprak numunesinin her birinden 1 gr alınarak önceden otoklavlanarak steril edilmiş 50 ml'lik falkon tüpleri içerisine konulmuştur. Falkon tüplerindeki toprak numuneleri üzerine 20 mg/L Fe^{+2} içeren 40 ml LB besiyeri eklenmiştir. Hazırlanan falkon tüpleri çalkalanarak karıştırıldıktan sonra 30 °C de 96 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında üreme gösteren karışık kültürlerden 5'er ml alınmış ve 20 mg/L Fe^{+2} içeren taze LB besiyerine transfer edilmiştir. Aynı prosedür 200 mg/L Fe^{+2} konsantrasyonuna sahip besiyeri için de tekrar edilmiştir.

Toprak numunelerinden mikroorganizmaları izole edebilmek için bu işlem her iki konsantrasyon için de 3 defa tekrar edilmiştir. Yapılan bu ön zenginleştirme işleminden sonra elde edilen karışık kültürlerden 5'er ml alınarak 20 ppm Fe^{+2} ve 200 ppm Fe^{+2} içeren 45 ml LB besiyerine aktarılmıştır. Konsantrasyonlar son hacim olan 45 ml esas alınarak hesaplanmıştır.

Deneyler esnasında steril ortam sağlayabilmek, farklı mikroorganizmalar ile numunelerin kontamine olmasını önlemek amacıyla kullanılan besiyeri 121 °C'de 15

dakika otoklavlanarak steril hale getirilmiştir (demir solüsyonu otoklavdan sonra ilave edilmiştir). İşlemler gerçekleştirilirken steril pipet ucu, öze kullanılmış ve olası kontaminasyon riskini ortadan kaldırmak için laminar kabin içerisinde bek alevi yanında çalışılmıştır.

Yapılan önzenginleştirme işleminden sonra karışık kültürlerin ileriki deneylerde kullanılabilmesi amacıyla gliserol stokları hazırlanmıştır. Stok kültürler % 25 oranında gliserol içerecek şekilde hazırlanmıştır. Numuneler -20 °C’de derin dondurucu içerisinde saklanmaktadır.

3.2.2. Saf Kültürlerin Elde Edilmesi

1, 2, 3, 4 ve 5 olarak numaralandırılmış toprak numunelerinden izole edilen beş farklı karışık kültür N-1, N-2, N-3, N-4 ve N-5 olarak adlandırılmıştır. Elde edilen karışık kültürler % 0,9 konsantrasyona sahip steril tuzlu su çözeltisinde 10^{-1} , 10^{-2} ve 10^{-3} oranında seyreltilmiş ve LA besiyerlerine 200 µl aktararak yayma işlemi yapılmıştır. Bu işlemten sonra petrilere koloni oluşması için 30 °C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. N-2 karışık kültürü iyi üreme göstermediği için daha sonraki çalışmalarda kullanılmamıştır. Birbirinden farklı görünüme sahip olan koloniler yeni LA besiyerine çizgi ekim yöntemiyle aktarılmış ve saf kültürler elde edilmiştir.

3.2.3. Anaerobik Ortamda Kültürlerin Ekimi

LA besiyerinden steril pipet uçları yardımıyla alınan N-1a, N-3a, N-4c ve N-5b izolatları daha önceden steril edilmiş 5 ml su içerisinde karıştırılmış ve steril enjektörler yardımıyla alınarak daha önceden anaerobik hale getirilmiş 20 ppm ve 50 ppm demir içeren LB besiyerine ekilmişlerdir. Anaerobik inkübasyonlar anaerobik kabin içinde bulunan inkübatörlerde gerçekleştirilmiştir.

3.2.4. Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre Cihazı İle Demir Tayini

Atomik absorbsiyon spektrofotometre(AAS) cihazı ile demir analizi yapmak için öncelikle hazırlanan çözeltilerin konsantrasyonları ölçülmüş ve ölçülen değerlere göre bir kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. AAS’de demir analizi için numune hazırlarken, 50 ml’lik falkon tüplere mikroorganizmaların ekim işlemi gerçekleştikten sonra inkübasyonun çeşitli saatlerinde kültürlerden 5’er ml alınarak 15 ml’lik falkon tüplerine eklenmiştir. Alınan her karışık kültürün bir kısmı spektrofotometrede (UV-Visible Spektrofotometre GBC-Cintra20) 600 nm dalga boyunda hücre yoğunluğunun ölçülmesi için kullanılmıştır. Kültürlerin geri kalanı ise 6000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Kültürlerin santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı mikropipet yardımıyla alınarak yeni tüplere aktarılmış, tüpün dibinde kalan kısım atılmıştır. Yeni tüplere aktarılan süpernatantlar demir miktarı tayini için Perkin-Elmer Burner 1100 AAS cihazı ile analiz edilmişlerdir. Alevli AAS cihazı ppm düzeyindeki konsantrasyonlarda ölçüm yapabildiği için seyreltme yapılmamıştır. Son aşamada laboratuvar çalışmalarından elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

Elde edilen karışık kültürlerin sentetik atık su içerisinde üreme ve demir(II) giderim kapasiteleri incelenmiştir. Karışık kültürler 20 mg/L Fe^{+2} iyonu içeren sentetik atık su içerisine transfer edildikten sonra 30 °C de 5 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra her bir karışık kültürden inkübasyonun 0., 2. ve 5. günlerinde 5,0’er mL alınarak absorbans değerleri ölçülmüş ve 6000 rpm’de santrifüj edildikten sonra üst sıvısı alınarak kültürlerin zamana bağlı demir giderimi alevli AAS cihazında ölçüm yapılarak incelenmiştir.

İzolatlar ile yapılan deneylerde yine santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı mikropipet yardımıyla alınarak yeni tüplere aktarılmış, tüpün dibinde kalan kısım atılmıştır. Yeni tüplere aktarılan süpernatantlar demir miktarı tayini için seyreltilerek AAS-Grafit fırın kontrolöründe analiz edilmiştir. 20 ppm demir varlığında üreyen kültürler 1/5 oranında, 50 ppm demir varlığında üreyenler ise 1/10 oranında distile su ile seyreltilmiştir. Demir analizi için Perkin-Elmer THGA 6000 model Grafit Fırın - Atomik Absorpsiyon Spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. Son aşamada laboratuvar

alışmalarından elde edilen veriler değerlendirilmiş ve her iki cihaz ile belirlenen analiz sonuçları karşılaştırılmıştır. Perkin-Elmer THGA 6000 model Grafit Fırın - Atomik Absorpsiyon Spektrofotometre cihazı, Perkin-Elmer Burner 1100 AAS cihazından daha hassas ölçüm sağladığı için tercih nedeni olmuştur. İzolatların demir(II) giderimleri yüksek oranlarda olduğu için ppb($\mu\text{g/L}$) düzeyde ölçüm yapılmasına gereksinim duyulmuştur.

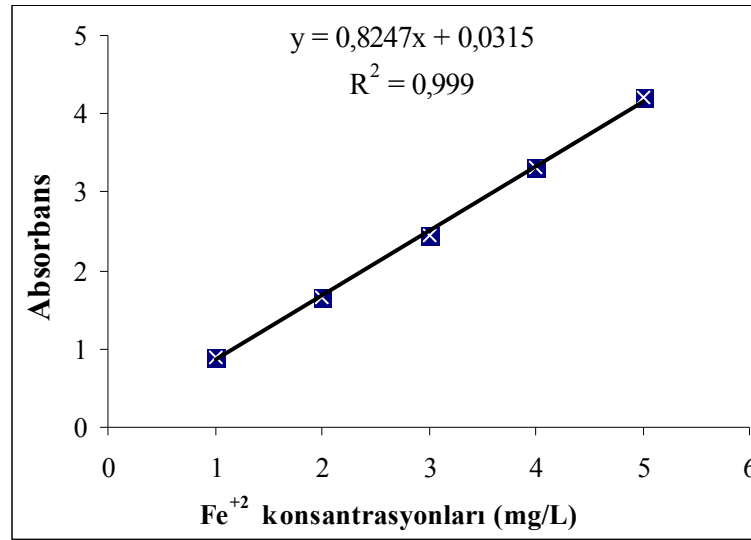
Atomik absorpsiyon spektrofotometresi, eser miktardaki metallerin (ppm ve ppb düzeyde) kantitatif analizi için kullanılmaktadır. Örnekteki aranan elementlerin konsantrasyonları, o elemente has dalgaboyundaki ışığı soğurması yardımıyla bulunmaktadır. Oyuk katot lambası (Hallow Cathode Lamp) aranan elementin dalgaboyu genelde elementin kendisinin uyarılması ile elde edildiği için, örnekteki miktarlar için kesin sonuç verebilmektedir.

Analizi yapılacak örneğin çözeltisi hazırlandıktan sonra demir metalinin analizi yapılması için cihaza demir metalinin oyuk katot lambası takılır. 1,0 ppm, 2,0 ppm, 3,0 ppm, 4,0 ppm ve 5,0 ppm demir konsantrasyonlarında standart zelteler hazırlanır ve demir elementinin absorbans yaptığı dalgaboyunda (248,3 nm) okuma yapılarak standart eğrisi hazırlanır. Analiz edilecek örneklere bulunan tayin edilecek demir elementinin gözlenebilme sınırlarına (Deteksiyon Limitine) göre Atomik Absorpsiyon Spektrometrede atomlaştırıcı olarak Grafit Fırın nitesi kullanılmıştır. Tayini yapılacak numunelerin gözlenebilme sınırları ppb düzeyine kadar inebilmektedir. AAS Grafit Fırın nitesi kullanarak yapılan analizde demir elementi için Deteksiyon Limiti 12,0 $\mu\text{g/L}$ 'dir. Grafit Fırın nitesinin çalışma prensibi kurutma, kl etme ve atomlaştırma temeline dayanır. Alevli AAS cihazında veriler ppm düzeyde okunabilmektedir.

AAS cihazı önce numunenin 20 μl 'sini çekerek grafit kapsül içerisine bırakır. Numune kapsül içerisinde kurutulur ve kl edilir. Kl edildikten sonra, yaklaşık 2000 $^{\circ}\text{C}$ – 2500 $^{\circ}\text{C}$ 'ye yükselen sıcaklığa neden olan akım, hızla bira yüz ampere artırılır; numunenin atomlaşması bira saniye sürer. Atomlaşan taneciklerin absorpsiyonu ölçülür.

3.2.4.1. Kalibrasyon Eğrisinin Çıkarılması

Kalibrasyon grafiği oluşturabilmek için, öncelikle analizi yapılacak olan demir elementinin belirli konsantrasyonlarda standart çözeltileri hazırlanmıştır. 200 mg/L Fe^{+2} içeren stok $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinden 0,5 mL, 1,0 mL, 1,5 mL, 2,0 mL ve 2,5 mL alınmış, 100 mL'lik balon jöjelere konulmuştur. Üzerlerine 10 mL LB besiyeri eklenmiş ve her biri 100 mL'ye tamamlanmıştır. Seyreltilmiş numuneler 1/10 oranında besiyeri içerdiği için standart çözeltiler bu oran gözetilerek hazırlanmıştır. 1,0 ppm, 2,0 ppm, 3,0 ppm, 4,0 ppm ve 5,0 ppm demir konsantrasyonlarında hazırlanan standart çözeltilerin demir elementinin absorbans yaptığı 248,3 nm dalgaboyunda absorbans değerleri okunmuştur. Fe^{+2} konsantrasyonlarına karşı okunan standart çözeltilerin absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Fe^{+2} kalibrasyon eğrisi Şekil 3.1'de gösterilmektedir. Kültürlerde kalan demir miktarı bu kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır



Şekil 3.4. Fe^{+2} Kalibrasyon Eğrisi

3.2.5. Elde Edilen Karışık Kültürlerde Demir Gideriminin İncelenmesi

Elde edilen karışık kültürler 20 mg/L konsantrasyonunda Fe^{+2} iyonu içeren Luria Broth besiyerine ekildikten sonra 30 °C de inkübasyona bırakılmıştır. Deneyler yaklaşık 160 saat boyunca devam etmiştir. 20 mg/L konsantrasyonunda Fe^{+2} iyonu içeren sıvı

besiyerine ekim işlemi gerçekleştirildikten sonra her bir karışık kültürden belirli aralıklarla 5 mL alınmış ve santrifüj edildikten sonra süpernatantta kalan demir konsantrasyonu alevli AAS sisteminde ölçülmüştür.

3.2.6. Karışık Kültürlerden İzole Edilen Saf Kültürlerde Demir Gideriminin İncelenmesi

Karışık kültürlerden izole edilen saf kültürler 20 mg/L ve 50 mg/L konsantrasyonlarında Fe^{+2} iyonu içeren LB besiyerlerine ekimleri yapıldıktan sonra 30 °C de ortalama 120-160 saat boyunca inkübasyona bırakılmışlardır. 20 mg/L ve 50 mg/L konsantrasyonlarında Fe^{+2} iyonu içeren sıvı besiyerlerine ekim işlemi gerçekleştirildikten hemen sonra her bir saf kültürden numune alınmış ve ilk ölçümler yapılmıştır. Böylece biyoabsorbsiyon/biyoadsorbsiyon prosesi gerçekleşmeden önceki Fe^{+2} konsantrasyonu belirlenmiştir. N-1a, N-3a, N-4c ve N-5b olarak adlandırılmış olan izolatların üremeleri ve demir giderim kapasiteleri üzerinde farklı demir konsantrasyonlarının (20 ve 50 ppm), farklı sıcaklıkların (25 °C, 30 °C ve 37 °C), farklı pH'lerin (6,0, 4,5 ve 2,8), çalkalamanın ve oksijen varlığının (aerobik ve anaerobik ortam) etkisi incelenmiştir.

3.2.7. Demir(II) % Giderim Verimliliğinin Hesaplanması

Atomik absorpsiyon spektrofotometre grafit fırın cihazı kullanılarak Fe^{+2} konsantrasyon değerleri belirlenen örneklerdeki % Fe^{+2} giderim verimliliği aşağıdaki formüle göre hesaplanmış ve grafiğe geçirilmiştir.

$$\% \text{ Giderim} = \frac{C_0 - C_{\text{son}}}{C_0} \times 100 \quad (3.1)$$

C_0 = Her deneyde karışık ve saf kültürlerle paralel olarak yapılan 20 ppm veya 50 ppm demir konsantrasyonuna sahip bakteri içermeyen LB besiyerinin başlangıç demir konsantrasyonu (mg/L)

C_{son} = İnkübasyon süresinin ardından her bir kültürde sıvı kısmında kalan demir konsantrasyonu (mg/L)

3.2.8. Mikroorganizmaların Üreme Eğrilerinin Çıkarılması

Karışık kültürlerin ve izolatlara ait saf kültürlerin üreme profilleri hücre miktarındaki zamana bağlı artışın UV-VIS spektrofotometrede (GBC-Cintra20) ölçülmesiyle belirlenmiştir. Üreme eğrileri hücre kültürlerinin 600 nm dalgaboyunda verdiği absorbans değeri kullanılarak oluşturulmuştur.

3.2.9. Mikroorganizmaları Tanımlanma Çalışmaları

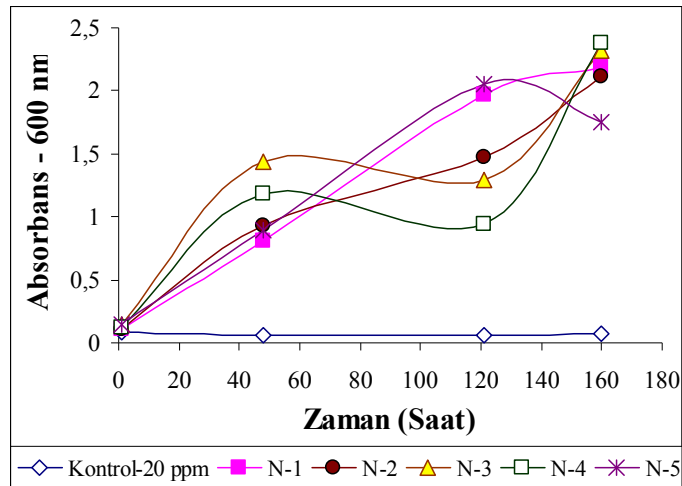
İzole edilen saf kültürler öze yardımıyla LA besiyerlerine aktarılmıştır. Petriler 30 °C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra agar üzerinde oluşan koloniler görüntülenmiş, koloni çeşitliliği belirlenmiş ve sayılmıştır. Koloni morfolojisini karakterize etmek için kolonilerin renk ve boyutları belirlenmiş ve sümüksü bir yapıya sahip olup olmadıkları tespit edilmiştir. Farklı türde mikroorganizma izolasyonu yapmak için farklı morfolojilere sahip olan koloniler seçilmiştir.

İzolatların sıvı kültürlerinden alınan örnekler Zeiss Primo Star Axio Cam model mikroskop altında da incelenmiş ve hücre yapıları görüntülenmiştir. Her bir saf kültürden 200 µl alınarak lam üzerine konulmuş ve lamel hava boşluğu bırakmayacak şekilde sıvının üzerine kapatılarak yayılması sağlanmıştır. Daha sonra 100X (oil immersiyon) merceği kullanılarak izolatların hücre boyutları ve şekilsel yapıları tespit edilmiştir.

4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. Elde Edilen Karışık Kültürlerde Demir Gideriminin Belirlenmesi

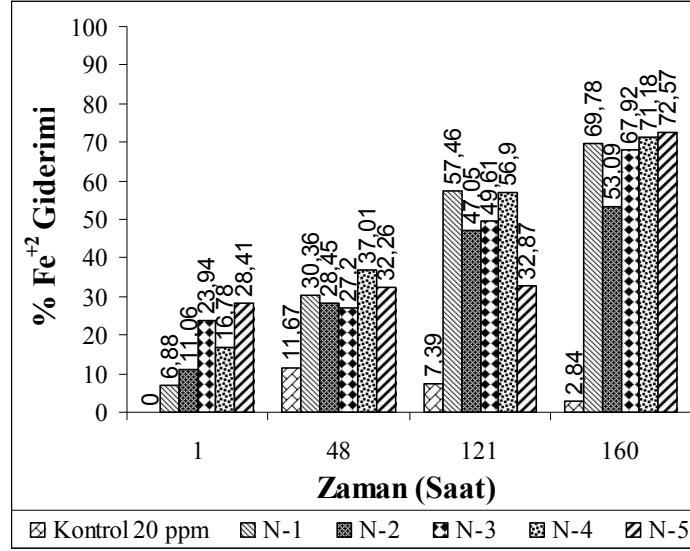
Demir (II) giderimi yapabilen mikroorganizmaların izolasyonu için ağır metal yoğunluğunun yüksek olduğu düşünülen sanayi bölgesinden alınan toprak numuneleri kullanılmıştır. Toprak numunelerinin alındığı bölgelerin konumu Bölüm 3'te gösterilmiştir (Sf: 30-31, Şekil 3.1, Şekil 3.2 ve Şekil 3.3.). Yöntem kısmında anlatıldığı şekilde beş adet farklı toprak numunesi kullanılarak gerçekleştirilen önzenginleştirme adımlarından sonra karışık kültürler elde edilmiştir. Laboratuvar ortamında 30 °C'de 20 mg/L Fe^{+2} içeren LB besiyerinde elde edilen karışık kültürlerle ait üreme eğrileri Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Karışık kültürlerin yavaş bir üreme profili sergiledikleri ve 160. saat sonunda bile durağan faza giremedikleri tespit edilmiştir. Kültürlerin çok sayıda farklı mikroorganizma türü içermesi ve bu türlerin laboratuvar koşullarına adaptasyon problemi yaşamaları üreme hızının düşük olmasının nedenleri arasında sayılabilir.



Şekil 4.1. 20 ppm Fe^{+2} içeren LB besiyerinde karışık kültürlerin üreme eğrisi

Karışık kültürlerin Fe^{+2} giderim kapasitelerini belirlemek için zamana bağlı olarak besiyerindeki demir konsantrasyonunun değişimi incelenmiştir. Yapılan ölçümler

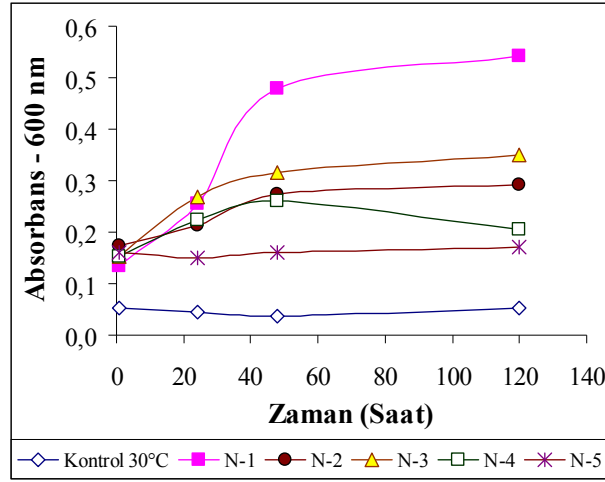
sonucunda 20 mg/L Fe^{+2} iyonu içeren LB besiyerinde N-2 olarak adlandırılan karışık kültürün demir giderim kapasitesinin diğer kültürlerle kıyasla çok daha düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2) ve bu kültürden sağlıklı kolonilerin izole edilememesi nedeniyle sonraki deneylerde N-2 karışık kültürü saf izolat elde edilmesi amacıyla kullanılmamıştır.



Şekil 4.2. 20 ppm Fe(II) içeren LB besiyerinde karışık kültürlerin % Fe^{+2} giderimi

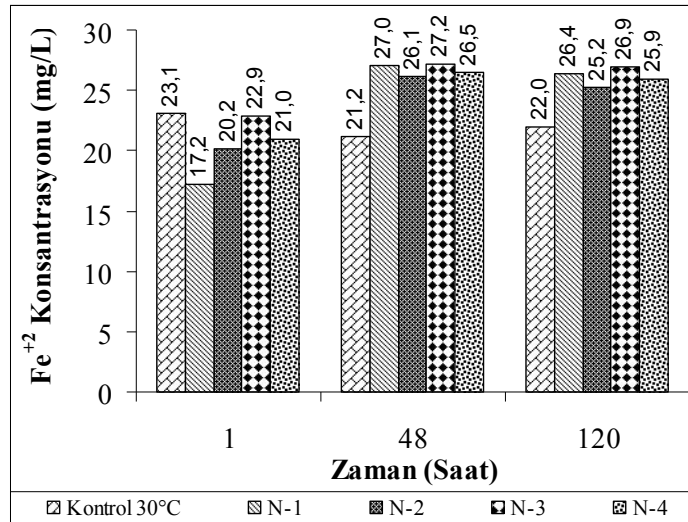
4.1.1. Sentetik Atık Suda Karışık Kültürler ile Demir Giderimi

Karışık kültürlerin minimal bir besiyeri olan sentetik atık su içerisindeki demir(II) giderim kapasitelerini incelemek için kültürler LB besiyeri yerine 20 mg/L Fe^{+2} iyonu içeren sentetik atık su içerisine ekilmiştir. Karışık kültürlerin besin açısından fakir bir ortam olan sentetik atık su içerisinde iyi bir üreme profili sergileyemedikleri tespit edilmiştir. En yüksek üreme hızı N-1 karışık kültürü ile elde edilmiş ancak bu kültürde bile 120. saat sonunda 0,5 absorbans değeri okunmuştur. Şekil 4.3'te sentetik atık su ortamında karışık kültürlerin üreme eğrileri gösterilmektedir. Bu deneyde demir miktarının hassas ölçülememiş olması göz önünde bulundurularak sonraki deneylerde atomik absorpsiyonda farklı bir prosedür kullanılarak ölçümler yapılmıştır.



Şekil 4.3. 20 ppm Fe⁺² içeren sentetik atık suda karışık kültürlerin üreme eğrisi

Karışık kültürlerin sentetik atık su ortamında demir(II) giderim kapasitelerinin de oldukça düşük olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.4). Kültürlerin yeterli hücre sayısına ulaşamamalarının demir(II) gideriminin düşük olmasının en önemli etmenlerinden biri olduğu düşünülmektedir. Evsel veya endüstriyel atıksular sentetik atıksuya kıyasla çok daha çeşitli ve daha yüksek miktarlarda organik madde içermektedirler. Bu nedenle izolatların gerçek atıksu örneklerinde daha yüksek üreme hızlarına ulaşacakları ve daha yüksek giderim yapacakları beklenmektedir.

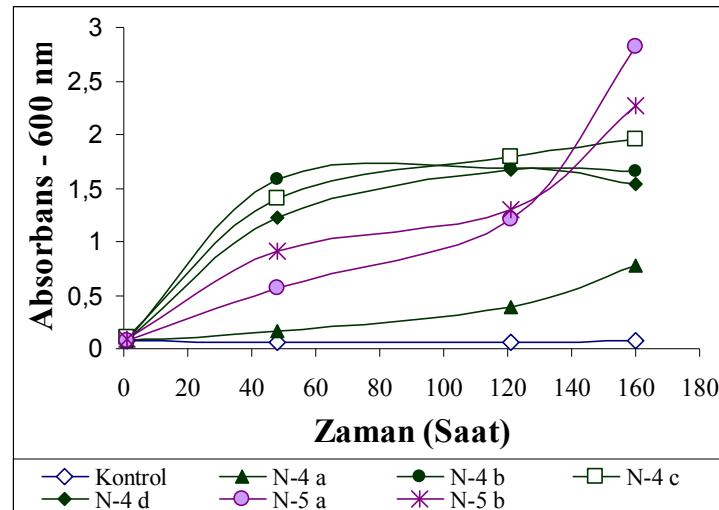


Şekil 4.4. Sentetik atık suda karışık kültürler ile Fe⁺² giderimi

4.2. Karışık Kültürlerden İzole Edilen Saf Kültürlerin Demir Giderim Kapasitelerinin Belirlenmesi

Karışık kültürlerden elde edilen her bir saf kültür (izolat) izole edildiği karışık kültür numarasının ardına a, b, c ve d harfleri yerleştirilerek N-1a, N-1b, N-3a, N-3b, N-4a, N-4b, N-4c, N-4d, N-5a ve N-5b şeklinde isimlendirilmişlerdir. N-1b ve N-3b kültürleri koloni oluşturmalarına rağmen baskın olan diğer kolonilerden dolayı saf olarak izole edilememişlerdir.

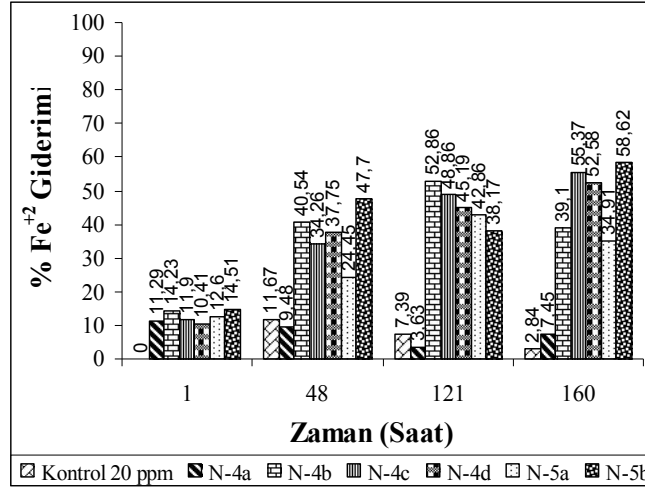
Birden fazla mikroorganizma türü içeren N-4 ve N-5 karışık kültürleri ve bu kültürlerden elde edilen ve tek bir mikroorganizma türü içeren saf kültürler karışık ve saf kültürlerin üreme profillerinin ve demir giderim kapasitelerinin kıyaslanması amacıyla kullanılmıştır. Bu karışık kültürlerden izole edilen saf kültürler 20 mg/L konsantrasyonunda Fe^{+2} iyonu içeren LB besiyerlerine ekilmiş ve belirli zamanlarda alınan numunelerdeki Fe^{+2} konsantrasyonu ölçülmüştür. N-4 ve N-5 karışık kültürlerinden seçilen saf kültürlerin üreme eğrisi Şekil 4.5'te, demir(II) giderimleri ise Şekil 4.6'da gösterilmektedir.



Şekil 4.5. 20 ppm Fe^{+2} içeren LB besiyerinde N-4 ve N-5 karışık kültürlerinden seçilen izolatların üreme eğrisi

N-4 karışık kültüründen elde edilen ve N-4b, N-4c ve N-4d olarak adlandırılan izolatlar LB besiyerinde hızlı üremelerine rağmen, N-4a sağlıklı üreme gösterememiştir.

N-5 karışık kültüründen elde edilen N-5a ve N-5b saf kültürleri ilk saatlerde yavaş çoğalmışlar ancak 160. saatte diğerlerinden daha yüksek hücre yoğunluğuna ulaşmışlardır.



Şekil 4.6. 20 ppm Fe^{+2} içeren LB besiyerinde N-4 ve N-5 karışık kültürlerinden elde edilen türlerin % Fe^{+2} giderimi

20 ppm Fe^{+2} iyonu içeren LB besiyerinde en yüksek demir(II) giderimini N-4c ve N-5b izolatları gerçekleştirmişlerdir. 160. saat sonunda N-4c % 55,37 ve N-5b ise % 58,62 oranında giderim sağlamışlardır. En az giderim yapan izolat ise N-4a olmuştur. Genel olarak izolatların demir giderim verimleri izole edildikleri karışık kültürlerinkine kıyasla daha düşük bulunmuştur. Bu sonuç daha yüksek demir giderimi için bakterilerin birbirlerinin aktivitelerine ihtiyaç duyabileceğine işaret etmektedir.

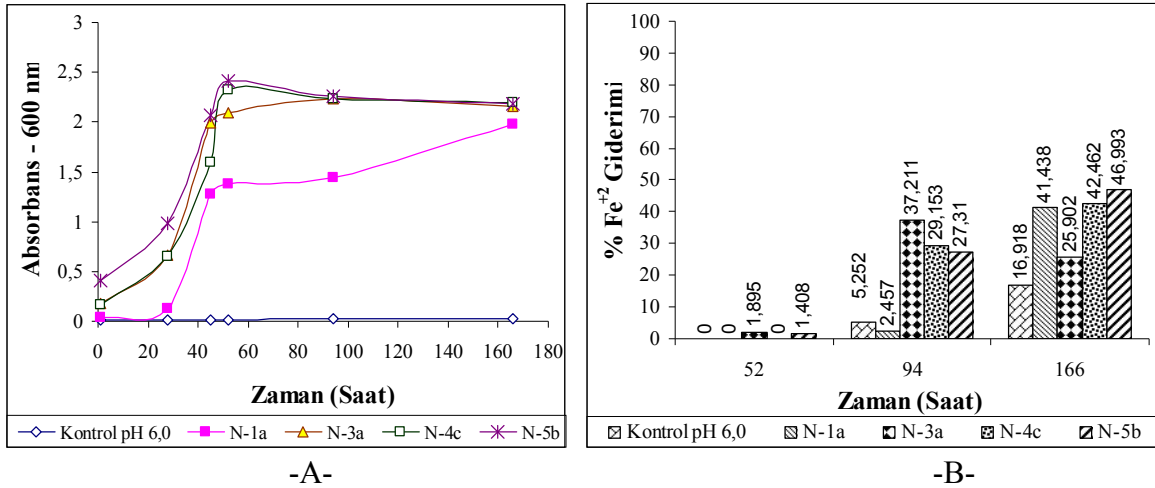
Tezin amacı demir gideriminde kullanılabilecek etkin mikroorganizmalar elde etmek olduğundan tezin devamında karışık kültürler yerine izolatlara ait saf kültürler kullanılmıştır. N-4 ve N-5 karışık kültürlerinden elde edilen izolatlardan en yüksek demir giderimi yapan iki izolat, N4-c (% 55,37) ve N5-a (% 58,62) farklı koşullardaki demir giderim kapasitelerinin incelenmesi için seçilmiştir. Diğer karışık kültürlerden ise daha sağlıklı ve büyük koloniler oluşturmaları nedeniyle N-1a ve N-3a izolatları seçilmiş ve sonraki deneyler bu dört izolat kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.3. Bazı İnkübasyon Koşulları ve Besiyeri Parametrelerinin İzolatların Üremeleri ve Demir Giderim Kapasitelerine Olan Etkisi

4.3.1. Farklı pH ve Demir(II) Konsantrasyonunda Çalkalanarak Üreyen Kültürlerin Üreme Profilleri ve Demir (II) Giderim Verimleri

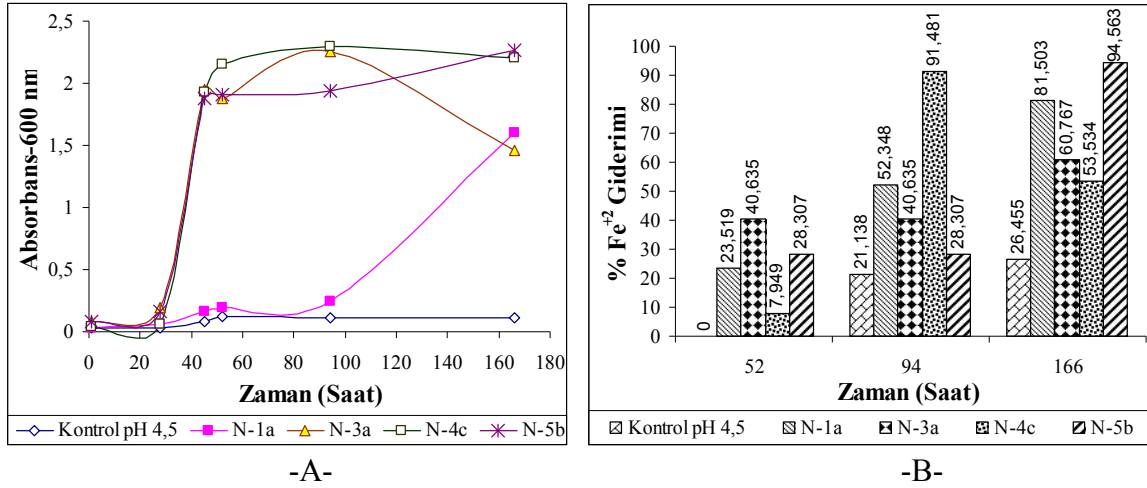
N-1a, N-3a, N-4c ve N-5b izolatlarının üremeleri ve demir giderim kapasiteleri 30 °C'de 150 rpm'de çalkalanarak üç farklı pH'da (6,0 – 4,5 – 2,8) ve iki farklı demir konsantrasyonunda (20 mg/L – 50 mg/L) incelenmiştir.

20 ppm demir (II) içeren ve pH'sı 6,0'ya ayarlanmış olan besiyerinde 30 °C'de 150 rpm'de çalkalanarak üremeleri sağlanan bütün saf kültürlerin iyi üreme gösterdikleri, demir(II) gideriminde yüksek verim sağlayamadıkları görülmüştür. N-4c izolatı inkübasyonun 52. saatinde, N-3a ve N-5b izolatları ise inkübasyonun 45. saatinde durağan faza geçmişlerdir. En az hücre yoğunluğu gösteren izolat ise N-1a'dır. En yüksek demir(II) giderim verimliliği gösteren saf kültür yaklaşık % 47 oranıyla N-5b olmuştur. Şekil 4.7'de saf kültürlerin üreme eğrisi (A) ve % demir(II) giderimi (B) gösterilmektedir. Deneylerimizdeki amacımız en yüksek biyogiderimin sağlandığı koşulların tespit edilmesidir. Bu nedenle kontrollerde elde edilen yüksek giderimler olumsuz bir sonuç olarak değerlendirilmekte, kontroldeki ve kültürdeki giderim arasındaki farkın yüksek olması ise bakteriyel giderimin veriminin yüksekliğini göstermektedir. pH 6,0 da ve 30 °C'de kontrolde % 16,9 oranında demir (II) giderimi olmuştur. Kontrolde görülen demir gideriminin demirin oksidasyonundan veya demirin besiyeri bileşenlerine adsorbsiyonundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Farklı koşulların bu faktör üzerindeki etkisinin de görülmesi amacıyla grafiklerde kontroldeki demir (II) giderim değerleri de gösterilmiştir.



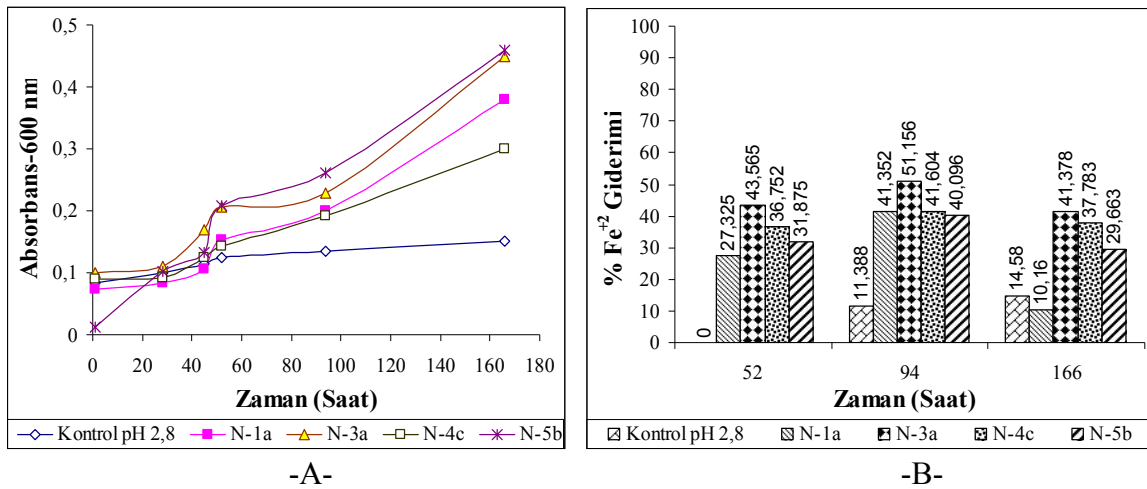
Şekil 4.7. 30 °C’de, 20 ppm Fe⁺² konsantrasyonunda, pH 6,0’da ve 150 rpm’de çalkalanarak üreyen saf kültürlerin üreme eğrisi (A) ve % Fe⁺² giderimi (B)

30 °C’de 20 ppm demir konsantrasyonunda pH 4,5’te 150 rpm’de çalkalanarak üremeleri sağlanan N-3a, N-4c ve N-5b saf kültürlerinin bu düşük pH’ya rağmen hızlı çoğaldıkları görülmüştür. pH 4,5’in N-1a izolatının çoğalması için elverişli olmadığı da gözlemlenmiştir. İzolatlar pH 6,0’da gösterdikleri düşük demir(II) gideriminin aksine, pH 4,5’te daha yüksek verimlilikte giderim yapmışlardır. 166. saatte pH 6,0’da N-1a saf kültürü % 41,44 giderim sağlarken, pH 4,5’te bu oranın iki katına çıktığı gözlenmektedir (Şekil 4.8). En yüksek demir(II) giderim verimliliği gösteren saf kültür pH 6,0’da olduğu gibi, pH 4,5’te de N-5b olmuştur. N-5b pH 6,0’da 166. saatte % 46,98 giderim sağlarken, pH 4,5’te bu oranın iki katına çıkarak % 94,56’ya ulaşmıştır, 166. saatte kontroldeki giderimde ise yalnızca % 10’luk bir artış olmuştur.



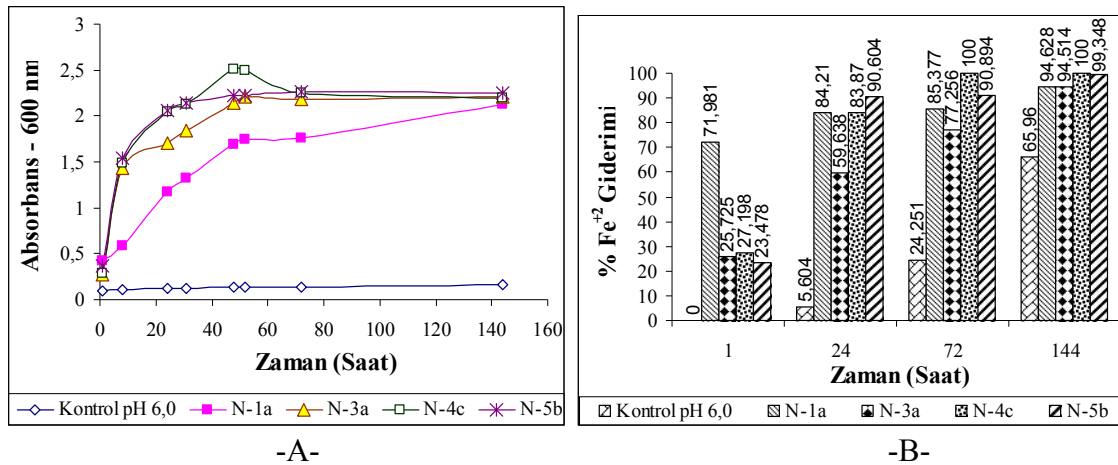
Şekil 4.8. 30 °C’de 20 ppm Fe⁺² konsantrasyonunda pH 4,5’te 150 rpm’de çalkalanarak üreyen saf kültürlerin üreme eğrisi (A) ve % Fe⁺² giderimi (B)

pH 2,8’de çalkalanarak üremeleri sağlanan saf kültürlerin iyi üreme gösteremedikleri belirlenmiştir. pH 2,8’de en yüksek demir(II) giderim verimliliği gösteren izolat N-3a olmuştur. N-3a pH 6,0’da iyi üreme göstermesine rağmen yüksek demir(II) giderimi sağlayamamış, fakat pH 2,8’de az üremesine karşın daha iyi giderim yapmıştır. N-3a saf kültüründe inkübasyon sonunda % demir(II) giderimi pH 6,0’da % 25,90, pH 2,8’de ise % 41,38 olarak ölçülmüştür. pH 2,8’de N-1a, N-4c ve N-5b saf kültürlerinde demir(II) giderimi ise N-3a’ya kıyasla daha düşüktür (Şekil 4.9). Genel olarak pH etkisi değerlendirilecek olursa 20 ppm demir içeren bir besiyerinde 30 C ve çalkalamalı koşullarda en yüksek giderim verimi pH 4,5 te elde edilmiştir diyebiliriz.



Şekil 4.9. 30 °C’de 20 ppm Fe⁺² konsantrasyonunda pH 2,8’de 150 rpm’de çalkalanarak üreyen saf kültürlerin üreme eğrisi (A) ve % Fe⁺² giderimi (B)

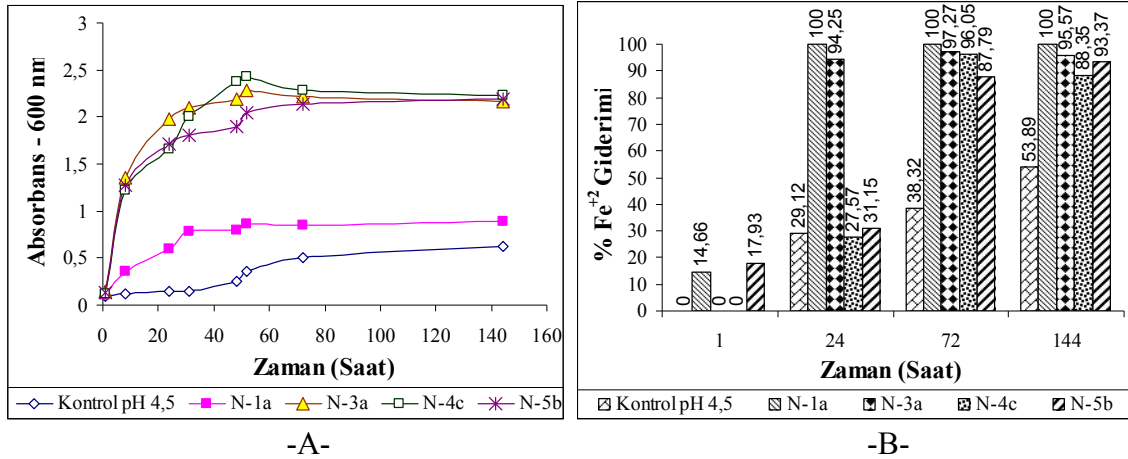
Demir konsantrasyonu 50 ppm'e çıkarıldığında 30 °C'de ve pH 6,0'da 150 rpm'de çalkalanarak üretilen tüm saf kültürlerin sağlıklı üredikleri ve 20 ppm demir konsantrasyonuna kıyasla çok daha yüksek giderim yaptıkları gözlemlenmiştir. Şekil 4.10'da görüldüğü gibi deneyin 1. saatinde yapılan ölçümde N-1a saf kültüründe demir giderim kapasitesi % 71,98 olarak ölçülmüş ve izolatın deneyin ileriki saatlerinde demir giderim oranını % 94,63'e yükselttiği gözlenmiştir. Besiyerine ekilen N-1a izolatının inkübasyonun başlangıcında henüz üremeye başlamadan %71 oranında giderim yapması bu izolatın biyogiderimde oldukça etkin olduğunu, giderimde hücre sayısından başka faktörlerin de (örneğin hücre yüzey bileşenleri veya başka yapılar) önemli olduğunu göstermektedir. N-3a, N-4c ve N-5b saf kültürlerinin 1. saatte alınan ölçümlerinde demir(II) giderim verimlerinin yaklaşık % 25 civarında olduğu ve 144. saatte bu üç saf kültürün demir(II) giderim verimliliklerini dört katına çıkardıkları gözlenmiştir. Ancak kontrolde kontaminasyon olmamasına rağmen özellikle inkübasyonun sonunda % 66 oranında görülen demir(II) giderimi oksidasyondan veya adsorbsiyondan kaynaklanan demir(II) gideriminin yüksek demir varlığında arttığına işaret etmektedir. Mikroorganizma içermeyen kontrol besiyerindeki bu giderim havadan kaynaklanan demir oksidasyonu nedeniyle veya demirin besiyeri bileşenlerine yapışması nedeniyle gerçekleşiyor olabilir. İnkübasyonun 72. saatinde ise izolatların demir giderim verimlilikleri kontroldeki demir giderimine kıyasla oldukça yüksektir.



Şekil 4.10. 30 °C'de 50 ppm Fe⁺² konsantrasyonunda pH 6,0'da 150 rpm'de çalkalanarak üreyen saf kültürlerin üreme eğrisi (A) ve % Fe⁺² giderimi (B)

Aynı koşullarda pH 4,5'e düşürüldüğünde N-3a, N-4c ve N-5b saf kültürlerinin üreme hızlarının halen yüksek olduğu, ancak N-1a izolatının önceki deneylerde de

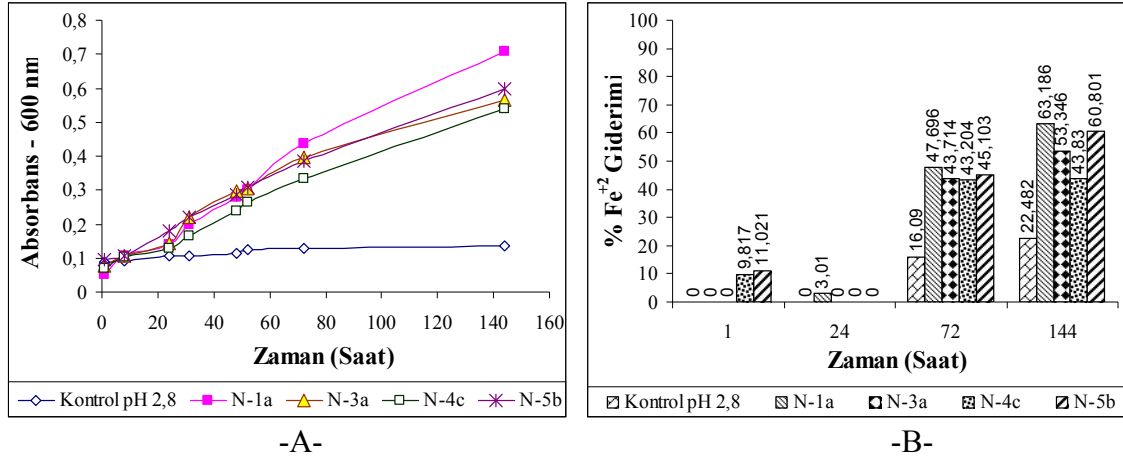
gözlemlendiği gibi düşük pH'da yavaş ürediği belirlenmiştir. Bütün saf kültürler bu pH'da yüksek demir(II) giderim verimliliği göstermiştir. Deneyin 1. saatinde yapılan ölçümde N-1a ve N-5b izolatlarının ortamdaki demir (II)'i düşük oranda da olsa giderdikleri görülmüştür. N-1a ve N-3a 50 ppm demir konsantrasyonunda en hızlı giderim yapan izolatlar olarak ortaya çıkmışlardır. Bu izolatlar 24. saatte % 94 - 100 oranında giderim sağlamışlardır. N-4c ve N-5b'nin ise demir(II)'i daha yavaş giderdikleri ve üremenin 72. saatinde giderimin % 87 - % 96 oranına ulaştığı tespit edilmiştir. N-4c saf kültüründe 72. saatte % 96,05 ve 144. saatte % 88,35 oranında demir(II) giderimi gözlemlenmiştir (Şekil 4.11). Hücreler üreme eğrisinden de görüleceği gibi 144. saatte ölüm fazına girmeye başlamışlardır. Bu durum hücrelerin parçalanması ve buna bağlı olarak ortamdaki demir miktarının artmasına neden olabilir. pH'nın 4,5'te düşürülmesi kontroldeki oksitlenmeye bağlı demir çökmesinin azalmasına neden olmuştur.



Şekil 4.11. 30 °C'de 50 ppm Fe⁺² konsantrasyonunda pH 4,5'te 150 rpm'de çalkalanarak üreyen saf kültürlerin üreme eğrisi ve % Fe⁺² giderimi

pH 2,8'e düşürüldüğünde ise izolatların üreme hızlarının oldukça düştüğü görülmüştür (Şekil 4.12 A). pH 2,8'de yüksek demir(II) giderim verimliliği gösteren saf kültürler N-1a ve N-5b olmuştur. 144 saat sonunda N-1a izolatı % 63,19 ve N-5b izolatı % 60,8 oranlarında demir(II) giderimi gerçekleştirmişlerdir. N-3a izolatının % demir(II) giderimi 72. saat sonunda yaklaşık % 43'e yükselmiş ve 144. saat sonunda ancak % 53'e yükselebilmektedir. Bu izolat 20 ppm demir (II) içeren besiyerinde pH 2,8'de diğer izolatlarla kıyasla daha yüksek verimle biyogiderim sağlamıştır (Şekil 4.9 B). N-4c izolatı ile % giderim verimi 72. ve 144. saatlerde yaklaşık olarak % 43 oranında gözlenmiştir (Şekil

4.12 B). Düşük pH'da demir oksidasyonu düşmüş ve kontrolde demir(II) miktarındaki düşüş % 22, 48 olarak ölçülmüştür. Çalkalamanın oksidasyon üzerinde önemli etkisi olduğu düşünüldüğü için tezin devamındaki deneyler kültürler çalkalanmadan üretilmişlerdir ve farklı sıcaklıkların demir giderimine olan etkisi incelenmiştir.



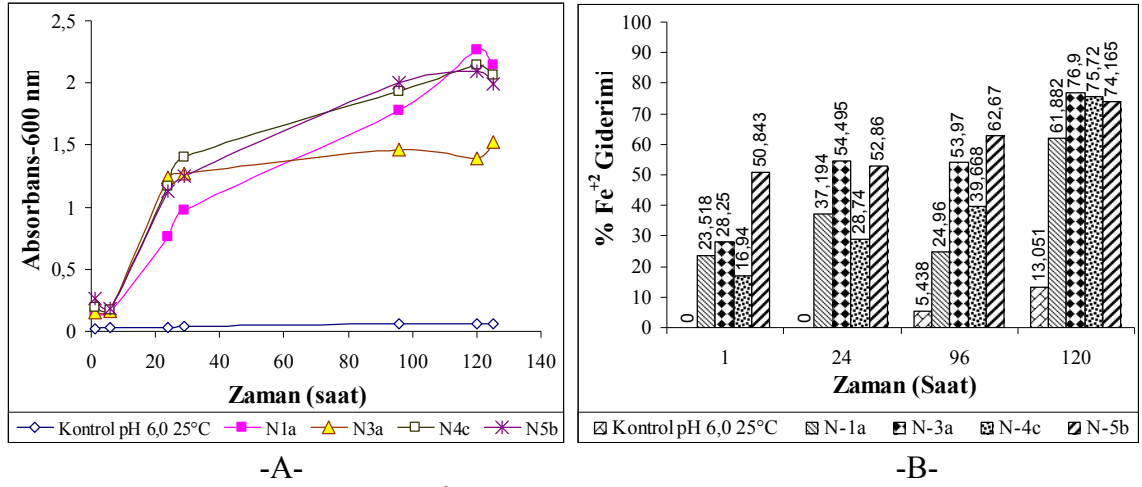
Şekil 4.12. 30 °C’de 50 ppm Fe⁺² konsantrasyonunda pH 2,8’de 150 rpm’de çalkalanarak üreyen saf kültürlerin üreme eğrisi (A) ve % Fe⁺² giderimi (B)

4.3.2. Farklı Sıcaklıklarda ve Farklı pH’larda Çalkalanmadan Üreyen Kültürlerin Üreme Profilleri ve Demir (II) Giderim Verimleri

Farklı sıcaklıkların izolatların giderim verimlerine olan etkisinin incelenmesi ve kontrol besiyerinde gerçekleşen havadaki oksijenden kaynaklanan demir oksidasyonunu önlemek amacıyla izolatlar 50 ppm demir (II) içeren besiyerlerinde çalkalanmadan üretilmişlerdir. Farklı sıcaklıkların etkisi iki farklı pH değerinde izlenmiştir.

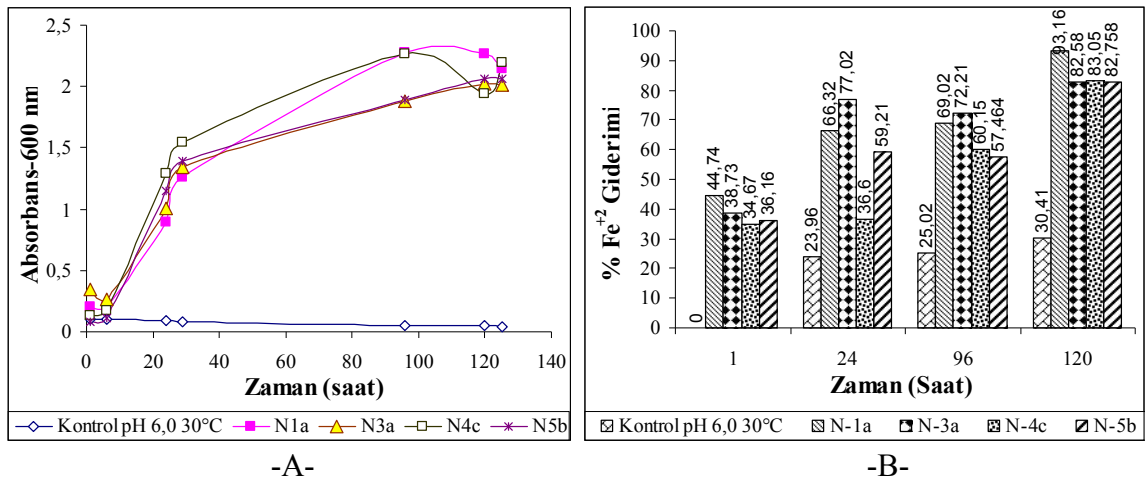
Şekil 4.13’te 25 °C’de izolatların üreme eğrileri ve demir giderim kapasiteleri gösterilmektedir. Düşük sıcaklıkta N-3a dışındaki tüm izolatların 30 °C’de olduğu gibi sağlıklı üredikleri görülmüştür. Ancak sıcaklığın düşmesi, kültürlerin çalkalanmaması ve durağan faza girişi geciktirmiştir. İnkübasyonun 120. saatinde N-3a, N-4c ve N-5b izolatlarının demir giderim verimleri birbirine yakın değerler olup yaklaşık % 75 civarında ölçülmüştür. Sıcaklığın düşürülmesi ve kültürlerin çalkalanmaması kontroldeki demir gideriminin düşmesini sağlamıştır (% 13). Nitekim sıcaklık 30 °C’ye çıkarıldığında kontroldeki giderim % 30’a çıkmıştır (Şekil 4.14 B), ancak bu değer aynı sıcaklık ve

pH'da çalkalanarak üretilen kültürlerde elde edilen değerle (Şekil 4.10, % 66) kıyaslandığında yine de çok düşüktür.



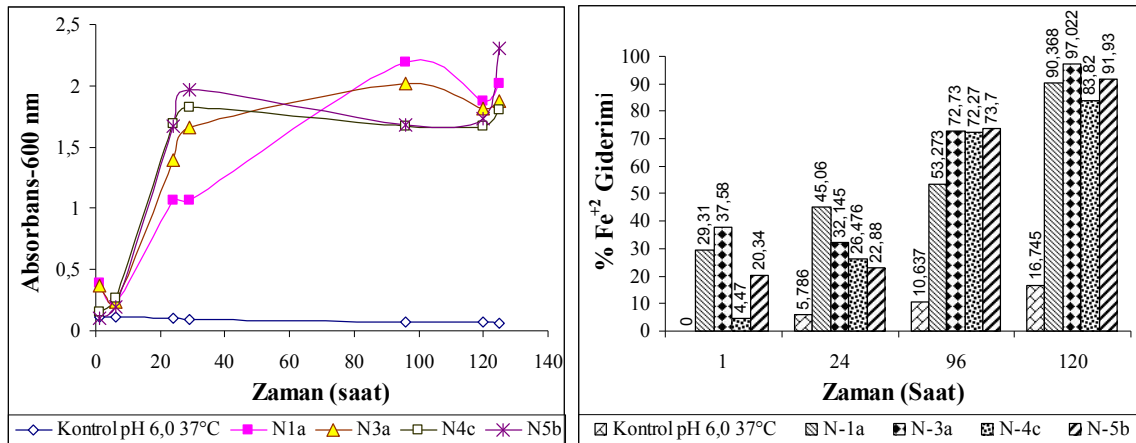
Şekil 4.13. 25 °C’de 50 ppm Fe⁺² konsantrasyonunda pH 6,0’da üreyen saf kültürlerin üreme eğrisi (A) ve % Fe⁺² giderimi (B)

Sıcaklık 30 °C’ye çıkarıldığında N-3a da dahil olmak üzere tüm kültürlerin üreme hızlarının birbirine yakın olduğu ve daha erken (96. saatte) durağan faza girdikleri görülmüştür. Bu sıcaklıkta N-1a izolatu 120. saatte diğer kültürlerden daha yüksek bir giderim verimine (% 93,16) ulaşmıştır (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. 30 °C’de 50 ppm Fe⁺² konsantrasyonunda pH 6,0’da üreyen saf kültürlerin üreme eğrisi (A) ve % Fe⁺² giderimi (B)

Şekil 4.15 A'da görüldüğü gibi 37 °C'de çalkalanmadan üretilen kültürlerin üreme hızlarının daha yüksek olduğu ve inkübasyonun 24. saatinde durağan faza girdikleri görülmüştür. İzolatların demir(II) giderim verimleri ise yüksek olup en yüksek biyogiderimi 120. saatte N-3a izolatu gerçekleştirmiştir(Şekil 4.15 B). Kontroldeki demir(II) giderimi ise % 16,7 olarak ölçülmüştür. Kontrolde gözlemlenen oksidasyon veya besiyerindeki maddelere adsorpsiyon nedeniyle gerçekleşebilecek demir(II) gideriminin sıcaklık artışıyla doğru orantılı seyretmediği söylenebilir.



-A-

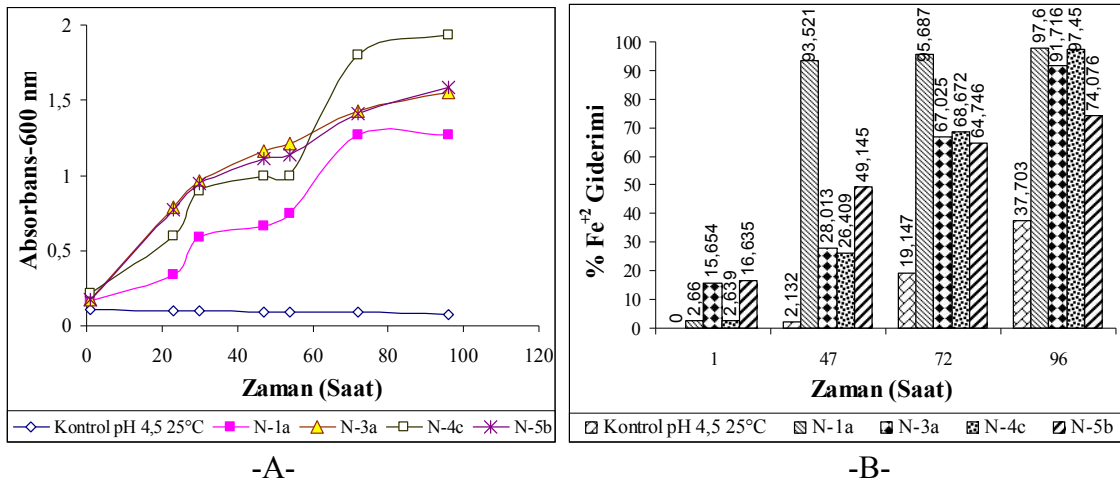
-B-

Şekil 4.15. 37 °C'de 50 ppm Fe⁺² konsantrasyonunda pH 6,0'da üreyen saf kültürlerin üreme eğrisi (A) ve % Fe⁺² giderimi (B)

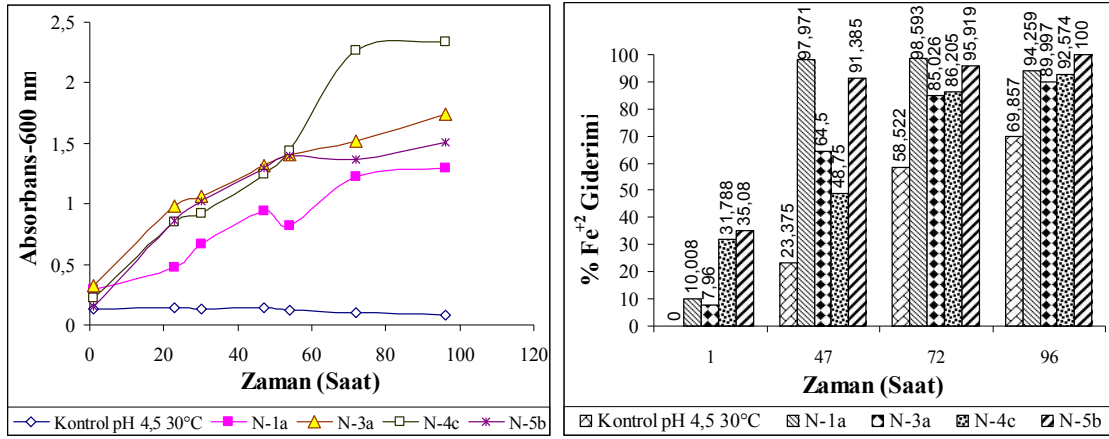
Sıcaklığın izolatların üreme hızları ve demir giderim kapasiteleri üzerindeki etkisi ile ilgili genel bir değerlendirme yapacak olursak özellikle N-1a ve N-3a izolatlarının üreme hızlarının sıcaklıktan daha fazla etkilendiğini söyleyebiliriz. N-3a 25 °C'de çok hızlı çoğalamamış ve durağan faza çok erken girmiştir. N-1a'nın üreme hızı diğerlerine kıyasla daha düşük olmasına rağmen inkübasyonun 120. saatinde diğer izolatlara göre daha yoğun hücre konsantrasyonuna ulaşmıştır. Sıcaklık N-4a ve N-5b'nin üreme hızı üzerinde çok etkili değildir. Buna karşın tüm izolatların demir(II) giderim verimleri 30 °C'de daha yüksek bulunmuştur. Ancak bu sıcaklıkta kontroldeki demir oksidasyonu da yüksektir. N-3a iyi üreme gösterememesine rağmen 25 °C'de en yüksek demir(II) giderimi yapan izolat olarak göze çarpmaktadır. Bu sonuç bize demir(II) gideriminde hücre yoğunluğu dışında başka faktörlerin daha önemli rol oynadığını düşündürmektedir. Benzer bir sonuç pH 4,5'te N-1a'da da gözlemlenmiştir. Bu izolatın üreme hızı 25 °C'de

ve pH 4,5'te de düşük olmasına karşın demir(II) giderim verimi diğer izolatlara kıyasla özellikle inkübasyonun erken saatlerinde çok daha yüksektir (Şekil 4.16. A ve B).

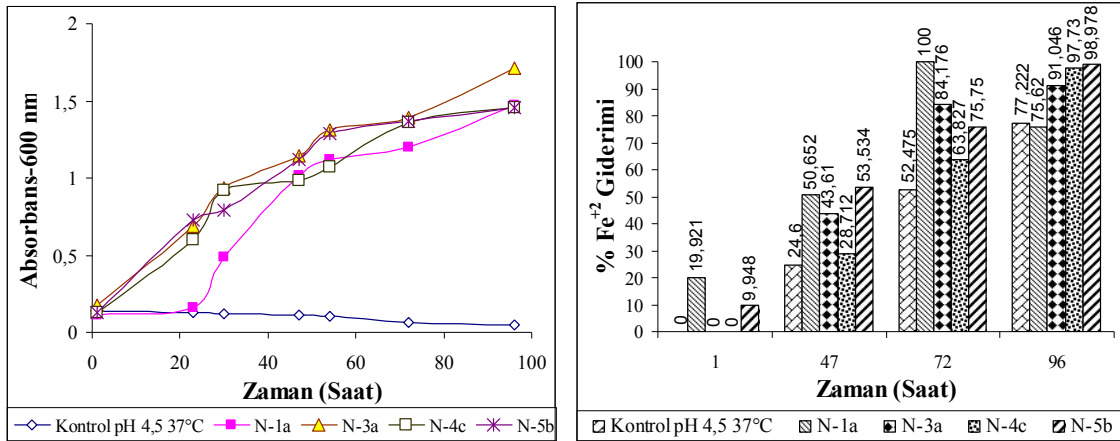
pH 4,5'e düşürüldüğünde beklendiği şekilde hücrelerin, özellikle N-1a'nın, üremesi oldukça yavaşlamıştır. Üreme eğrilerinin önceki deney sonuçları ile kıyaslandığında hücrelerin çalkalanmadan üretilmesinin üreme hızının düşmesinde oldukça önemli bir rolü olduğu görülmektedir. Düşük üreme hızlarına rağmen 96. saatte N-1a, N-3a ve N-4c izolatlarının demir(II) giderim verimi oldukça yüksek (% 90 - % 100 arasında) bulunmuştur (Şekil 4.16). 30 ve 37 °C'lerde ise izolatların çoğunun üreme hızları benzerlik göstermiştir. pH düşüşünden en fazla etkilenen izolat N-1a olmuştur. N-1a sıcaklık 37 °C'ye çıkarıldığında diğerlerinin üreme hızına ulaşabilmiştir. Demir(II) giderim verimi N-1a ve N-5b için 30 °C'de en yüksek değerine ulaşmış ve sırasıyla % 94,3 ve % 100 olarak ölçülmüştür (Şekil 4.17). pH 4,5'te 30 °C'de yapılan deneyde kontrol besiyerindeki giderim oldukça yükselmiştir. Biyogiderim olarak adlandırılmayacak bu demir(II) giderimi çalkalamasız koşullarda azalmıştır ancak pH'nın bu giderimde oldukça etkili olduğu ve pH'nın 4,5'e indirilmesiyle kontroldeki giderimin her zaman arttığı tespit edilmiştir. 37 °C'de ise N-1c izolatının demir giderim kapasitesi oldukça düşmüştür (% 75,62, Şekil 4.18). Bu izolat çalkalanarak üretildiğinde giderimin 30 °C'de % 100 olduğu görülmüştür (Şekil 4.11).



Şekil 4.16. 25 °C'de 50 ppm Fe⁺² konsantrasyonunda pH 4,5'te üreyen saf kültürlerin üreme eğrisi (A) ve % Fe⁺² giderimi (B)



Şekil 4.17. 30 °C’de 50 ppm Fe⁺² konsantrasyonunda pH 4,5’te üreyen saf kültürlerin üreme eğrisi (A) ve % Fe⁺² giderimi (B)

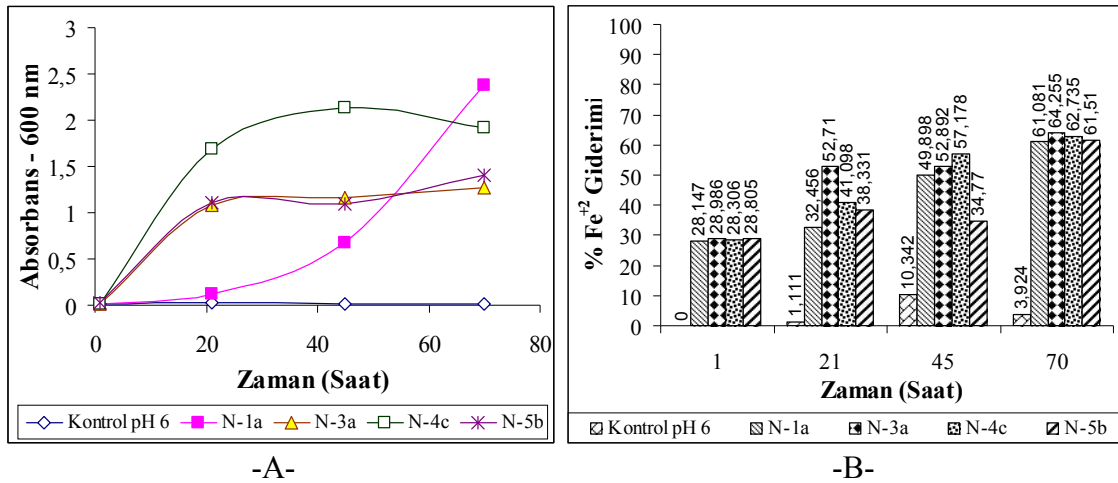


Şekil 4.18. 37 °C’de 50 ppm Fe⁺² konsantrasyonunda pH 4,5’da üreyen saf kültürlerin üreme eğrisi (A) ve % Fe⁺² giderimi (B)

4.3.3. Anaerobik Koşullarda İzolatların Üreme Profilleri ve Demir Giderim Verimleri

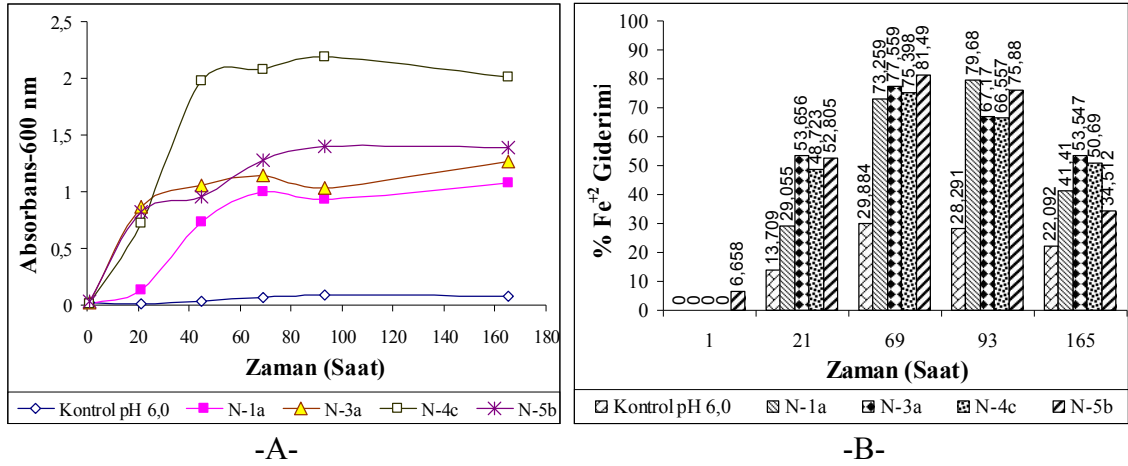
Aerobik koşullarda yaşayabilen mikroorganizmalar son elektron alıcı olarak oksijeni, anaerobik mikroorganizmalar ise inorganik veya organik bileşikleri kullanırlar [http://www.aof.anadolu.edu.tr/kitap/EHSM//1213/unite05.pdf]. Anaerobik koşullar altında yapılan çalışmalarda izolatların üremeleri ve demir(II) giderim kapasiteleri farklı pH’larda incelenmiştir. İzolatların anaerobik arıtım koşullarında da çoğalabilme ve giderim yapabilme potansiyelleri araştırılmıştır.

İzolatlar 30 C°'de anaerobik koşullar altında aerobik koşullara kıyasla daha düşük bir hızla da olsa üreme çoğalabilmişler ve demir(II) giderimi yapabilmişlerdir. pH 6,0'da tüm izolatların çoğalabildikleri ancak N-4c'nin diğerlerine kıyasla daha yüksek bir üreme hızına sahip olduğu görülmüştür. N-1a izolatının alışma fazının çok uzun sürdüğü, inkübasyonun 70. saatinde logaritmik bir şekilde çoğalmayı sürdürdüğü ve tüm izolatlardan daha fazla hücre yoğunluğuna ulaştığı tespit edilmiştir. Tüm izolatlar inkübasyonun 70. saatinde demir(II) gideriminde yaklaşık aynı verimliliği göstermişlerdir (% 61 – 64). Şekil 4.19'da saf kültürlerin üreme eğrisi (A) ve % demir(II) giderim verimlilikleri (B) gösterilmektedir.



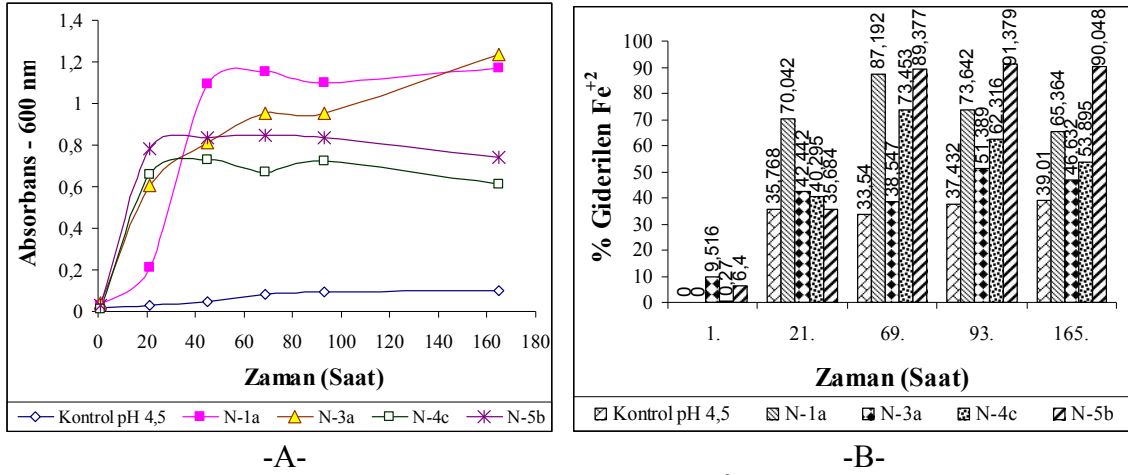
Şekil 4.19. Anaerobik koşullarda 30 °C'de 20 ppm Fe⁺² konsantrasyonunda pH 6,0'da üreyen saf kültürlerin üreme eğrisi (A) ve % Fe⁺² giderimi (B)

Anaerobik koşullar altında demir (II) konsantrasyonunun 50 ppm'e yükseltilmesi sadece N-1a'nın hücre yoğunluğunu negatif yönde etkilemiştir. 20 ppm demir konsantrasyonunda olduğu gibi 50 ppm demir varlığında da N-4c izolatının diğerlerinden daha yüksek üreme hızına sahip olduğu saptanmıştır. N-1a izolatı en düşük hücre yoğunluğuna sahip izolat olmasına rağmen inkübasyonun 93. saatinde en yüksek demir(II) giderim verimliliğine ulaşmıştır. Tüm izolatların giderim verimliliği inkübasyonun 69. ve 93. saatlerinde yaklaşık değerlere ulaşmış inkübasyonun 165. saatinde verimlilikte düşüş gözlemlenmiştir. İnkübasyonun ilerleyen saatlerinde hücrelerin parçalanıp demiri tekrar besiyeri ortamına bıraktıkları düşünülmektedir. İzolatların demir(II) giderim verimliliği inkübasyonun 69. saatinde % 73 – 81 arasında değişmektedir(Şekil 4.20).



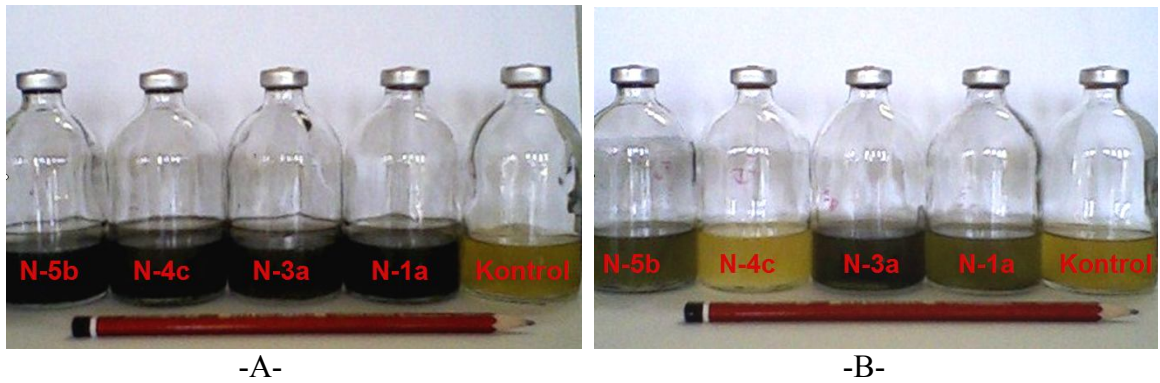
Şekil 4.20. Anaerobik koşullarda 30 °C’de 50 ppm Fe⁺² konsantrasyonunda pH 6,0’da üreyen saf kültürlerin üreme eğrisi (A) ve % Fe⁺² giderimi (B)

Anaerobik koşullar altında 30 °C’de 50 ppm demir konsantrasyonunda pH 4,5’te saf kültürlerin sağlıklı çoğalamadıkları Şekil 4.21 A’da görülmektedir. N3-a, N-4c ve N-5b izolatları inkübasyonun 21. saatinde, N1-a ise 45. saatte durağan faza girmişlerdir. İnkübasyonun 93. ve 165. saatleri arası N-3a izolatının demir(II) giderimi % 62,4’ten % 53,9’a düşmüştür. N-1a izolatı inkübasyonun 21. saatinde latent dönemden yeni çıkmış olmasına rağmen % 70 oranında demir(II) giderimi yapabilmıştır. Bu sonuç N-1a izolatının demir(II) giderim verimliliğinin hücre yoğunluğuna bağlı olmadığını, hücre yüzeyinde bulunan bazı yapılara olan adsorbsiyonun yanı sıra metalin hücre içine transferinin de söz konusu olabileceğini düşündürmektedir. İnkübasyonun 93. ve 165. saatlerinde ise en yüksek demir(II) giderim verimliliğini yaklaşık % 90 oranla N-5b izolatı sağlamıştır. Şekil 4.21’de saf kültürlerin üreme eğrisi (A) ve % demir(II) giderimi (B) gösterilmektedir. Aerobik koşullarda pH 2,8’de izolatlar sağlıklı üreyemedikleri için bu pH’da anaerobik koşullarda üremeye ve demir giderimine bakılmamıştır.



Şekil 4.21. Anaerobik koşullarda 30 °C’de 50 ppm Fe⁺² konsantrasyonunda pH 4,5’da üreyen saf kültürlerin üreme eğrisi (A) ve % Fe⁺² giderimi (B)

Şekil 4.22’de pH 6,0’da anaerobik koşullarda tüm kültürlerde siyahlaşma olduğu görülmüştür. Bu siyahlaşmanın izolatların sülfatı indirgeyerek ortamdaki değişik değerlikli Fe iyonları ile birleşebilen indirgenmiş S formları oluşturmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Demir ile sülfürün birleşmesinden oluşan siyah renkli katı tanecikler FeS₂ (pirit) veya FeS (pirotin) adı verilen oluşumlardır. pH’nın düşürülmesi N-4c ve N-1a izolatları için siyah renk oluşumunu yavaşlatmıştır. Aerobik koşullarda ise kültürlerde sülfat indirgenmesinin ve siyah renk oluşumunun daha yavaş seyrettiği görülmüştür.



Şekil 4.22. Anaerobik şartlarda 30 °C’de 50 ppm Fe⁺² konsantrasyonunda pH 6,0’da (A) ve pH 4,5’te izolatlarda gözlenen siyah renk oluşumu

Kontrol besiyerlerindeki demir giderimi bakterilerden kaynaklanan bir giderim olmadığı için bakteri kaynaklı biyogiderimin kıyaslanabilmesi amacıyla kontrol besiyerindeki

giderim verimi bakteri kültürlerinde elde edilen giderim veriminden çıkarılmıştır. Çizelge 4.1’de tez kapsamında etkisi incelenen tüm koşullarda izolatların inkübasyon sonundaki giderim verimleri kıyaslanmıştır. Genel olarak tüm izolatlar için en yüksek biyogiderim verimi kültürler çalkalanmadan üretildiklerinde 50 ppm demir (II) varlığında, pH 6.0’da ve 37 °C’de elde edilmiştir. Bu koşullarda en yüksek biyogiderim verimi (% 80,7) N3a izolatına aittir. Çalkalamasız inkübasyonda tüm sıcaklıklarda biyogiderim verimi çalkalamalı koşullara kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuç çalkalamalı koşullarda kültürlerin havalandırılması nedeniyle demir oksidasyonunu arttığını ve bu nedenle kontrol besiyerindeki demir gideriminin yüksek çıktığını göstermektedir. Anaerobik koşullarda ise bakterilerin yüksek demir (II) varlığında biyogiderim kapasiteleri düşmüştür. 50 ppm demir (II) varlığında ve asidik koşullarda en yüksek biyogiderim N-5b izolatı tarafından gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı koşullarda izolatların biyogiderim verimleri

		Çalkalanarak, 30 °C 20 ppm*			Çalkalanarak, 30 °C 50 ppm*			Çalkalamasız, 50 ppm*, pH 6,0			Çalkalamasız, 50 ppm*, pH 4,5			Anaerobik Koşullarda 30 °C		
		pH 6,0	pH 4,5	pH 2,8	pH 6,0	pH 4,5	pH 2,8	25°C	30 °C	37°C	25°C	30 °C	37°C	pH 6,0 20 ppm	pH6,0 50 ppm	pH4,5 50 ppm
İzolatlar	N-1a	%24,52	%55,05	-%4,42	%28,67	%46,11	%40,7	%48,83	%62,75	%73,62	%59,9	%24,4	-%1,6	%57,16	%19,32	%26,35
	N-3a	%8,98	%34,31	%26,80	%28,55	%41,68	%30,86	%63,85	%52,17	%80,28	%54,01	%20,14	%13,82	%60,33	%31,46	%7,62
	N-4c	%25,54	%27,08	%23,2	%34,04	%34,46	%21,35	%62,67	%52,64	%67,08	%59,75	%22,72	%20,51	%58,81	%28,6	%14,89
	N-5b	%30,08	%68,11	%15,08	%33,39	%39,48	%38,32	%61,11	%52,35	%75,19	%36,37	%30,14	%21,76	%57,59	%12,42	%51,04

*ppm değerleri besiyerindeki demir (II) konsantrasyonunu belirtmektedir.

4.4. Yüksek Demir(II) Giderimi Gösteren İzolatları Tanımlama Çalışmaları

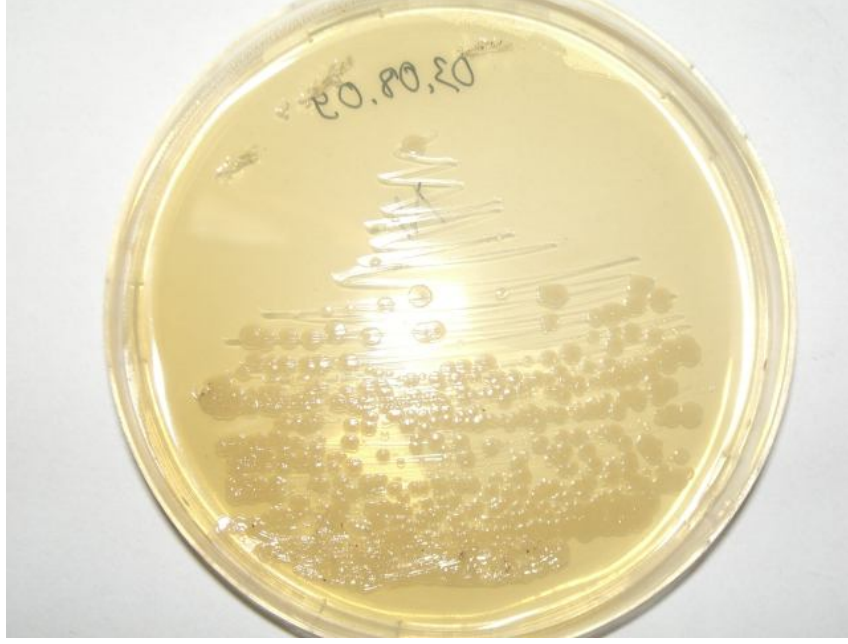
4.4.1. Koloni Morfolojilerinin Kıyaslanması

Tezin bu kısmında karışık kültürlerden elde edilen izolatlar LA besiyerine yayılarak ekilmiş, 30 °C’de 48 saat inkübasyona tabi tutulduktan sonra agarlı besiyeri üzerinde izolatlara ait koloni oluşumları gözlenmiştir. İzolatların oluşturduğu kolonilerin büyüklüğü ve şekilleri incelenerek koloni morfolojileri belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Yüksek demir(II) giderimi gösteren ve tez çalışmasında incelenen izolatlar olan N-1a, N-3a, N-4c ve N-5b’nin kolonilerine ait resimler Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24 ve Şekil 4. 25’te gösterilmektedir.

Çizelge 4.2. Saf kültürlerin koloni morfolojilerine ait özellikler

Saf Kültür	Koloni Rengi	Koloni morfolojisi
N-1a	Krem beyaz renkli, Sümüksü yapı	Yuvarlak, Yassı
N-1b	Şeffaf, Turuncumsu	Yuvarlak, Çok küçük
N-3a	Beyaz renkli, Yarı şeffaf	Yuvarlak, Ortası kalkık
N-3b	Açık sarı renkli	Yuvarlak, Ortası kalkık
N-4a	Şeffaf, Koyu turuncu	Yuvarlak, Ortası kalkık
N-4b	Beyaz renkli, Mat, Sümüksü yapı	Yuvarlak, Yassı
N-4c	Krem beyaz renkli, Sümüksü yapı	Yuvarlak, Yassı
N-4d	Grimsi	Yuvarlak, Çok küçük
N-5a	Beyaz renkli, Mat, Sümüksü yapı	Yuvarlak, Yassı
N-5b	Krem beyaz renkli, Sümüksü yapı	Yuvarlak, Yassı



Şekil 4.23. N-1a izolatına ait koloniler



Şekil 4.24. N-3a izolatına ait koloniler



Şekil 4.25. N-4c izolatına ait koloniler

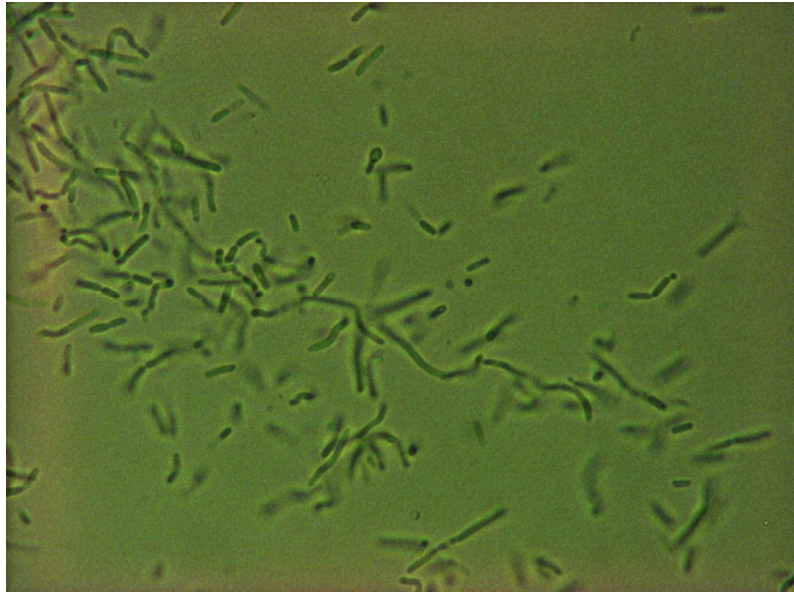


Şekil 4.26. N-5b izolatına ait koloniler

4.4.2. İzolatların Işık Mikroskopunda İncelenmesi

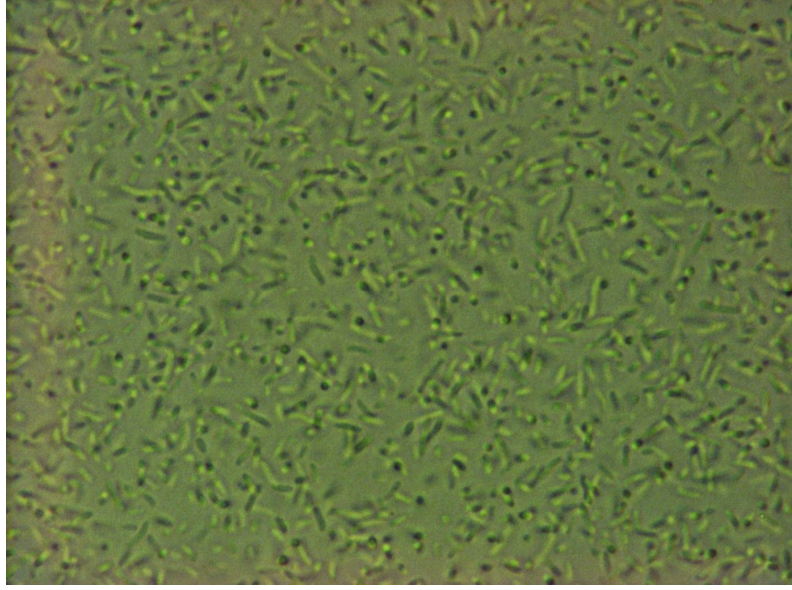
Yüksek demir(II) giderimi gösteren N-1a, N-3a, N-4c ve N-5b izolatlarının tanımlanmasına yönelik olarak, her bir kültürün hücre yapıları belirlenmeye çalışılmıştır. LA besiyerinden alınan örnekler Zeiss Primo Star Axio Cam model mikroskop altında da incelenmiş ve hücre yapıları görüntülenmiştir. 100X (oil immersiyon) merceği kullanılarak izolatların hücre boyutları ve şekilsel yapıları gözlemlenmiştir.

Şekil 4.27’da katı besiyerinden alınan N-1a izolatının mikroskoptaki görüntüsü verilmiştir. N-1a hücrelerinin hareketli ve uzun çubuk şeklinde olduğu görülmüştür.



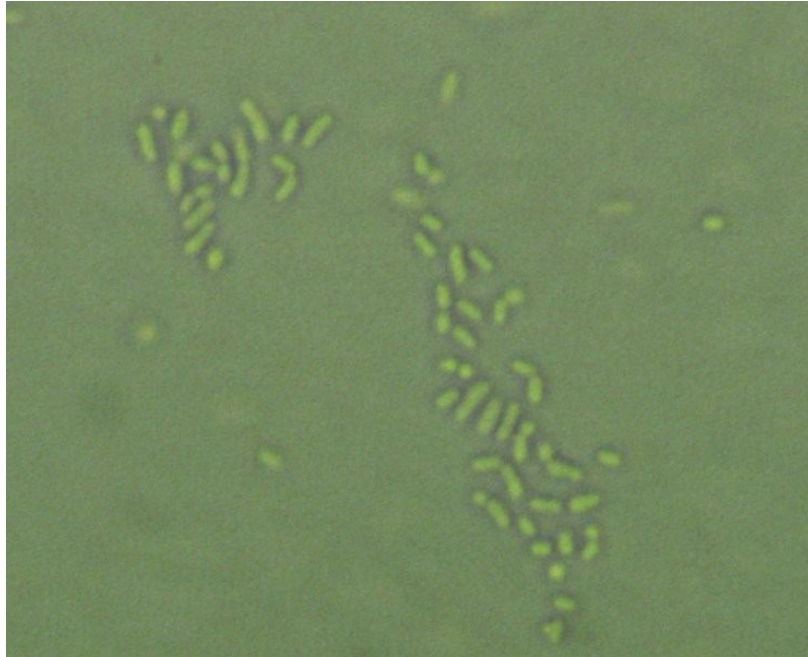
Şekil 4.27. N-1a izolatının ışık mikroskopunda 100X objektif ile alınan görüntüsü

N-3a izolatının katı besiyerinden alınan mikroskoptaki görüntüsü Şekil 4.28’de verilmektedir. N-3a izolatının hücreleri çok hareketli ve çubuk şeklindedir.



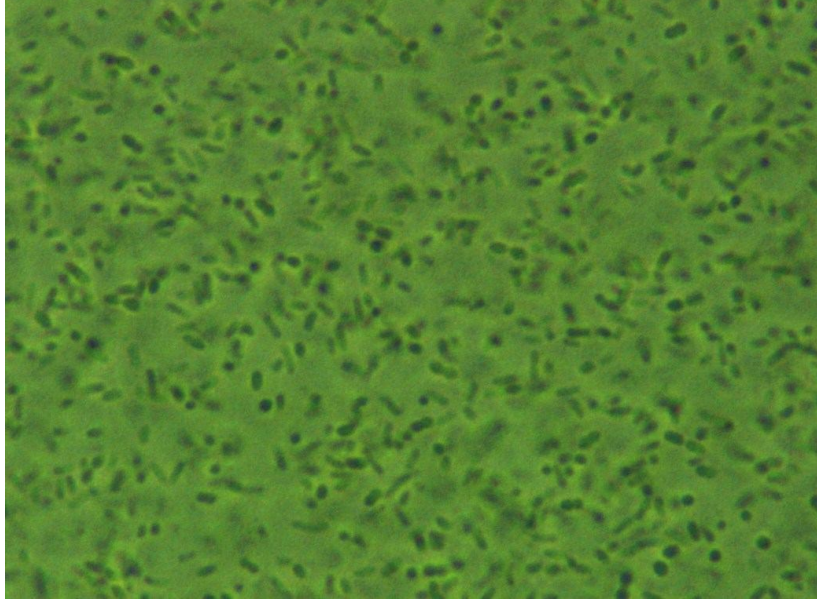
Şekil 4.28. N-3a izolatının ışık mikroskobunda 100X objektif ile alınan görüntüsü

N-4c izolatının hücrelerinin N-1a ve N-3a izolatlarının hücrelerine kıyasla daha az hareketli olduğu, kısa ve tombul çubuk şeklinde oldukları tespit edilmiştir (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. N-4c izolatının ışık mikroskobunda 100X objektif ile alınan görüntüsü

Şekil 4.30'da katı besiyerinden alınan N-5b izolatının mikroskoptaki görüntüsü görülmektedir. N-5b hücreleri hareketli kokobasiller şeklinde görüntülenmişlerdir.



Şekil 4.30. N-5b izolatının ışık mikroskobunda 100X objektif ile alınan görüntüsü

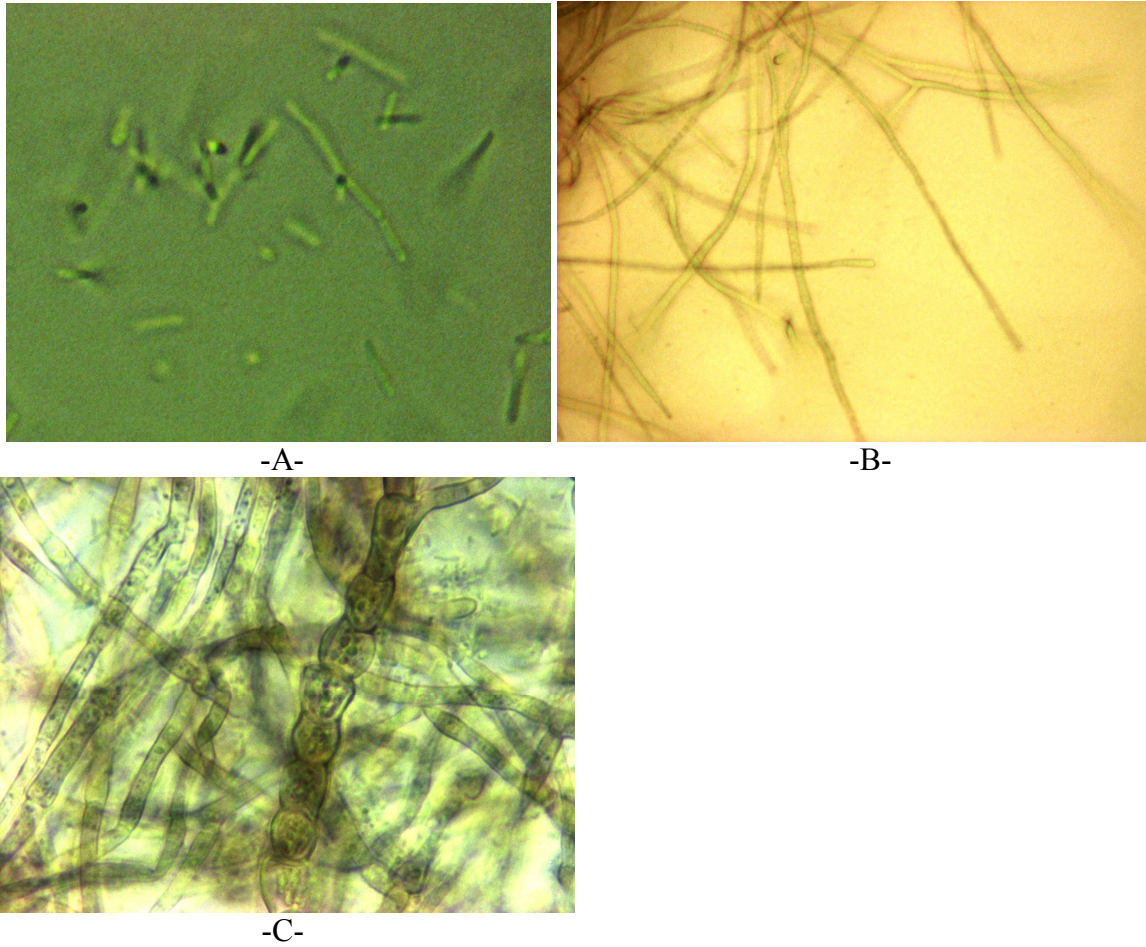
Koloni morfolojileri ve mikroskopik incelemeler sonucunda izolatların maya veya mantar sınıfına giren diğer mikroorganizmalar olmadığı bakteri sınıfına giren mikroorganizmalar olduğu görülmüştür. Bu izolatların cins ve türleri ise daha detaylı karakterizasyon çalışmaları sonucunda anlaşılabilecektir.

Mikroskopik incelemelerde N-1a izolatının pH'sı 4,5 olan ve 20 ppm demir(II) içeren ortamda inkübasyonun 7. gününde yavaş yavaş uzayarak segmentli filamentler oluşturduğu görülmüştür (Şekil 4.31. A, B, C). Bu bakterinin asidik ortamları sevmemesi, anaerobik ortamda ise bu pH'da diğerlerine kıyasla daha hızlı üremesi ve filament oluşturması nedeniyle sıra dışı bir tür olabileceği düşünülmektedir. Literatürde filament oluşturan bakteriler ile ilgili bilgiler verilmiş ve bu tip bakterilere örnek olarak *Desulfonema limicola*, *Beggiota*, *Thiotrix* ve *Sphaerotilus natans* gibi bakterilerin filament görüntüleri verilmiştir.

N-1a'nın filament yapısı içinde görülen koyu renk granüllerin demir ve sülfür içeren pirit benzeri yapılar olduğu düşünülmektedir (4.31 B). Filamentlerin yapısı *Desulfonema* ve *Beggiota*'nın filamentleri ile kıyaslandığında N-1a'nın filament yapısının daha kalın olduğu ve büyümenin geç saatlerinde oluşan segmentlerin daha belirgin olduğu göze çarpmaktadır. N-1a izolatının inkübasyonun geç saatlerinde filament oluşturması oksijen

ve besinlerin azalması nedeniyle oluşan zor koşullara karşı geliştirilen savunma mekanizması olabilir.

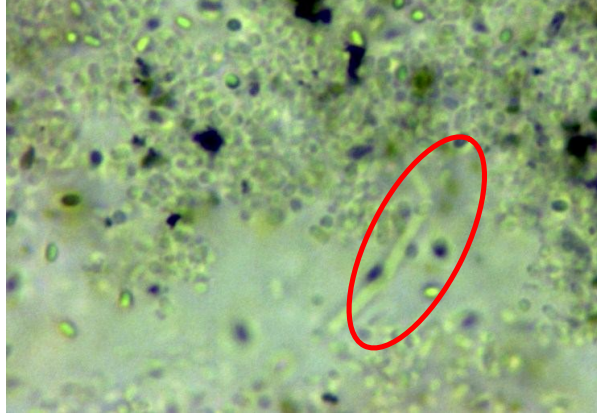
Şekil 4.31’de 30 °C’de 20 ppm demir(II) konsantrasyonda pH 4,5’te üretilmiş olan N-1a hücrelerinin oluşturduğu segmentli filament yapı net olarak görülmektedir. 37 °C’de 50 ppm demir(II) konsantrasyonunda ve pH 6,0’da N-1a hücreleri uzamasına rağmen filament yapı gözlenmemiştir.



Şekil 4.31. N-1a izolatının 20 ppm Fe(II) varlığında pH 4,5’te ve 30 °C’de filament formasyonu (7. gün) (A) 100x objektif ile (B) 40x objektif ile filament oluşumunun başlaması görüntüsü (C) 40x objektif ile filament oluşumu görüntüsü

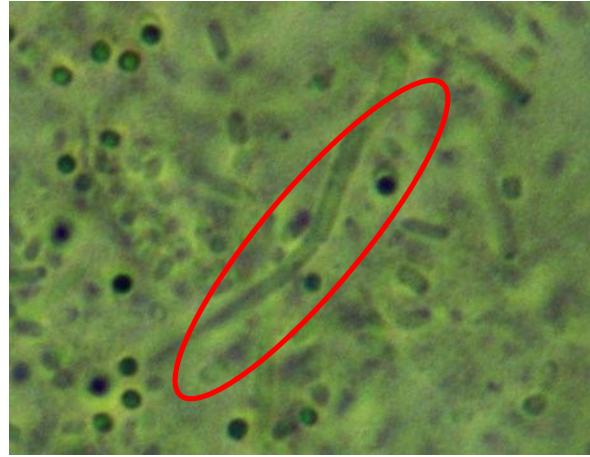
Filament oluşumu yalnızca N-1a izolatında gözlenmesine rağmen hücre uzamasının yalnızca N-1a’ya ait bir özellik olmadığı N-4c ve N-5b hücrelerinin de inkübasyonun ileriki saatlerinde uzadıkları görülmüştür. Şekil 4.32’de 37 °C’de pH 6,0’da ve 50 ppm

demir(II) varlığında belirgin bir uzama gösteren N-4c izolatına ait bir hücre görülmektedir.



Şekil 4.32. pH 6,0'da 37 °C de 50 ppm Fe(II) varlığında uzama gösteren N-4c hücrelerinin 100X objektifle çekilmiş görüntüsü (8. gün)

Şekil 4.33'te 30 °C'de 50 ppm demir(II) konsantrasyonunda ve pH 4,5'te uzama gösteren N-5b hücreleri görülmektedir.



Şekil 4.33. pH 4,5'te 30 °C de 50 ppm Fe(II) varlığında uzama gösteren N-5b hücrelerinin 100X objektifle çekilmiş görüntüsü (8. gün)

Anaerobik inkübasyon koşullarında ise N-1a izolatı da dahil olmak üzere hiçbir kültürde hücre uzaması veya filament oluşumu gözlemlenmemiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllarda fazla demir içeren atık suların arıtımında demirin kimyasal maddeler ile oksidasyonununa alternatif olarak daha ekonomik ve temiz bir proses olan biyoarıtım prosesine yönelik çalışmalar yapılmakta ve biyoarıtımın avantajları ortaya konmaktadır. Biyooksidasyon verimini artırmak için çeşitli reaktör konfigürasyonları geliştirilmekte ve proseste kullanılacak etkin mikroorganizmalar keşfedilmeye çalışılmaktadır.

Bu çalışmada, endüstride yaygın kullanımı olan ve aşırı miktarları çevre sağlığını tehdit eden demir metalinin biyogiderimi araştırılmış, arıtım amacıyla kullanılabilecek demir metaline dirençli mikroorganizmalar izole edilmiştir. Metal kirliliğinin yoğun olduğu bölgelerden alınan toprak numunelerinden izole edilen mikroorganizmaların demir (II) giderim kapasiteleri farklı koşullar altında incelenmiştir. Yüksek demir (II) giderimi gösteren dört izolat (N-1a, N-3a, N-4c, N-5b) üzerinde iki farklı Fe^{+2} konsantrasyonu (20 ppm, 50 ppm), üç farklı pH (pH 6,0, pH 4,5, pH 2,8) ve üç farklı sıcaklık (25 °C, 30 °C, 37 °C) değerinin etkisinin yanı sıra çalkalanma ve anaerobik koşulların etkisine de bakılmıştır. Farklı koşulların izolatların giderim kapasitesine olan etkilerinin tespiti ile arıtım sistemlerinde değişim gösterebilecek parametrelerin demir gideriminde ne derece etkili olabileceğine dair ip uçları elde edilmiştir.

Demir gideriminin pH 2,8 de mikroorganizmaların sağlıklı üreyememesi nedeniyle düşük olduğu pH 4,5'te ise giderim veriminin pH 6'ya kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. İzolatların farklı pH'larda üreme hızları ve demir giderim kapasiteleri kıyaslandığında pH'nın üreme ve giderim verimi üzerindeki etkisinin birbirine bağlı olmadığı söylenebilir. pH'nın katyonların yüzeye yapışmalarında önemli bir faktör olduğu bilinmektedir. Bu etken izolatların pH 4,5 ve pH 6,0'da benzer üreme profili göstermelerine rağmen pH 4,5'te yaklaşık iki kat daha fazla demir (II) giderim verimine ulaşmalarının nedeni olabilir.

20 ppm demir (II) içeren besiyerlerinde yapılan deneyler sonucunda izolatlar arasında N-5b'nin pH 6,0 ve pH 4,5'te diğer izolatlara kıyasla daha yüksek bir giderim verimi sağladığı tespit edilmiştir. N-3a izolatının ise test edilen en düşük pH değerinde (pH 2,8) daha yüksek demir (II) giderimi yaptığı görülmüştür. Demir miktarı 50 ppm'e

yükseltildiğinde tüm kültürlerde inkübasyonun ilk saatinde demir giderimi gerçekleşmiş, erken saatlerde gözlemlenen bu giderim özellikle 30 °C de ve pH 6,0'da N-1a kültüründe çok yüksek bulunmuştur. N-4c için ise optimum üreme sıcaklığı pH 4,5'te 30 °C olarak tespit edilmiştir. Deney sonuçları incelendiğinde N-4c'nin diğer izolatlara kıyasla asidik ortama daha toleranslı olduğu gözden kaçmamaktadır.

Sıcaklığın etkisi incelendiğinde 30 - 37 °C de demir (II) gideriminin yüksek olduğu 25 °C de ise düştüğü görülmüştür. Düşük sıcaklıkta gerekli enzimlerin veya hücre dışı yapıların daha az sentezlenmesi ve hücre miktarındaki azalma sıcaklığın düşmesi ile birlikte gözlenen düşüşün nedenleri arasında sayılabilir. 25 °C de en yüksek demir giderimini sağlayan izolat N-3a olarak görülmektedir. N-3a izolatının bu sıcaklıkta iyi üreme gösterememesine rağmen yüksek demir giderimi sergilemesi demir oksidasyonu üzerinde hücre yoğunluğu haricinde başka faktörlerin de etkili olduğunu düşündürmektedir. pH 4,5'te N-1a izolatında da benzer bir sonuca rastlanmıştır. 25 °C'de ve pH 4,5'te N-1a izolatının hücre yoğunluğu düşük olmasına rağmen demir(II) giderimi diğer izolatlara göre daha yüksektir.

Anaerobik koşullar altında 30 °C'de 50 ppm demir konsantrasyonunda saf kültürlerin pH 6,0 ve pH 4,5'teki üreme profillerine genel olarak bakıldığında N-1a izolatının çoğalmak için asidik ortamı tercih ettiği söylenebilir. N-3a ve N-5b izolatları her iki pH değerinde benzer bir üreme profili göstermişlerdir. N-5b izolatı farklı pH değerlerinde aynı üremeyi sağlamasına rağmen asidik ortamda demir(II) giderim oranının % 90'a çıktığını görmekteyiz. N-4c izolatının ise pH düşüşünden negatif yönde etkilendiği göze çarpmaktadır. Aerobik koşullarda farklı pH'larda N-1a ve N-4c izolatlarının üreme profillerinde bu tür bir değişim gözlenmemiştir.

Literatür kısmında da belirtilmiş olduğu gibi hücrelerin üretmiş oldukları bazı maddeler (örneğin hücre dışına salgılanan egzopolimerler ve hücre yüzeyindeki sümüksü tabaka gibi) metal gideriminde etkili ajanlardır. N-1a kültüründe ve diğer kültürlerde ilk saatte ortamdaki demirin büyük bir kısmının tutulmasının nedenlerinden biri hücrelerin üretmiş oldukları dış yüzeylerindeki sümüksü ve yapışkan tabakaları olabileceği düşünülmektedir. Hücre dış yapılarına adsorbsiyonun dışında diğer demir giderim mekanizmaları ise demir (II)'nin okside edilerek çökmesi, sidrofor ve başka hücresel

yapılar yardımı ile hücre içine alınarak depolanmasıdır. İzolatların demiri hangi mekanizma ile giderdikleri ileriye dönük çalışmalarla belirlenecektir.

Demir oksidasyonunun genellikle diğer elementlerin, özellikle mangan ve amonyağın, ortamda bulunmasından etkilendiği farklı çalışmalarda rapor edilmiştir [Gouzinis et al., 1998; Tekerlekopoulou et al., 2006]. Bu tez çalışmasında kullanılan besiyeri kompleks ve zengin bir besiyeri olup içinde azot kaynağı olarak pepton, karbon ve azot kaynağı olarak maya özütü ve ayrıca ozmotik basıncı ayarlamak için tuz (NaCl) içermektedir. Pepton ve maya özütü değişik mineral ve vitaminleri de içeren zengin besin kaynaklarıdır. Ancak bu zengin besiyerinde bulunan farklı maddelerin Fe^{+2} iyonlarına bağlanması mikroorganizma içermeyen kontrol besiyerlerinde demir (II) miktarında düşüş gözlenmesine neden olmuş olabilir. Özellikle proteinlerin peptid bağlarındaki azot ve oksijen ile hidroksil, amino, fosfat gibi fonksiyonel gruplar metal iyonları ile yer değiştirebilecek uygun yapılardır. Kontrol besiyerlerinde görülen demir (II) gideriminin başka bir sebebi de havadan kaynaklanan oksidasyon olabilir. 25 °C de ve pH 6,56'nın altındaki pH değerlerinde havadaki O_2 'den kaynaklı bir demir oksidasyonu beklenmemektedir (Sf: 10, Şekil 2.1). Ancak tez çalışmasında yapılan deneylerde asidik pH'larda ve 25 °C de kontrol besiyerinde demir giderimi gözlemlenmiştir. Bazı istisnai sonuçlar olmasına rağmen sıcaklığın düşürülmesi, kültürlerin çalkalanmadan üretilmesi ve anaerobik şartların sağlanması kontroldeki demir oksidasyonunun azalmasını sağlamıştır. Ancak kontrollerdeki demir giderimi pH'nın düşürülmesi ile düşmemiştir. Besiyerindeki demir konsantrasyonunun yükseltilmesi ise kontrol solüsyonlarındaki demir (II) giderimini yükseltmiştir. 20 ppm demir konsantrasyonunda mikroorganizmaların biyogiderim verimleri % 50'yi geçememesine rağmen demir konsantrasyonu 50 ppm'e yükseltildiğinde biyogiderim verimi % 80'e kadar çıkmıştır. Bu nedenle ortamdaki demir, demir giderimi için gerekli olan bazı hücre bileşenlerinin sentezlenmesinde uyarıcı bir etkiye sahip olabilir.

Tez çalışması kapsamında izole edilen mikroorganizmaların katı besiyerinde farklı büyüklükte ve yapıda koloniler oluşturmuşlardır. İzolatların hücre şekilleri ışık mikroskobu altında incelendiğinde farklı boyutlara sahip çubuk şeklinde bakteriler oldukları görülmüştür. Mikroskop ile yapılan incelemelerde demir içeren besiyerinde üreyen izolatların bir haftalık inkübasyon sonunda hücre morfolojilerinin değiştiği görülmüştür. N-5b ve N-4c hücrelerinin inkübasyonun yedinci gününde sadece uzama

gösterdiği, N-1a'nın ise segmentli filamentler oluşturduğu görülmüştür. İnkübasyonun geç saatlerinde filament oluşması oksijen ve besinlerin azalması nedeniyle N-1a izolatının oluşan zor koşullara karşı geliştirdiği bir mekanizma olabilir. Literatürde var olan bazı filamentli bakterilerin mikroskoptaki görüntüleri incelenmiş ve N-1a izolatının filament yapısı ile kıyaslanmıştır. N-1a izolatının asidik ortamı sevmemesi ve anaerobik ortamda pH 4,5'te diğer izolatlarla kıyasla daha hızlı üremesi ve oluşturduğu filament yapının literatürde bulunan diğer filamentli mikroorganizmalarınkinden farklı olmasından dolayı bu izolat değişik bir tür olabilir. N-1a'nın filament yapısı içinde görülen koyu renk granüllerin demir ve sülfür içeren pirit benzeri yapılar olduğu düşünülmektedir. Bu tez çalışması kapsamında izole edilen ve demir giderimi yapabilen bakterilerin hangi cins ve türe ait oldukları ileriki çalışmalarda 16SrRNA gen dizileri belirlenerek tespit edilecektir.

KAYNAKLAR

Ağcasulu, Ö., Sakarya Nehri Çeltikçe Çayı'nda Yasayan *Capoeta tinca* (Heckel, 1843)'nın Dokularında Ağır Metal Birikiminin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2007

Akpınar, D., Endüstriyel Atık Sulardaki Fenol ve Ağır Metal İyon Karışımlarının Adsorpsiyon / Biyosorpsiyonunun Karşılaştırmalı İncelenmesi, Yüksek Mühendislik Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 1998

Aksu, Z., Kutsal, T., A comparative study for biosorption characteristics of heavy metal ions with *Chlorella vulgaris*, Environmental Technology, 11: 979-987, 1990

Alp, T., Ağır Metal Kirliliği İçeren Atıksularda Çeşitli Türdeki Maya Ve Küf Mantarı Hücrelerinin Büyüme Kinetiğinin ve Metal Biyobirikimi İle Biyosorpsiyonunun Karşılaştırmalı İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sf: 10, 2007

Anadolu Üniversitesi, Mikroorganizmaların Üretildiği Ortamlar, <http://www.aof.anadolu.edu.tr/kitap/EHSM//1213/unite05.pdf>

Arda, M., Temel Mikrobiyoloji, Medisan Yayınları, 2000

Artan, R.O., Ağır Metal İçeren Atık Suların İleri Arıtımında Su Mercimeği (*Lemna sp.*) Bitkisinin Kullanılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2007

Beveridge, T. J. ve Murray, R. G. E., Sites of metal deposition in the cell wall of *Basillus subtilis*, J. Bacteriol., 141, 876, 1980

Beveridge, T. J., The role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization, Annual Review of Microbiol., 43:147–171, 1989

Boysan, F., Poliüre-Poliamin Reçinesi Kullanılarak Atıksulardaki Ağır Metal Kirliliğinin Adsorpsiyonla Gideriminin İncelenmesi, Doktora Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sf: 5-12, 2008

- Brady, D. and Duncan, J.R. Binding of heavy metals by the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*, *Enzyme Microbiology Technology*, July 1994
- Cameselle, C., Ricart, M.T., Núñez, M.J., Lema, J.M., Iron Removal From Kaolin. Comparison Between ‘in situ’ and ‘two-stage’ Bioleaching Processes, 2002
- Cossich, E.S., Tavares, C.R.G., Ravagnani, T.M.K., Biosorption of chromium (III) by *Sargassum sp.* *Biomass, Process Biotechnology*, 5(2):133-141, 2003
- Corstjens, P. L., de Vrind, J. P., Westbroek, P., and de Vrind-de Jong, E. W., Enzymatic iron oxidation by *Leptothrix discophora*: identification of an iron-oxidizing protein, Department of Biochemistry, Leiden University, The Netherlands, 1992
- Corstjens, P.L. and Muyzer, G., Phylogenetic analysis of the metal-oxidizing bacteria *Leptothrix discophora* and *Sphaerotilus natans* using 16S rDNA sequencing data, *Systematic and Applied Microbiology*, p: 219-223, 1993
- Czekalla C, Mevius W & Hanert H., Quantitative removal of iron and manganese by microorganisms in rapid sand filters (*in situ* investigations). *Wat. Supply* 3: 111–123, 1985
- Çabuk, A., Akar, T., Kotluk, Z., Şaşmaz, S., *Saccharomyces cerevisiae* Hücreleri ile Ağır Metal Giderimi ve Metal Toleransı, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, Cilt: 05 Sayı: 3 Sayfa: 1-7, 2007
- Çepel, N., *Temel Çevre Sorunları*, 1997
- Dimitrakos- Michalakos, G., Martinez, J. N., Vayenas, D.V., Lyberatos, G., Removal of iron from potable water using a trickling filter, *Water Res.*, p: 991-996, 1997
- Dursun, A.Y., Uslu, G., Cuci, Y., Aksu, Z., Bioaccumulation of Cu(II), Pb(II) and Cr(VI) by growing *Aspergillus niger*, *Process Biochemistry*, 38, p:1647-1651, 2003
- Förstner, G., Wlttmann, T., “Metal pollution in the aquatic environment, Berlin Heidelberg”, *Newyork Springer Verlag*, 3, 21, 271-318, 1981
- Gagnon, S., Jefferson Lab, *The Elemental Iron*, 2009

Gavrilescu , M., Removal Of Heavy Metals From Environment By Biosorption, Eng. Life Science, p: 219-232, 2004

Ghiorse, W.C., Biology of iron-and manganase depositing bacteria: Annual Review of Microbiology, 38, p: 515-550, 1984

Gislette, P., Mouchet, P., Iron, manganese and ammonia removal in drinking water: the biological treatments, International Workshop on Iron and AIDIS, Buenos Aires, Argentina (in Spanish), 1997

Gouzinis, A., Kosmidis, N., Vayenas, D.V., Lyberatos, G., Removal of Mn and simultaneous removal of NH₃, Fe and Mn from potable water using a trickling filter, Water Res., p 2442-2450, 1998

Hallbeck, L. and Pedersen, K., Autotrophic and mixotrophic growth of *Gallionella ferruginea*, Department of General and Marine Microbiology, University of Göteborg, Sweden, 1991

Hahn, M. W. , Moore, E. R. B., Höfle, M. G., “Bacterial Filament Formation, a Defense Mechanism against Flagellate Grazing, Is Growth Rate Controlled in Bacteria of Different Phyla” Applied and Environmental Microbiology, p. 25-35, Vol. 65, No. 1, January 1999

<http://images.google.com.tr/imgres.imgurl=http://faculty.plattsburgh.edu/jose.deondarza/MicroWorld/Bugs.jpg>

İleri, R., Sümer, B., Şengörür, B., Biyosorpsiyon Kinetiği Ve İzotermlerinin Araştırılması, Sakarya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Dergisi, 7. Sayı, 1993

İnönü Üniversitesi, Ders notları, <http://stu.inonu.edu.tr/~sguzel/demirelementi.htm>

Jordanov, S., Maletii, M., Dimitrov, A., Slavkov, D., Paunovii, P, Waste waters from copper ores mining/flotation in ‘Bucbim’ mine: characterization and remediation, Faculty of Technology and Metallurgy, University UKIM Skopje, Macedonia, 2007

Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S., İstanbul Teknik Üniversitesi, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü, Metallerin Çevresel Etkileri, Metalurji Dergisi, Sayı 136, sf 47-53, 2003, İstanbul

Kırlı, L., Çevre Mühendisleri İçin Mikrobiyoloji, Kocaeli Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, sf:171-173, 2001

Kobyay, M., Su ve Atıksu Arıtımında Proses Kimyası, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Bölümü, 2001

Korac, M. and Kamberovic, Z., Characterization of wastewater streams from Bor Site, p: 412 – 414, 2005

Köseoğlu, D., Mikrobiyolojik Demir Arıtımı, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Bölümü, 2005

Kratochvil, D., Volesky, B., Advantages in biosorption of heavy metals, Tib tech, 16:291-300, 1998

Lale, M., Şahin, N., Temoçin, Z., Fe^{2+} İyonlarının *Saccharomyces Cerevisiae* İmmobilize Edilmiş Ponza Taşı İle Adsorpsiyonu, Kırıkkale Üniversitesi, 2005

Lee, E., Cho, K., Ryu, H., Chang, Y., Microbial Removal of Fe(III) Impurities from Clay Using Dissimilatory Iron Reducers, 1998

Macaskie, L. E., Dean, A. C. R., Cadmium accumulation by a *Citrobacter sp.*, J., Gen Microbiology, 130, 53, 1984

Macaskie, L. E., Dean, A. C. R., Use of immobilized biofilm of *Citrobacter sp.* for the removal of uranium and lead from aqueous flows, *Enzyme Microbial. Technol.*, 1987

Maden Mühendisleri Odası, Demir-Çelik Sektörü Raporu, Yayınlanma Tarihi:28.12.2005, <http://www.maden.org.tr>

Maier, R.M., Pepper, I.L., Gerba, C.P., Environmental Microbiology, Academic press, pp. 403-423, United States of America, 2000

Mesa, M. M., Macias, M., Cantero, D., Mathematical model of the oxidation of ferrous iron by a biofilm of *Thiobasillus ferrooxidans*, Biotechnology Prog., p 679-685, 2002

Mouchet, P., From conventional to biological removal of iron and manganese in France, Journal of American Water Works Association, 84, 4, p:158-167, 1992

Mouchet, P., Biological filtration for iron and manganese removal: some case studies, Water Quality Technology Conference, New Orleans, 1995

Muslu, Y., Su Temini ve Çevre Sağlığı, Cilt III, sf:527, İstanbul, 1985

Müller, D. B., Wang, T., Duval, B., Graedel, T. E., Exploring the engine of anthropogenic iron cycles, Mineral commodity summaries, 2006

Nemati, M., Harrison, S.T.L., Hansford, G.S., Webb, C., Biological oxidation of ferrous sulphate by *Thiobasillus ferrooxidans*: a review on the kinetic aspects, Biochemistry Eng. J., p 171-190, 1998

Nemati, M., Webb, C., Combined biological and chemical oxidation of ferrous sulphate using immobilized *Thiobasillus ferrooxidans*, J. Chem. Technology Biotechnology, p 562-570, 1999

Norberg, A. & Persson, H., Accumulation of heavy metals ions by *Zoogloea ramigera*. Biotechnol. Bioeng., 1984

Nuzhat, A., Uzma, B., Ralhan, S., Industrial and environmental biotechnology, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK, 81-102, 2001

Öztürk, İ., Anaerobik Biyoteknoloji ve Atık Arıtımındaki Uygulamaları, İ.T.Ü. İnşaat Fakültesi, Çevre mühendisliği bölümü, Su vakfı yayınları, sf: 1, 1999

Pacini, V. A., Ingallinella, A., Sanguinetti, G., Removal of iron and manganese using biological roughing up flow filtration technology, Argentina, 2005

Pekin, B., Biyokimya Mühendisliği, 2. Kitap, Kısım 3, Ege Üniversitesi Kimya Fakültesi Yayınları, İzmir, 1983

Polikarpov, G. G., Radioecology of aquatic organism. [Transl. Edited by V. Schultz and A. W. Klement, Jr.] Reinhold, New York, 314 p., 1966

Saatçioğlu, N.G., Membran Biyoreaktörlerde Atıksulardan Demir Arıtımı, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Bölümü, Erzurum, 1998

Sağ, Y., Kutsal, T., Biosorption of heavy metals by *Zoogloea ramigera* : use of adsorption isotherms and a comparison of biosorption characteristics, *Chemical Engineering Journal*, 60, 181-188, 1995

Scragg, A . H., Bioreactors in biotechnology, Ellis Horwood Limited, West Sussex, England, 45-53, 1991

Seviour, R. J., The Microbiology of Activated Sludge, page: 302, 1999

Sogaard, E.G., Medenwaldt, J. V., Abraham-Peskir, Condition and rates of biotic and abiotic iron precipitation in selected Danish freshwater plants and microscopic analysis of precipitate morphology, *Water Res*, p 2675-2682, 2000

Spanierman S. C., Iron intoxication, Consulting Staff, Departments of Emergency Medicine and Pediatrics, Lutheran General Hospital of Oak Brook, Advocate Health System, 2009

Strasser, H., Brunner, H., Schinner, F., Leaching of iron and toxic heavy metals from anaerobically-digested sewage sludge, Institute of Microbiology, University of Innsbruck, Austria, 1994

Straub et.al., Iron metabolism in anoxic environments at near neutral pH, Fachbereich Biologie, Universität Konstanz, 2001

Stumm, W., Lee, G. F., Oxygenation of ferrous iron, *Eng. Chem.*, 53: 143-146, 1961

Şengül, F., Müezzinoğlu, A., Samsunlu, A., Çevre Mühendisliği Kimyası, Sf: 207, İzmir, 1986

Tekerlekopoulou, A. G., Vasiliadou I. A., Vayenas, D.V., Physico-chemical and biological iron removal from potable water, University of Ioannina, Department of Environmental and Natural Resources Management, Greece, 2006

Tsezos, M., & Volesky, B., Biosorption of uranium and thorium, *Biotechnol.Bioeng.*, 1981

Tünay, O., Çevre Mühendisliğinde Kimyasal Prosesler Ders Kitabı, İstanbul Teknik Üniversitesi, 2000

U.S.Geological Survey, Mineral Commodity Summaries, sf: 84-91, 2005

Volesky B., Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century, *Hydrometallurgy*, p:203–16, 2001

Wang J. and Chen C., Biosorbents for heavy metals removal and their future, *Biotechnology Advances* 27, p:195–226, 2009

Winter, M., The University of Sheffield, Web Elements: the periodic table on the web, <http://webelements.com/iron/>

Wu, F., Tseng, R., Juang, R., Pore Structure and Adsorption Performance of the Activated Corbans Prepared from Plum Kernels, Elsevier Science B.V., B69, 287-302, Taiwan, 1999

Yalcuk, A., Sürekli Karıştırılmalı Reaktörlerde *Rhizopus arrhizus* ile Çoklu Metal Karışımlarında Yarışmalı Biyosorpsiyonun İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sf.167, 1999

Yıldız Teknik Üniversitesi, Çevre mühendisliği bölümü, Kimyasal temel işlemler laboratuvarı, http://www.cem.yildiz.edu.tr/5-belgeler/ders_notlari/KTI/kti-dn03.pdf

Yılmaz, P., Sulu Ortamlardan Ağır Metallerin Mikroorganizmalar Yoluyla Giderimi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sf. 2-7, 2006

Zajic, J. E. and Chiu, Y. S., Recovery of heavy metals by microbes, Dev. Ind. Microbiol., 13, 91, 1972

ÖZGEÇMİŞ

Esra Karlık, 1982 yılı Eylül ayında İstanbul’da doğdu. İlköğretim öğrenimini Bakırköy Mustafa Necati İlköğretim okulunda ve lise öğrenimini Osman Ülkümen Lisesi’nde tamamladıktan sonra İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kimya Bölümünden 2007 yılında mezun oldu. Aynı yıl Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Çevre Mühendisliği Bölümü’nde Yüksek Lisans öğrenimine başladı.