

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TOPRAKTAN İZOLE EDİLMİŞ
MİKROORGANİZMALAR İLE FARKLI
KOŞULLARDA BAKIR GİDERİMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog Elif ÖLMEZOĞLU

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Kenan TUNÇ

Haziran 2009

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TOPRAKTAN İZOLE EDİLMİŞ
MİKROORGANİZMALAR İLE FARKLI
KOŞULLARDA BAKIR GİDERİMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog

ELİF ÖLMEZOĞLU

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Bu tez 19/06/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Melek ÖZKAN
Jüri Başkanı

Yrd. Doç. Dr. Kenan TUNÇ
Üye

Yrd. Doç. Dr. Uğursoy OLGUN
Üye

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde ve tezimin oluşmasında gösterdiği ilgi ve katkılarından dolayı değerli danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Kenan TUNÇ'a, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nün Çevre Mühendisliği Bölümü, Çevre Biyoteknolojisi Laboratuvarında deneysel çalışmalarında beni yönlendiren ve her konuda bilgisini esirgemeyen, gerek deney düzeneğinin kurulmasında gerekse de karşılaşılan sorunların çözümünde çok yardımcı olan değerli danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Melek ÖZKAN'a, teşekkür ederim.

Örneklerin metal analizlerinde yardımlarını esirgemeyen Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Çevre Mühendisliği Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Yrd. Doç. Dr. Salim ÖNCEL'e, sabır ve ilgisinden dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında her türlü yardımı benden esirgemeyen, bilgisi ve tecrübeleriyle çalışmalarına yön veren Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Çevre Mühendisliği öğretim elemanlarından Araş. Gör. Pınar KARAGÖZ'e ve sevgili arkadaşım Esra KARLIK'a teşekkür ederim.

Bu tezin hazırlanmasında büyük emeği geçen, bugüne kadar bana hep destek olan bundan sonra da hep yanımda olacağına inandığım, çok değerli arkadaşım sevgili Serdar ACAR'a teşekkür ederim.

Yaşantım boyunca benden maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen, eğitim ve öğretim hayatımda bana sürekli destek olan başta ablam Funda Leyla SEVİM ve annem Necla ÖLMEZOĞLU olmak üzere tüm aileme sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ	ix
EKLER LİSTESİ	x
ÖZET	xi
SUMMARY	xii

BÖLÜM 1.

GİRİŞ	1
-------------	---

BÖLÜM 2.

GENEL BİLGİLER	3
2.1. Ağır Metaller	3
2.1.1. Bakır ve özellikleri	5
2.1.2. Bakırın bileşikleri ve reaksiyonları	6
2.1.3. Bakırın kullanım alanları	7
2.1.4. Bakırın canlılar ve çevre üzerindeki etkileri	8
2.2. Ağır Metallerin Giderim Yöntemleri	9
2.2.1. Bakır gideriminde kullanılan yöntemler	10
2.3. Mikroorganizmalar	10
2.3.1. Mikroorganizmaların ağır metal gideriminde kullanılması ...	12
2.3.2. Mikroorganizmalarda metal toksisitesi ve mikrobiyal direnç mekanizmaları	13
2.4. Adsorpsiyon	14
2.4.1. Mikroorganizmalarla ağır metal adsorblanma mekanizması	15

2.5. Biyosorpsiyon	18
BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE METOD	21
3.1. Materyal	21
3.1.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan araç ve gereçler	22
3.1.2. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler	23
3.1.2.1. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ stok çözeltisinin hazırlanması	24
3.1.2.2. Sentetik atık suyun hazırlanması	24
3.1.2.3. Kalibrasyon çözeltisinin hazırlanması	24
3.1.2.4. Hidroklorik asit çözeltisinin hazırlanması	25
3.1.2.5. Potasyum hidroksit çözeltisinin hazırlanması	25
3.1.2.6. NaCl çözeltisinin hazırlanması	25
3.1.3. Besiyerleri	25
3.2. Yöntem	26
3.2.1. Toprak örneklerinden mikroorganizmaların izolasyonu	26
3.2.2. Saf kültürlerin eldesi	26
3.2.3. Atomik absorpsiyon cihazı ile bakır tayini	27
3.2.3.1. Kalibrasyon eğrilerinin çıkarılması	28
3.2.4. Elde edilen karışık kültürlerde bakır gideriminin incelenmesi ..	29
3.2.5. Karışık kültürlerden izole edilen kültürlerde bakır gideriminin incelenmesi.....	29
3.2.6. Sentetik atık su içerisinde bakır biyogideriminin incelenmesi...	30
3.2.7. Bakır(II)'nin % giderim verimliliğinin hesaplanması	30
3.2.8. Mikroorganizmaların üreme eğrilerinin çıkarılması	30
3.2.9. Mikroorganizmaların tanımlanma çalışmaları	30
3.2.9.1. Gram boyama yöntemi	31
3.2.9.2. Spor oluşturma özelliğini tespit yöntemi	32
BÖLÜM 4.	
DENEYSEL BULGULAR	33
4.1. Elde edilen karışık kültürlerde bakır gideriminin belirlenmesi	33

4.1.1. Sentetik atık suda karışık kültürler ile bakır giderimi	34
4.2. Karışık kültürlerden izole edilen saf kültürler ile bakır giderimi	35
4.3. Saf kültürlerin üreme eğrileri	38
4.4. pH, sıcaklık ve bakır konsantrasyonunun yüksek bakır giderimi gösteren saf kültürlerin üremeleri ve bakır giderimlerine olan etkisinin belirlenmesi	38
4.4.1. pH etkisi.....	39
4.4.2. Sıcaklık etkisi.....	41
4.4.3. Farklı bakır konsantrasyonlarının etkisi	42
4.5. Yüksek bakır giderimi gösteren saf kültürlerin tanımlanma çalışmaları	47
4.5.1. Koloni morfolojisi	47
4.5.2. Gram boyama ve sporlanma	51
4.5.3. Yüksek bakır giderimi gösteren saf kültürlerin cins düzeyinde tayini	54
BÖLÜM 5.	
SONUÇ VE ÖNERİLER	55
KAYNAKLAR	59
EKLER	64
ÖZGEÇMİŞ	66

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

μ l	: Mikrolitre
μ g	: Mikrogram
ml	: Mililitre
g	: Gram
mg	: Miligram
L	: Litre
nm	: Nanometre
cm	: Santimetre
mm	: Milimetre
AAS	: Atomik absorpsiyon spektrofotometresi
λ	: Lamda (dalga boyu)
$^{\circ}$ C	: Santigrat derece
dk	: Dakika
rpm	: Devir / Dakika
ppm	: Milyonda bir (Mikro)
Cu^{+2}	: Bakır (II) iyonu
LB	: Luria broth besiyeri
LA	: Luria agar besiyeri
%	: Yüzde
Gram(+)	: Gram pozitif
Gram(-)	: Gram negatif
sp.	: Tür
Genus	: Cins

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1	Şematik olarak ağır metallerin doğaya yayınımları	4
Şekil 2.2.	Bakır ve simgesi	5
Şekil 2.3.	Kesikli kültürde hücre çoğalmasının kinetiği	11
Şekil 3.1.	Toprak örneklerinin alındığı bölgenin konumu	22
Şekil 3.2.	AAS'de 10 mg/L bakır analizi için elde edilen kalibrasyon eğrisi	28
Şekil 3.3.	AAS'de 20 mg/L bakır analizi için elde edilen kalibrasyon eğrisi	29
Şekil 3.4.	Gram boyama prosesi	31
Şekil 4.1a.	Karışık kültürlerin zamana bağlı bakır(II) giderimi	34
Şekil 4.1b.	Karışık kültürlerin zamana bağlı bakır giderim verimlilikleri	34
Şekil 4.2.	Sentetik atık suda karışık kültürler ile bakır (II) giderimi	35
Şekil 4.3a.	10 mg/L Cu(II) içeren besiyerinde saf kültürlerin bakır(II) giderimi	36
Şekil 4.3b.	10 mg/L Cu(II) içeren besiyerinde saf kültürlerin bakır(II) giderim verimlilikleri	36
Şekil 4.4a.	20 mg/L Cu(II) içeren besiyerinde saf kültürlerin bakır (II) giderimi	37
Şekil 4.4b	20 mg/L Cu(II) içeren besiyerinde saf kültürlerin bakır(II) giderim verimlilikleri	37
Şekil 4.5.	Saf kültürlerin üreme eğrileri	38
Şekil 4.6a.	Farklı pH'larda N ₁ c ve N ₅ a izolatlarının üreme eğrileri	39
Şekil 4.6b.	Farklı pH'larda N ₁ c ve N ₅ a izolatlarının bakır giderim kapasiteleri	39
Şekil 4.6c.	Farklı pH'larda N ₁ c ve N ₅ a izolatlarının bakır giderim verimlilikleri	40
Şekil 4.7a.	Farklı sıcaklıklarda N ₁ c ve N ₅ a izolatlarının üreme eğrileri	41

Şekil 4.7b.	Farklı sıcaklıklarda N_{1c} ve N_{5a} izolatlarının bakır giderim kapasiteleri	41
Şekil 4.7c.	Farklı sıcaklıklarda N_{1c} ve N_{5a} izolatlarının bakır giderim verimlilikleri	42
Şekil 4.8a.	N_{1c} izolatının farklı Cu(II) konsantrasyonlarındaki üreme eğrisi	43
Şekil 4.8b.	N_{1c} izolatının farklı Cu(II) konsantrasyonlarında bakır giderim kapasitesi	43
Şekil 4.8c.	N_{1c} izolatının farklı Cu(II) konsantrasyonlarında bakır giderim verimi	44
Şekil 4.9a.	N_{5a} izolatının farklı Cu(II) konsantrasyonlarındaki üreme eğrisi	45
Şekil 4.9b.	N_{5a} izolatının farklı Cu(II) konsantrasyonlarında bakır giderim kapasitesi	45
Şekil 4.9c.	N_{5a} izolatının farklı Cu(II) konsantrasyonlarında bakır giderim verimi	46
Şekil 4.10.	N_{1a} izolatına ait koloniler	47
Şekil 4.11.	N_{1b} izolatına ait koloniler	48
Şekil 4.12.	N_{1c} izolatına ait koloniler	48
Şekil 4.13.	N_{2a} izolatına ait koloniler	49
Şekil 4.14.	N_{4a} izolatına ait koloniler	49
Şekil 4.15.	N_{5a} izolatına ait koloniler	50
Şekil 4.16.	N_{5c} izolatına ait koloniler	50
Şekil 4.17.	N_{1c} izolatının gram boyama sonrası mikroskopik görüntüsü (60x)	52
Şekil 4.18.	N_{5a} izolatının gram boyama sonrası mikroskopik görüntüsü (60x)	53

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Bakırın bileşikleri	7
Tablo 2.2. Ağır metalleri uzaklaştırma çalışmalarında kullanılan bazı mikroorganizma örnekleri	12
Tablo 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler	23
Tablo 4.1. Elde edilen saf kültürlerin koloni morfolojilerine ait özellikler	51
Tablo 4.2. Bergey's teşhis anahtarında yer alan N_1c ve N_5a 'ya benzer özellik gösteren cinsler	54

ÖZET

Anahtar Kelimeler: Ağır metaller, Bakır biyogiderimi, Bakıra dirençli mikroorganizmalar

Sanayileşmenin doğal bir sonucu olarak ağır metal içerikli sanayi atıkları, çevreyi özellikle de su kaynaklarını kirletmektedir. Ağır metaller besin zincirine girerek canlı dokularda birikebilmekte, bu şekilde insanlara kadar ulaşabilmektedirler. İnsan ve çevre sağlığı açısından büyük bir tehlike oluşturan ağır metallerin gideriminde mekanik ve kimyasal yöntemler kullanılmakla birlikte bu yöntemlerin ekonomik olmaması ve yeterli düzeyde filtrasyon sağlamaması nedeniyle son yıllarda mikroorganizmaların kullanımı tercih edilmektedir.

Bu çalışmada, Kocaeli'nin Darıca ilçesinde yüksek metal içerikli bölgelerden alınan beş adet toprak örneğinden bakır gideriminde kullanılabilecek mikroorganizmalar izole edilmiştir. İzole edilen saf ve karışık kültürlerin bakır giderim kapasiteleri araştırılmış, en iyi bakır giderimi yapan iki izolat (N_{1c} ve N_{5a}) seçilerek sıcaklık, pH ve farklı bakır konsantrasyonlarının izolatların üreme ve bakır giderim kapasiteleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Üç farklı pH, sıcaklık değeri ve yedi farklı bakır konsantrasyonunu ile çalışılarak bakır gideriminin en yüksek olduğu konsantrasyon aralığı belirlenmiştir. Kültürlerdeki bakır giderimi atomik absorpsiyon spektrofotometresi kullanılarak tayin edilmiştir. Her iki izolatın yüksek bakır giderimi gerçekleştirdiği konsantrasyon aralığı 10-20 mg/L olarak belirlenmiş, N_{1c} için en yüksek bakır giderimi pH 6,8'de %82, 30°C'de %85 olarak ölçülmüştür. N_{5a} için en yüksek bakır giderimi pH 6,8'de %75, 30°C'de %91 olarak elde edilmiştir.

COPPER REMOVAL AT DIFFERENT CONDITIONS WITH THE MICROORGANISMS IZOLATED FROM SOIL SAMPLES

SUMMARY

Key Words: Heavy Metals, Copper bioremoval, Copper resistant microorganisms.

Pollution of environment, especially water resources with heavy metals is a natural consequence of industrialization. Heavy metals accumulate in living tissues by means of food chain, in this way they arrive to human beings. Mechanical and chemical techniques are used for the removal of heavy metals creating great danger in terms of human and environmental health. Because of the fact that there is a lack of adequate filtration with those techniques, also they are expensive, use of microorganisms have been preferred for metal removal in recent years.

In this study, microorganisms were insulated from five different soil samples taken from the different locations of Darica district of Kocaeli, which are thought to be highly contaminated with heavy metals. Copper removal capacities of pure and mixed cultures were investigated and two izolate (N_{1c} and N_{5a}) with high copper removal capacity were selected for further studies. Effect of there different pHs, temperatures and seven different copper concentration were tested optimum pH, temperature and copper concentration for high bioremoval efficiency was determined. Change in copper concentration was monitored by using atomic absorbtion spectrophotometer. Range of copper concentration between 10-20 mg/L was found to be suitable for high rate of removal, highest bioremoval with an efficiency of 82 % was obtained at pH 6,8 and 85 % at 30°C with N_{1c} . N_{5a} showed 75 % of highest copper removal efficiency at pH 6,8 and 91 % at 30°C.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Son yıllarda nüfustaki hızlı artış, enerji ve besin yetersizliği, düzensiz kentleşme, insanların aşırı tüketim isteği ve hızla gelişen teknolojik ilerlemeler, çevre kirliliği sorununun önemini iyice hissettirir hale gelmiştir. Özellikle, ağır metallerin oluşturduğu kirlilik önemli çevre problemlerini de beraberinde getirmektedir [1, 2].

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde ağır metaller ve türevlerinin çevrede yaygın olarak bulunması endüstriyel faaliyetlerin doğal bir sonucudur [3]. Çevre kirliliğini arttıran ve ekolojik dengenin bozulmasında önemli rol oynayan endüstri kuruluşlarının başında, atık sularında ağır metal içeren kuruluşlar gelmektedir. Ağır metaller genellikle metal kaplama endüstrisi, otomobil endüstrisi, elektriksel ve elektronik materyallerin üretilmesi ve kullanılması, boru, silah ve lastik endüstrilerinde kullanılır [1, 4]. İlgili endüstri kuruluşları, süreçleri gereği çeşitli ağır metalleri kullanmakta ve atıklarında civa, çinko, kobalt, bakır, demir, kurşun, krom, arsenik ve gümüş gibi metal iyonlarını ihtiva etmektedir. Bu metaller içerisinde kurşun, çinko, bakır, kobalt, kadmiyum, krom, nikel, arsenik, civa ve gümüş gibi metal iyonları, kalıcı etkilerinden dolayı canlı sistemleri ve çevre sağlığı yönünden önem taşımakta olup belirli bir sınırı aşınca da son derece toksik etki göstermektedir.

Ağır metallerin endüstri atıklarından uzaklaştırılması için mevcut konvansiyonel fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler; kimyasal çöktürme, iyon değişimi, aktif karbon ile adsorpsiyon, ters osmoz, filtrasyon ve membran teknolojileri şeklinde sıralanabilir. Ancak bu yöntemlerin ekonomik olmayışları ve elde edilen arıtım düzeyinin yeterli olmaması nedeniyle bu alanda önemli bir potansiyele sahip mikroorganizmaların etkin bir şekilde kullanıldığı ve tercih edildiği görülmektedir. Bu amaçla çeşitli bakterilerin, fungusların ve alglerin kullanıldığı bilinmektedir [1, 3-4].

Biyoremediasyon (biyoarıtım) su, hava ve topraktaki kirliliğin, bir ortamdan başka bir ortama transfer edilmeden, mikroorganizmalar veya biyolojik kökenli maddeler kullanılarak bir grup uygulama ile yok edilmesidir. Ağır metallerin canlı veya ölü mikroorganizmalarla biyoarıtımı son yıllarda yalnızca yeni olmasıyla değil aynı zamanda endüstrideki potansiyel uygulamaları ile oldukça dikkat çekmiştir [5].

Biyolojik arıtım sürecinde tercih edilen mikroorganizmalar çevrelerindeki yüksek metal konsantrasyonlarıyla ilgili çeşitli stratejiler geliştirmişlerdir. Bunlar, hücre yüzeyine ya da hücre çeperine metalleri bağlama, metalin hücre içi translokasyonu, presipitasyon ve volatilizasyonunu içeren metal transformasyonlarıdır [6]. Bakteri, mantar ve alglerin toksik metalleri birçok uzaklaştırma yolları tanımlanmıştır. Ağır metaller, hücre duvarındaki selüloz yapı içine yakalanabilirler ve takiben selüloz yapı içinde bulunan bağlanma bölgelerine biyosorbe olurlar. Çözeltideki metal iyonları, hücre duvarındaki biyopolimerlerde bulunan kimyasal, fonksiyonel gruplarla tutulurlar. Yüzeydeki bu bağlanmalar amid, amid imidozol, hidroksil, karboksil, fosfat tiyoeter ve diğer fonksiyonel gruplarla gerçekleşir [5].

Ağır metallerin biyolojik süreçlerle giderimi konusunda pek çok çalışma yapılmıştır. Son yıllarda ise canlı mikroorganizma hücreleri kullanılarak ağır metallerin uzaklaştırılmasına yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Bu amaçla canlı *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas aeroginasa*, *Citrobacter sp*, *Bacillus sp*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida sp*, gibi mikroorganizma hücreleri Cu, Ni, Pb gibi ağır metallerin biyoarıtımı için kullanılmış ve önemli ölçüde verim elde edilmiştir. Ağır metal giderimi üzerinde etkinliği araştırılan mikroorganizmalar olmasına rağmen henüz bu mikroorganizma türlerinin izolasyonu ve identifikasyonuna yönelik detaylı bir çalışma bulunmamaktadır [5, 6].

Bu tez çalışmasında ağır metallerce kirlenmiş olduğu düşünülen çevrelerden bakır gideriminde kullanılacak etkin mikroorganizmaların izolasyonu amaçlanmıştır. Kocaeli'nin Darıca ilçesi içersinde ağır metallerce kirlenmiş bölgelerden toplanan beş adet farklı toprak numunesinden izole edilen karışık ve saf kültürlerin bakır biyogiderim kapasiteleri araştırılmış ve yüksek bakır giderimi gösteren saf kültürler izole edilmiştir.

BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ağır Metaller

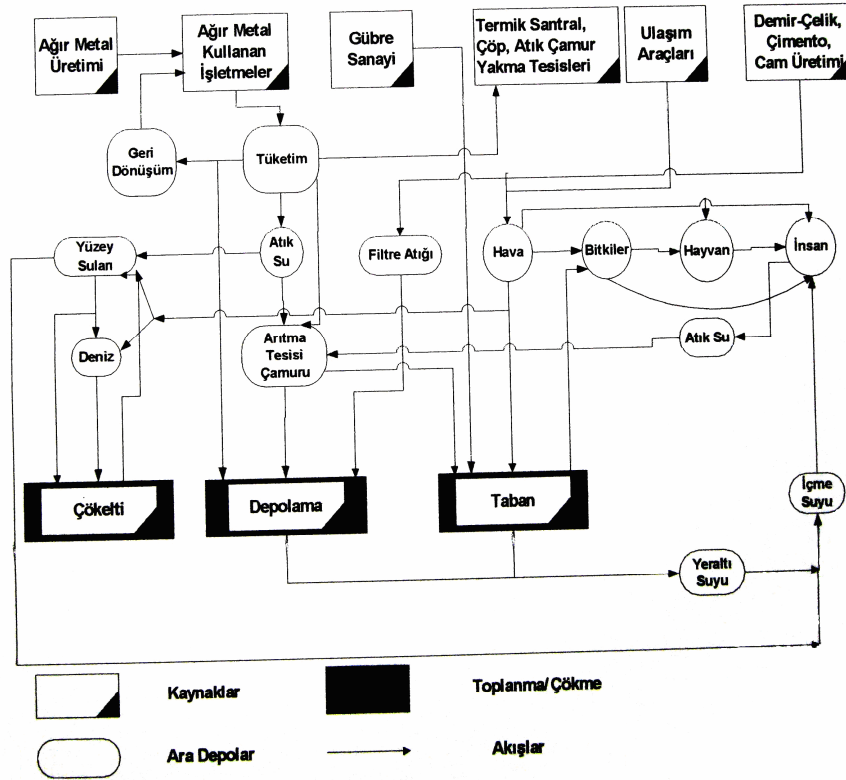
Ağır metaller, yoğunlukları suyun yoğunluğunun en az 5 katı daha fazla olan, atom ağırlığı 50 ve üzeri olan elementler olarak tanımlanmaktadır. Cıva, nikel, kurşun, arsenik, kadmiyum, alüminyum, platin ve bakır ağır metallere örnek verilebilir. Ağır metallerin vücutta hiçbir fonksiyonu yoktur ve vücut için zararlıdır. Endüstriyel faaliyetler sonucu havaya atılan ağır metaller, sonuçta karaya ve buradan bitkiler ve besin zinciri yoluyla da hayvanlara ve insanlara ulaşırlar ve aynı zamanda hayvan ve insanlar tarafından havadan aerosol olarak veya toz halinde solunurlar. Ağır metaller endüstriyel atık suların içme sularına karışması yoluyla veya ağır metallere kirlenmiş partiküllerin tozlaşması yoluyla da hayvan ve insanlar üzerinde etkin olurlar [7, 8].

Ağır metallerin bulunduğu formlar:

1. Toprak çözeltisinde
2. Toprak taneciklerinin elektriksel yüklerine bağlı olarak değişebilir.
3. Organik materyallerle bileşik oluşturmuş şekilde
4. Çökelti halinde
5. Minerallerin kristal kafes yapısında

Ağır metallerin doğaya yayınımları dikkate alındığında çok çeşitli sektörlerden farklı işlem kademelerinden biyosfere ağır metal atılımı gerçekleştiği bilinmektedir. Şekil 2.1'de farklı sektörlerden biyosfere ağır metal yayınımları şematik olarak verilmiştir.

Ağır metaller biyolojik proseslere katılma derecelerine göre yaşamsal ve yaşamsal olmayan olarak sınıflandırılırlar [8].



Şekil 2.1. Şematik olarak ağır metallerin doğaya yayınımları

Yaşamsal olarak tanımlanan ağır metallerin organizma yapısında belirli bir konsantrasyonda bulunmaları gereklidir ve bu metaller biyolojik reaksiyonlara katıldıklarından dolayı düzenli olarak besinler yoluyla alınmaları zorunludur. Örneğin bakır hayvanlarda ve insanlarda kırmızı kan hücrelerinin ve birçok oksidasyon ve redüksiyon prosesinin vazgeçilmez parçasıdır [8].

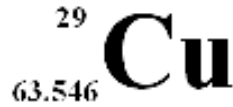
Buna karşın yaşamsal olmayan ağır metaller çok düşük konsantrasyonda dahi psikolojik yapıyı etkileyerek sağlık problemlerine yol açabilmektedirler. Bu gruba en iyi örnek kükürtlü enzimlere bağlanan cıvadır [8].

Bir ağır metalin yaşamsal olup olmadığı dikkate alınan organizmaya da bağlıdır.

Örneğin; nikel bitkiler açısından toksik etki gösterirken, hayvanlarda iz elementi olarak bulunması gerekir [8].

2.1.1. Bakır ve özellikleri

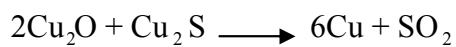
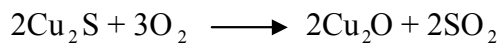
Bu tez çalışmasında kullanılan bakır, atom numarası, kütle numarası ve simgesi ile birlikte şekil 2.2’de gösterilmiştir. Alt bölümlerde ise bakır hakkında daha geniş bilgiye yer verilmektedir. Bakır oda sıcaklığında (25°C 298 K) turuncu renkli yumuşak bir metaldir. Periyodik cetvelin d-bloğunda yer alır [9].



Şekil 2.2. Bakır ve simgesi [10]

Atmosfer koşullarında metalik gri tonunda bulunmayan 2 metalden biri olan bakır, M.Ö. 5000 yılından beri tanınmaktadır ve adını ilk bulunduğu yer olan Kıbrıs’ın latinesinden (aes cyprium=Kıbrıs cevheri, cyprium ve daha sonra Cuprum) almıştır. İlk kez Mısırlılar tarafından üretilen bakır, M.Ö. 3000 yılından itibaren (Bronz Çağı) Anadolu, Yunanistan ve Hindistan’ da mekanik özellikleri alaşımlandırma yolu ile artırılarak kullanılmıştır. Doğada 200’den fazla bakır minerali bulunmakla beraber sadece 20 tanesi bakır cevheri olarak endüstriyel öneme sahiptir ve dünya bakır rezervlerinin % 68’ ine Şili, ABD, Sovyetler Birliği, Zambiya, Peru, Zaire ve Kanada; % 32’sine ise diğer ülkeler sahip olmak üzere yaklaşık 650×10^6 ton bakır rezervi olduğu tahmin edilmektedir. Dünyadaki bakır üretiminin ancak % 0,4 miktarı Türkiye’de çıkarılmaktadır. [11, 12]. Bakırı elde etmek için şu yöntem uygulanır:

Bakır sülfür kavrularak bakır (I) okside indirgenir ve ortamdaki kükürt SO_2 şeklinde uzaklaştırılır. Elde edilen oksit fırınlanarak %99 saflıkta elementel bakır elde edilir.



Daha sonra bu elementel bakır daha da saflaştırılmak istenirse, elektrolitik yöntemlerle katot saf bakır ile kaplanarak saflaştırılır [9].

Endüstride bakırın önemli rol oynamasının ve çeşitli alanlarda kullanılmasının nedeni çok farklı özelliklere sahip olmasıdır. Bakırın en önemli özelliklerinin arasında yüksek elektrik ve ısı iletkenliği, aşınmaya ve korozyon direnci, çekilebilme ve dövülebilme özellikleri sayılabilir. Ayrıca alaşımları çok çeşitli olup endüstride (otomotiv, basınçlı sistemler, borular, vanalar, elektrik santralleri ve elektrik, elektronik vd.) değişik amaçlı kullanılmaktadır [11].

Bakır genel kimyasal özelliklerinden dolayı doğaya yayılımı açısından “Atmofil” (hava sever) grupta yer almasına rağmen, havada bulunan bakır konsantrasyonu üretim yapan sanayi birimine uzaklığına bağlıdır. Bakır “Lithofil” (kaya sever) elementler gibi suda çözünerek geniş bir alana dağılılabılır bu nedenle de çevresel açıdan iki grubun arasında değerlendirilir. Atmosfere yayılan bakırın % 1’ i biyolojik kullanılabilir iyon halinde kalırken diğer kısım sedimente olarak çökelir [11].

Tarımsal kesimlerde havadaki ortalama bakır konsantrasyonu $5-50 \text{ ng/m}^3$ iken endüstriyel kirletilmemiş bölgelerdeki deniz suyundaki bakır konsantrasyonu $0.15 \text{ } \mu\text{g/L}$ ve tatlı suda ise $1-20 \text{ } \mu\text{g/litre}$ ’dir. Doğal suların pH değerine bağlı olarak çözünürlük sınırındaki azalma sonucu suların dibinde çökelir ve doğal yeraltı tatlı suların çökeleklerinde yaklaşık $16 - 5000 \text{ mg / kg}$ (kuru ağırlık) arasında ve deniz dibinde ortalama $2-740 \text{ mg / kg}$ (kuru ağırlık) bakır bulunur. Kirletilmemiş toprakta bakır konsantrasyonu ortalama 30mg/kg (sınırdeğeri $2-250\text{mg/kg}$) seviyelerindedir [11].

Bakırın temizlenmesi, levha haline getirilmesi, metal-proses endüstrilerinde bakır iyonu derişimi $100-120 \text{ mg/l}$ ’ye yaklaşır. Ayrıca bakır işletme endüstrisi atıksularındaki bakır (II) kirliliği 400 mg/l ’ye kadar çıkmaktadır. Bu değerler su-nitelik standartlarına göre oldukça yüksektir [6].

2.1.2. Bakırın bileşikleri ve reaksiyonları

Değerliği +1 ve +2 olan bakırın oluşturduğu bileşikler Tablo 2.1’de gösterilmiştir [9]. Bakıra oksijensiz asitler etki etmez. Oksijenli asitler yükseltgen olarak etki eder [12]. Bakırın asit ile reaksiyonu; Bakır metali sıcak derişik sülfürik asit ile reaksiyonu sonucunda Cu(II) çözeltisi oluşturur. Bu iyon aslında $[\text{Cu}(\text{OH}_2)_6]^{+2}$ kompleksidir.

Aynı zamanda açığa hidrojen gazı çıkar. Bakır metali seyreltik ve derişik nitrik asit de çözüdür [9].



Tablo 2.1. Bakırın bileşikleri

CuF	CuCl ₂ .2H ₂ O	CuO	CuCl ₂	CuSe	Cu ₂ Te
CuF ₂	CuBr	Cu ₂ O	CuI	Cu ₂ Se	CuSO ₄ .5H ₂ O
CuCl	CuBr ₂	CuS	Cu ₂ S	CuTe	

2.1.3. Bakırın kullanım alanları

- Bakır tel yapımında
 - Yüksek frekans hattı yapımında
 - Bileşikleri şeker analizinde Fehling's çözeltilisini hazırlanmasında
 - Müzik enstrümanlarının yapımında
 - Renkli cam yapımında
 - Vakum tüpleri, katot ısıtıcı tüpleri , mikrodalga fırınlarda
 - Kabartma metal olarak
 - Elektrik endüstrisinde
 - Bakır sülfat tarım zehri olarak ve suların saflaştırılmasında kullanılmaktadır [13].
- “Ayrıca bakır;
- Hemocyaninin anahtar komponentidir. Süperoksit dismutaz, sitokrom C oksidaz, katalaz, dopamin hidroksilaz, askorbik asit oksidaz gibi enzimlerin prostetik grubunun parçasıdır. Ağır molekül ağırlıklı oksidazlar %0,05-0,35 oranında bakır içerirler.
 - Demirle birlikte hemoglobin oluşumunda rol oynar. Merkezi sinir sisteminin düzgün çalışmasında ve kollajen oluşumunda C vitamini ile birlikte iş görür.

- Bakırın azot fiksasyonunda, fotosentezde ve büyük ihtimalle klorofil üretiminde rol oynadığına dair kanıtlar bulunmaktadır” [14].

2.1.4. Bakırın canlılar ve çevre üzerindeki etkileri

Bakırın bitkiler ve canlılar üzerindeki etkisi, kimyasal formuna ve canlının büyüklüğüne göre değişir. Küçük ve basit yapıları canlılar için zehir özelliği gösterirken büyük canlılar için temel yapı bileşenidir. Bu nedenle bakır ve bileşikleri fungusit, biosit, anti bakteriyel madde ve böcek zehiri olarak tarım zararlılarına ve yumuşakçalara karşı yaygın olarak kullanılır. Örneğin % 1 - 20 CuSO_4 içeren kireç sütü karışımı “Bordo-Karışımı” olarak bilinir ve üzüm tarımında fungusit olarak kullanılır. Tarımsal mücadelede kullanılan bu fungusitin bilinçsiz ve aşırı kullanımı sonucu toprağın yapısı bozulmakta ve bu da toprak kirliliğine yol açmaktadır. Bitkide 20 ppm den fazla Cu toksik etki yapar [11, 15, 16].

Bakır doğada pek çok sebze ve meyvede bulunur. Örneğin elmada ortalama 0,1 - 2,3 mg/kg bakır mevcutken, kuru erikte bu değer 3,7 - 5,0 mg/kg’ a çıkar, ay çekirdeğinde ise 14,3 - 19 mg/kg bakır bulunur. Anne sütü ortalama 200-400 $\mu\text{g/L}$ bakır içerir ve bebek ağırlığı başına 50 μg bakır alır. Bakır eksikliğine bağlı olarak hayvanlarda ve insanlarda büyümede gecikme, solunum sisteminde enfeksiyonlar, kemik erimesi, anemi, saç ve deride renk kaybı gibi rahatsızlıklar kendini gösterirken, bakır bileşikler eklemlerin kireçlenmesine ve romatizmaya karşı kullanılır [11].

Bakır, organizmada esansiyel element olarak bulunur. Bakırın küçük miktarları sağlığa zararlı değildir. Bakır vücut fonksiyonları açısından önemli olmakla beraber özellikle saç, deri esnek kısımları, kemik ve bazı iç organların temel bileşenidir. Erişkin insanlarda ortama 50 - 120 mg bulunan bakır, amino asitler, yağ asitleri ve vitaminlerin normal koşullarda metabolizmadaki reaksiyonlarının vazgeçilmez ögesidir. Bir çok enzim ve proteinin yapısında bulunan bakır, demirin fonksiyonlarını yerine getirmesinde aktivatör görevi üstlenir. Bakır eksikliğinde hayvanlarda anormallikler, kansızlık, kemik hataları ve sinir sisteminde bozukluklar tespit edilmiştir [6, 11].

Bakır madeni oksit, karbonat ve sülfid bileşikleri şeklinde endüstride çok kullanılmaktadır. Endüstriyel kullanım sonrasında bakır içeren atıklar direkt olarak toprağa verildiğinde ve dolaylı olarak ta havaya ve suya verildiğinde çevreyi kirleterek toprak kirliliğine neden olmaktadır. Ağır metallere biri olan bakırın topraktaki konsantrasyonlarının artması sonucunda bitki gelişimi ve kalitesi bozulmakta ve topraktan alınan verim azalmaktadır [6, 15].

Akut bakır zehirlenmesi seyrek olarak gözlenir. Genelde yiyecek ve içeceklere kazayla bakır ihtiva eden maddelerin karışmasıyla veya kasten bakır tuzlarının yutulması sonucu zehirlenme gerçekleşir ve bakır çalığı olarak bilinir [11]. Bakır tuzlarıyla akut zehirlenmeler, endüstriyel atıkların ya da bakır tuzlarının özellikle bakır sülfatın oral yolla alınmasıyla bazen ölümle sonuçlanmaktadır. Vücutta biriken aşırı bakır, karaciğerde tahribe neden olur. Bakır ile temas edenlerde ciltte solukluk fark edilmiştir. Küçük bakır tanecikleri, bakır karbonat ya da bakır tozlarına maruz kalındığında zayıflık, mide bulantısı ve şiddetli aksırmaya neden olur. Ayrıca karın ağrısı, kusma, kanama, bitkinlik, kansızlık, sarılık, soluma zorluğu gibi etkilerde gözlenebilir. Vücutta bakır birikmesi sonucu Wilson hastalığı meydana gelir. Kronik olarak bakıra maruz kalmada ise akciğer kanseri tespit edilmiştir. Bakırın fazlası sucul yaşam içinde önemli bir tehlikedir. Yüksek konsantrasyonda bakır balık ve diğer canlıların karaciğer, böbrek gibi organlarını etkiler, sinir sisteminde hasara yol açar [6, 9].

2.2. Ağır Metallerin Giderim Yöntemleri

Ağır metallerin gideriminde birçok yöntem kullanılmaktadır. Yöntem seçiminde metalin türü, suda bulunma şekli ve derişimi gibi faktörler önem taşımaktadır [17]. Kimyasal çöktürme, kimyasal oksidasyon ve indirgenme, elektro-kimyasal yöntemler, buharlaştırma yoluyla geri kazanım, filtrasyon, iyon değıştirme, membran teknolojisi endüstriyel atık sulardan ağır metalleri uzaklaştırmak için kullanılan bazı metodlardır [5]. Günümüzde en çok başvuru alan ağır metal giderim yöntemleri biyolojik yöntemlerdir. Biyolojik yöntemlerden biyosorpsiyon ve adsorpsiyon yöntemi ağır metal gideriminde en çok kullanılan yöntemlerdendir. Bu

yöntemlerin en çekici yönü maliyetlerinin ucuz olması ve kullanılabilecek materyal seçeneğinin fazla olmasıdır [18, 19].

2.2.1. Bakır gideriminde kullanılan yöntemler

Bakır (Cu^{+2}) iyonu kirliliğinin giderilmesinde kimyasal çöktürme ya da iyon değiştirme, buharlaştırarak geri kazanma, biyosorpsiyon, adsorpsiyon ve elektrokimyasal arıtma teknikleri gibi yöntemler kullanılabilir. Kimyasal çöktürme, asidik atıksuya kireç ya da metal sülfür eklenerek yapılır. Bakır oksitin minimum çözünürlüğü, pH 9-10.3 arasındadır. İyon değiştirme, iyon değiştirici olarak doğal maddeler veya sentetik reçineler kullanılarak yapılır. Buharlaştırarak geri kazanma pahalı bir procestir ve atıkta bakırdan başka istenmeyen maddeler buharlaşma sonunda derişimi artmış olarak bulunur. Biyosorpsiyon, bir çözeltiden bakır (Cu^{+2}) iyonlarının biyokütle ile uzaklaştırılmasıyla gerçekleşir. Adsorpsiyon, bakır (Cu^{+2}) iyonlarının katı bir yüzey üzerinde tutulması ile gerçekleşir. Elektrokimyasal yöntemler ile bakırın geri kazanılmasında ise atıktaki bakır derişiminin 1-2 g/l'den az olmaması ve oldukça yüksek güç harcanması gerekmektedir [6,17].

2.3. Mikroorganizmalar

Genellikle mikroskop altında görülebilen ve çoğunlukla tek hücreli olan canlılar mikroorganizma olarak adlandırılır. Bakteriler, virüsler, küf ve mayalar bilinen mikroorganizma çeşitleridir. Mikroorganizmalar doğada, su ve toprakta, bazı gıda maddelerinde, gelişmiş canlıların deri ve bağırsaklarında, organik maddelerde hemen her yerde bulunurlar. Mikroorganizmaların üretilmesi, canlılıklarının devam ettirilmesi, saf kültürün elde edilmesi, biyolojik ve metabolik ürünlerin elde edilmesi gibi amaçlarla doğal ortam dışında çoğalmak için kullanılan ve amaca uygun olarak genelde mikroorganizmaların gereksinim duyduğu maddeleri ve özellikleri içeren besleyici ortamlara besiyeri denir. Üzerinde veya içinde mikroorganizma üretilmiş ya da üremiş besiyerine kültür denir. Mikroorganizmaların buldukları ortamdan belli teknikler ile alınarak uygun bir besi yerine aktarılması ve burada gelişmelerinin sağlanmasına kültür yapma (kültivasyon) denir. Kültürler genellikle buzdolabında

0-5°C'de muhafaza edilmektedir. Ayrıca kültürleri dondurarak (derin dondurucuda gliserol stok içinde -20°C, sıvı azot içinde -196°C) donmuş halde ve liyofilize stok kültürlerini hazırlayarak kuru formda, canlılık ve aktivitelerini yitirmeden uzun süre saklamak mümkündür. Mikroorganizmaların büyümesine etki eden faktörlerden sıcaklık, pH, oksijen ihtiyacı gibi faktörler mikroorganizma türüne göre değişkenlik gösterir, her mikroorganizmanın belirli sıcaklık ve pH değerinde bir gelişme optimumu vardır [20, 21].

Kesikli kültür sistemlerinde büyüme kapalı bir sistem veya kapalı bir çevrede gerçekleşir. Kesikli kültür sistemleri uygun büyüme ortamı içeren bir kap olup optimum pH, sıcaklık ve redoks potansiyeli koşullarında çalıştırılırlar. Büyüme, ortamdaki gerekli bileşenlerin tükenmesi veya toksik ürün birikimi, pH değişikliği gibi çevresel değişiklikler gözlenene kadar devam eder. Tipik bir kesikli çoğalma eğrisi ve çoğalma eğrisinde gözlenen fazlar Şekil 2.3'te gösterilmiştir [21].

Mikroorganizmalar aşağıdaki özellikleri nedeniyle ideal biyolojik sistemlerdir [6].

- Hızlı büyümeleri ve kısa ömürleri, her türlü çevre şartlarına çabuk uyum göstermelerini sağlar.
- Sentezledikleri ürünler çok çeşitlidir.
- Mikroskobik derecede çok küçük olduklarından yüzey/hacim oranı çok yüksektir. Bu nedenle de metabolizmaları çok yüksektir.



Şekil 2.3. Kesikli kültürde hücre çoğalmasının kinetiği

2.3.1. Mikroorganizmaların ağır metal gideriminde kullanılması

Hem ölü hem de canlı mikroorganizmalar metalleri tutma özelliğine sahiptir. Bakteriler, mantarlar, algler ve mayalar ise yapılarında ve yüzeylerinde ağır metal adsorplayabilme yeteneği olan mikrobiyal türlerden birkaçıdır. Düşük pH larda biyoarıtım için en sık kullanılan biyokütle türleri arasında mayalar bulunmaktadır. Canlı veya ölü birçok maya, farklı koşullar altında, farklı derecelerde ağır metalleri biyoarıtma becerisine sahiptirler [22-25]. Mikrobiyal hücreler (canlı ya da ölü) ve onun ürünleri, metalin hem çözünen hem de katı hali için etkin bir biyoakümülatördür. Metal toplayıcı biyoprosesler, genellikle ölü biyoküteller tarafından tutunma ile ya da yaşayan hücrenin biyoakümülasyonu ile gerçekleşmektedir [24, 26]. Tüm mikroorganizmaların hücre yüzeyi, çeşitli anyonik yapılar nedeniyle negatif yüke sahiptir. Bu durum bakteriye metal katyon bağlama yeteneği vermektedir. Çeşitli mikrobiyal türlerin uranyum, bakır ve kirli atıklardaki diğer metal iyonlarının biyosorpsiyonu için oldukça verimli oldukları görülmüştür [18]. Mantar, maya, yosun, alg ve bakteriler gibi pek çok mikrobiyal türün yapılarında 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 yüksek yüzey hacim oranlarının olması nedeniyle çok iyi biyosorbentler olacağı öne sürülmüştür. [27-30].

Ağır metallerin gideriminde kullanılan bazı mikroorganizma örnekleri Tablo 2.2’de verilmiştir [6].

Tablo 2.2. Ağır metalleri uzaklaştırma çalışmalarında kullanılan bazı mikroorganizma örnekleri

Mikroorganizma	Element	Uygulamayı yapanlar	Referanslar
<i>Citrobacter sp.</i>	Kurşun	Aikin ve ark., (1979)	Gadd, 1988.
<i>Bacillus subtilis subs. niger</i>	Bakır	Baldry ve Dean (1981)	Gadd, 1988.
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bakır	Baldry ve Dean (1981)	Gadd, 1988.
<i>Escherichia coli</i>	Bakır	Baldry ve Dean (1980)	Gadd, 1988.
<i>Zooglea ramigera</i>	Bakır	Norberg ve Persson (1984)	Gadd, 1988.
<i>Bacillus sp.</i>	Bakır, kurşun, krom	Özdağ ve ark., (2000)	Özdağ ve ark., 2000.
<i>Fungi (47 strain)</i>	Bakır	Baldry ve Dean (1980)	Gadd, 1988.

2.3.2. Mikroorganizmalarda metal toksisitesi ve mikrobiyal direnç mekanizmaları

Bazı metaller mikrobiyal hücrelerin temel bileşenlerindedir. Mikrobiyal büyüme ve metabolizma için gerekli olmalarına rağmen çok yüksek konsantrasyonlarda toksik olabilirler, örneğin Cu. Toksikite, proteinler ve nükleik asitler gibi reaktif sülfidril, karboksil ya da fosfat grupları içeren ligandlara metalin bağlanması sonucu oluşabilir. Metaller mikroorganizmalarda protein, hücre zarı veya DNA gibi yapılarda bozulmalara sebep olurlar ve bakterinin metabolik faaliyetlerini yavaşlatırlar. Bu metal toksisitesi ile başa çıkabilen mikroorganizmalar yüksek metal konsantrasyonlarında hayatlarını sürdürebilirler. Bu mikroorganizmaların metal toksisitesini önlemek için geliştirdiği mekanizmalar metal dirençliliği ve detoksifikasyon yeteneğidir. Metal dirençliliği ve detoksifikasyon için genel mekanizmalar şunlardır:

- Sümüksü tabaka: Metalin hücre içine girmesine engel olur.
- Egzopolimerler: Bazı mikroorganizmalar metallere bağlanabilen egzopolimerler üreterek metal sequestrasyonu olarak bilinen işlemi gerçekleştirirler.
- Ekstrahüresel yapılar: Bu yapılara metal bağlanması hücreye girmelerine engel olur.
- Hücre yüzeyindeki fosforil ve fosfolipidler.
- Sidrofor: Metallerle kompleks oluşturan ikinci önemli ekstrahüresel moleküldür. Siyanobakterilerde bakır toksisitesini engelleyen Sidrofor molekülleri bulunur. Sidrofor demir molekülüne bağlanarak çözülmüş demir konsantrasyonunu düşürür ve demirin toksisitesini azaltmış olur.
- Biyosurfaktanlar: Mikroorganizmalar tarafından üretilen ve kirlilik yaratan zararlı atıkları parçalamak, yok etmek amacıyla kullanılan biyolojik maddelerdir.
- Fosfat: *Citrobacter* sp. tarafından enzimatik olarak oluşturulan fosfatın kurşun ve bakır ile birleşerek çökmesi sonucu detoksifikasyon gerçekleşmiş olur [31].

Ağır metallerin, mikroorganizmalara olan toksisiteleri mikrobiyolojik ve ortamsal faktörlerin etkisi altındadır. Ağır metallerin organik maddelere bağlanması, çökmesi, kompleksleşmesi ve iyonik etkiler metallerin toksisitesini etkileyen faktörlerdir [32].

2.4. Adsorpsiyon

Yüzeyde tutunma prosesi olan adsorpsiyon özellikle düşük konsantrasyonlu ağır metallerin gideriminde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bir katının veya bir sıvının sınır yüzeyindeki konsantrasyon değişmesi olayına adsorpsiyon denmektedir. Bir başka deyişle taneciklerin bir yüzeye tutunmasına adsorpsiyon adı verilmektedir. Adsorplanan maddeye adsorbat ya da adsorplanmış madde, adsorblayıcı maddeye de adsorbent veya adsorplayıcı madde denilmektedir [17]. Adsorplayan madde yüzeyi ile adsorplanan kimyasal arasındaki çekim kuvvetlerine bağlı olarak gerçekleşen üç tür adsorpsiyon işlemi tanımlanmaktadır.

a) Fiziksel Adsorpsiyon: Katı yüzey ile adsorplanan madde molekülleri arasındaki çekim kuvvetleri sonucu oluşan adsorpsiyon olayıdır. Burada zayıf van der Waals kuvvetleri etkindir ve işlem tersinirdir. Adsorpsiyon sonucu yoğunlaşma enerjisinden biraz fazla ısı açığa çıkar.

b) Kimyasal Adsorpsiyon: Adsorplanan madde ile katı yüzey arasındaki fonksiyonel grupların kimyasal etkileşimi ile oluşan adsorpsiyondur. Adsorpsiyon tersinmezdir ve tek tabakalıdır. Adsorpsiyon sırasında açığa çıkan ısı reaksiyon ısısından daha büyüktür.

c) İyonik Adsorpsiyon: Elektrostatik çekim kuvvetlerinin etkisi ile iyonlar yüzeydeki yüklü bölgelere tutunmaktadır. Burada adsorplayan ile adsorplananın iyonik güçleri önemlidir. İyonlar eş yüklü ise daha küçük olan tercihli olarak yüzeye tutulur.

Adsorpsiyon olaylarının çoğu, bu üç adsorpsiyon türünün bileşimidir. Bu nedenle bir adsorpsiyon olayında fiziksel ve kimyasal adsorpsiyonu ayırt etmek genel olarak kolay değildir [33].

Adsorpsiyonu etkileyen bazı faktörler şunlardır:

- pH: Hidronyum ve hidroksil iyonları kuvvetle adsorbe olduklarından, diğer iyonların adsorpsiyonu çözelti pH'ından etkilenir. Ayrıca asidik veya bazik bileşiklerin iyonizasyon derecesi de adsorpsiyonu etkiler.

- Sıcaklık: Adsorpsiyon işlemi genellikle ısı veren bir tepkime biçiminde gerçekleşir. Bu nedenle azalan sıcaklık ile adsorpsiyon büyüklüğü artar. Açığa çıkan ısının genellikle fiziksel adsorpsiyonda yoğunlaşma veya kristalizasyon ısıları mertebesinde, kimyasal adsorpsiyonda ise kimyasal reaksiyon ısıları mertebesinde olduğu bilinmektedir.

- Yüzey alanı: Adsorpsiyon bir yüzey işlemi olduğundan, adsorpsiyon büyüklüğü spesifik yüzey alanı ile orantılıdır. Adsorplantının partikül boyutunun küçük, yüzey alanının geniş ve gözenekli yapıda olması adsorpsiyonu artırır [33].

2.4.1. Mikroorganizmalarla ağır metal adsorblanma mekanizması

Mikroorganizmalarla metal adsorbsiyon mekanizması 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. Metal alımında ikinci basamak, metal iyonlarının hücre zarından içeri taşınımını da içeren, metabolik aktiviteye bağlı, daha yavaş, hücre içi giderim basamağıdır. Bu basamağa aktif giderim denir. Mikroorganizmanın, sulu ortamdan hücre yüzeyine metal adsorblanmasını açıklamaya çalışan çeşitli hipotezler ileri sürülmektedir. Bunlardan ilki;

a) 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 sahip oldukları sülfat, amino ve karboksil grupları sayesinde iyon değiştirme özelliğine

sahiptirler. Çift değerlikli metal iyonlarının, polisakkaritlerin aynı yüklü iyonlarıyla yer değiştirdiği bilinmektedir.

b) Önerilen ikinci hipotez ise, bazı mikroorganizmaların hücrelerinin dış zarlarından uzanan polimerler sentezleyebildikleri, bu polimerlerin çözeltilerden metal iyonlarını bağlayabilme yeteneğine sahip olduklarıdır.

c) 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. Amfolit karakterde olan proteinlerinde, molekülün türüne göre belirli bir izoelektrik pH' ı 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. Dolayısıyla ortam pH'ının ağır metal adsorbsiyonunda etkin bir parametre olması öngörülebilir.

d) Bazı mikroorganizmaların yüzeylerinde yüksek molekül ağırlıklı polifosfatlar veya kimyasal olarak bunlara benzeyen gruplar, metali kompleksleri şeklinde kendilerine bağlarlar. Örneğin, *Citrobacter sp.* hücrelerinde bulunan organik fosfattan, inorganik fosfatı serbest bırakan fosfataz enzimi ağır metalin, hücreye bağlı metal fosfat olarak çökmesini sağlar [33].

Ağır metal adsorbsiyonunda canlı hücreler kullanmanın sağladığı yararlar ise aşağıda sıralanmaktadır:

- 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 [34].

- 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 ise, Ağır metallerin zehirlilik etkileri nedeniyle düşük metal konsantrasyonlarında çalışılması, Besin ortamı bileşenlerine gereksinim duyulması, Tüketilmeyen besin ortamı bileşenlerinin de dış atımda yer alması, Sistem tanımlanamadığı için matematiksel modellemesinin güç olmasıdır [34].

Literatürde ağır metal iyonlarının adsorbsiyonunda mikroorganizmaların kullanılmasına yönelik birçok çalışma bulunmaktadır. İlk olarak Polikarpov (1966), radyoaktif elementlerin sulu ortamda mikroorganizmalar tarafından doğrudan adsorplanabildiğine dikkat çekerek, bu özelliğin mikroorganizmaların yaşam fonksiyonlarından bağımsız olduğunu iddia etmiştir [33].

Chiu (1972), yaptığı çalışmalarda, uranyum giderebilen bir fungal kültürü atıktan izole etmeyi başarmıştır [35].

Beveridge ve Murray (1976), *Bacillus subtilis*'in saf hücre duvarının yüksek atom numaralı elementleri adsorpladığını ve daha sonra bu elementlerin geri kazanılabileceğini göstermiştir [33].

Tsezos ve Volesky (1981), uranyum ve toryum adsorpsiyonunda değişik türde mikroorganizmalar kullanarak, farklı sıcaklık ve pH değerlerinde adsorpsiyon izotermelerini çıkarmış, sonuçları aktif karbon ve iyon değiştirici reçineler ile yapılan adsorpsiyon çalışmalarıyla karşılaştırmış ve mikroorganizmaların daha etkin adsorptif özelliklere sahip olduklarını göstermişlerdir [35].

Bu konuda ülkemizde ilk defa Aksu ve Kutsal (1990) tarafından yapılan çalışmalarda, yeşil alglerden *Chlorella vulgaris* ile Cu^{+2} , Pb^{+2} , Zn^{+2} , Cr^{+6} ve Fe^{+2} 'nin tek bileşenli adsorpsiyonu kesikli karıştırmalı kaptaki ve akışkan yatak reaktörde incelenmiş, sonuçların adsorpsiyon izotermlerine uygunluğu gösterilerek,

alglerin yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahip biyosorbentler olduğu kanıtlanmıştır [36].

İlhan ve arkadaşları (2004), yeni bir biyosorbent olarak *Penicillium lanosa-coeruleum* biyokütlesinin ağır metal adsorplama kapasitesi üzerine ön işlemlerin etkisini incelemişler ve *P.lanosa-coeruleum* biyokütlesinin, atık sulardan kursun, bakır ve nikel giderimi için düşük maliyetli, etkili bir biyosorbent olarak kullanılabilirdiğini belirtmişlerdir [37].

Gökağaçlı (2007), *Microcystis sp.* ile bakır, çinko ve demir metallerinin giderimi üzerinde çalışmış ve metallerin *Microcystis sp.* ile adsorpsiyonunun pH'a bağlı olarak farklı özellikler gösterdiğini gözlemlemiştir [9].

Günümüze değin yapılan çalışmalar göstermektedir ki kullanılan mikroorganizmanın hücre tipi ve içerdiği temel bileşenler metal adsorpsiyon mekanizmasını belirlemektedir.

2.5. Biyosorpsiyon

Atıksulardan toksik metallerin uzaklaştırılmasında yeni bir yöntem olarak biyosorpsiyon kullanılmaktadır. Isısal veya kimyasal yöntemlerle öldürülmüş mikroorganizmalar ile yapılan, adsorpsiyon işlemi biyosorpsiyon olarak tanımlanmaktadır. Biyosorpsiyon, biyolojik materyallerin sulu çözeltilerdeki atık maddeleri hücre yüzeyi veya içinde akümüle etmesidir. Bu biyolojik materyaller; bakteriler, algler, mantarlar, küfler vb. canlılardır. Metal biyosorpsiyonunda kullanılacak biyoküteller seçilirken göz önünde bulundurulması gereken en önemli faktör biyokütlenin kökenidir. Endüstriyel atıklardan veya doğadan elde edilebilen, ve hızlı üreyen mikroorganizmalar seçilmelidir. Biyosorpsiyon konusunda yapılan birçok çalışma, metal iyonlarından arındırılmış mikroorganizmaların da tekrar kullanımının mümkün olduğunu ve tekrar kullanılan mikroorganizmanın metal alım kapasitesinde önemli bir azalma olmadığını göstermiştir. Mikroorganizmalar ile ağır metal iyonlarından birinin (örneğin; Cu^{+2} iyonunun) biyosorpsiyonunu etkileyen faktörler arasında organizmanın özgül yüzey özellikleri, pH, sıcaklık, metal iyonu

başlangıç derişimi, biyokütle derişimi, biyokütle tipi, biyokütle hazırlanışı, ağır metal iyonunun kimyasal yapısı (tür, boyut, iyon yükü) sayılabilir [38]. Ağır metal iyonlarının biyosorpsiyonunda hücre zarına aktarım, fiziksel adsorpsiyon, iyon değişimi, kompleksleştirme ve çöktürme gibi olayların gerçekleştiği bilinmektedir. Hücre duvarlarında metabolizmaya bağımlı ve metabolizmadan bağımsız bağlanma olmak üzere iki tür biyosorpsiyon çalışması literatürde mevcuttur [39].

Mikroorganizmalarla ağır metal adsorpsiyonunda ölü hücreler kullanılmasının (Biyosorpsiyonun) avantajları şu şekilde sıralanabilir:

- Sistemdeki mikroorganizma üreme parametreleri elimine edilir, metalin mikroorganizma üzerindeki zehirlilik etkileri önemsiz hale gelir.
- Besleme akımı besin ortamı bileşenlerini içermez, çıkış akımında kullanılmamış besin ortamı bileşenleri bulunmaz ve besin ortamının bileşenleriyle metal kompleksleşmesi problemi olmaz.
- Metal giderimi çok hızlı ve verimlidir ve mikroorganizma bir iyon değiştirici gibi davranır.
- Metal geri kazanılabilir.
- Sistem matematiksel olarak tanımlanabilir [34, 40-41].

Ölü hücrelerle çalışmanın tercih edilmeyen yönleri ise, Hücre yüzeyi çok hızlı bir şekilde metalle doymuş hale geldiğinden adsorpsiyonun pH gibi etkilere karşı duyarlı olması, ölü hücrelerin, metalin değerliğini biyolojik olarak değiştirme potansiyeline sahip olmayışı ve ağır metallerin zehirlenme etkilerine karşı dirençli zincirler geliştirme potansiyellerinin olmamasıdır [34, 40-41].

Literatürde biyokütlelerin sahip oldukları biyosorpsiyon özelliklerinin metal dirençliliği ile ilişkilendirilmesi konusunda farklı görüşler bulunmaktadır. Örneğin; *S. cerevisiae*'nin katı ortamda daha yüksek konsantrasyonlardaki Cu (II) iyonlarını tolere edebildiği görülürken; sıvı ortamda bu toleransın daha düşük konsantrasyonlarda olduğu görülmüştür. Çeşitli araştırmacılar tarafından benzer sonuçlar rapor edilmiştir [42-47].

Tsekova ve Galabova (2003), *Rhizopus delemar*'ın atık sulardan Cu (II) iyonunun giderimi için biyobirikim yeteneğinin yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Ancak yüksek Cu (II) konsantrasyonlarında *Rhizopus delemar*'ın iyi üreme gösteremediği için biyobirikim yeteneğinin azaldığını görmüşlerdir. Bu durumu yüksek Cu(II) konsantrasyonunun hücre üzerinde toksik etki yaratması ile ilişkilendirmişlerdir.[48].

Sannasi ve arkadaşları (2004), metal işleme aktiviteleri ile ilgili bölgelerden toplanan karışık bakterilerden oluşan bir konsorsiyum kültürü ile, Cr(VI), Cu(II) ve Pb(II) nun sulu ortamlardan uzaklaştırılmasını canlı ve ölü hücrelerle incelemişlerdir. Canlı hücrelerin ölü hücrelerden daha fazla metal tutma kapasitesi gösterdikleri, Cu(II) için 178.87 mg/g maksimum kapasiteye pH 6 da ulaşıldığı saptanmıştır. PH 6-8 aralığında canlı hücrelerin ölü hücrelerden, Cu için % 17-28 daha fazla metal tutma kapasitesine sahip olduğu görülmüştür. Daha düşük metal konsantrasyonlarında ve daha asidik ortamlarda (pH 3-4) ölü hücrelerin ağır metal giderim kapasitesi yüksektir [49].

Anand ve arkadaşları (2005), Cu(II) iyonunun *Trichoderma viride* ile giderimi sırasında biyoakümülyasyon mekanizmasını incelemişlerdir. 100 mg/l $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonunda, Cu(II) iyonunun %81'inin 72 saat içinde 3.4 g/l biyokütle ağırlığı ile uzaklaştırıldığını görmüşlerdir. Olayın sıcaklık ve pH a bağımlı olduğunu saptamışlardır. Elektron mikroskopu ve hücre fonksiyonu ile yapılan çalışmalar, bakırın %70-80'inin hücre duvarı yüzeyinde, bir tabaka halinde bulunduğunu göstermişlerdir [50].

Akar ve Tunalı (2006), Pb(II) ve Cu(II) iyonları için biyosorpsiyon özelliğini araştırmışlar ve *A. flavus*'un sulu çözeltilerden Pb(II) ve Cu(II) iyonlarının giderimi için ucuz ve etkili bir biyosorbent olduğunu belirtmişlerdir [51].

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Çayırova kampüsünün batısında kalan Darıca Bölgesi sınırları içinde ağır metallerce kirlenmiş olduğu düşünülen topraklardan örnekler derlenmiştir. Beş adet toprak numunesinin toplandığı Darıca'nın bu kesiminde metal sektörüne ait fabrikalar bulunmaktadır. Ayrıca toprak örneklerinin alındığı bölgede hurda metallerinin taşındığı yoğun bir trafik yükü ve hurdaların depolandığı geniş alanlar söz konusudur. Kasım 2007'de belirlenen araştırma alanının beş farklı noktasından örnekler alınmıştır. Örnek alma noktaları tespit edilirken ağır metal kirliliğinin fazla olduğu düşünülen noktalar seçilmiştir. Bu noktalar taralı alan olarak Şekil 3.1'de verilmiştir. Toprak örnekleri toprak yüzeyinin 3-5 cm derinliğinden alınıp steril plastik kutular içine konulmuştur. Daha sonra toprak örnekleri izolasyon işlemi için laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvara getirilen toprak örneklerinden mikroorganizmalar izole edilmiş ve bakır giderim kapasiteleri Atomik Absorpsiyon Spektrofotometre (AAS) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan tüm materyaller Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Bölümü'nden temin edilmiştir. Çalışmanın tamamı Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Çevre Mühendisliği Bölümü'nün Çevre Biyoteknolojisi Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Toprak örneklerinin alındığı bölgenin konumu (Alan taralı olarak gösterilmiştir)

3.1.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan araç ve gereçler

Toprak örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar ile bakır giderimini analiz etmede hem organik parametrelerin hem de inorganik parametrelerin ayrı ayrı tespiti için çok sayıda cihaz ve ekipmana ihtiyaç duyulmaktadır. Aşağıda bu çalışma sırasında kullanılan temel cihazlar verilmiştir.

- Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi, Perkin Elmer 1100
- UV-visible Spektrofotometre, GBC-Cintra20
- pH metre, HANNA Instruments pH 211 Microprocessor pH Meter
- Hassas Terazı, Ohaus AV64
- İnkübatör, Binder
- Santrifüj, Hettich Zentrifugen-EBA20
- Vorteks, Yellowline
- Saf su cihazı, Millipore (Milli-Q Academic A10)
- Su banyosu, Grant
- Manyetik Karıştırıcı, Clifton Cerastr
- Derin Dondurucu (-20°C) , Siemens
- Buzdolabı (+4°C), Arçelik
- Otoklav, Astell

- Laminar Hava Akışlı Kabin, Elicent-legrand
- Mikropipet, Eppendorf research (200-1000 µl)
- Ters Mikroskop, Olympus IX 81
- Fotoğraf Makinesi, Canon Powershot A470

3.1.2. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler

Madde Adı	Firma
Bakır (II)-Sülfat-5-hydrate extra pure (CuSO ₄ .5H ₂ O)	Riedel de Haën
Pepton	Merck
Yeast extract (maya ekstraktı)	Merck
Sodyum Klorür (NaCl)	Merck
Agar	Merck
Gliserol	Merck
Potasyum Hidroksit (KOH)	Merck
Hidroklorik Asit (HCl)	Riedel de Haën
Kristal viyolet	Sigma
Lugol mordantı	Sigma
Etil Alkol	Merck
Safranin	Sigma
Glikoz	Merck
Üre	Merck
Amonyum Klorür (NH ₄ Cl)	Merck
Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Dipotasyum Hidrojen Fosfat (K ₂ HPO ₄)	Merck
Demir (III)-Klorür-6-hydrate extra pure (FeCl ₃ .6H ₂ O)	Merck
Magnezyum Sülfat-7-hydrate extra pure (MgSO ₄ .7H ₂ O)	Merck
Kalsiyum Klorür (CaCl ₂)	Merck
Sodyum Bikarbonat (NaHCO ₃)	Merck

Deneysel çalışmalarda $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ stok çözeltisi, sentetik atık su, kalibrasyon çözeltisi, HCl asit çözeltisi, KOH çözeltisi, NaCl çözeltisi kullanılmıştır. Çözelti ve solüsyonların hazırlanışı aşağıda verilmiştir.

3.1.2.1. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ stok çözeltisinin hazırlanması

Bakır stok solüsyonu bakır miktarı 200 mg/L olacak şekilde hazırlanmış ve otoklavlanarak sterilize edilmiştir. 78,64 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ tartılıp 100 ml suda çözülmüştür. Denemeler esnasında bu stok çözeltiden gerekli miktarlarda alınarak 10, 20, 40, 70, 80, 100 ve 150 mg/L bakır içeren besiyerleri hazırlanmıştır.

3.1.2.2. Sentetik atık suyun hazırlanması

Sentetik atık su içinde mikroorganizmaların bakır giderimi aktivitesini belirlemek amacıyla aşağıdaki içeriğe sahip sentetik atık su hazırlanmıştır.

1 litre sentetik atık su 1200 mg Glikoz, 53 mg üre, 101 mg NH_4Cl , 35 mg KH_2PO_4 , 15 mg K_2HPO_4 , 0.5 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 100 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 7.5 mg CaCl_2 , 294 mg NaHCO_3 , 20 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ içermektedir. Hazırlanan sentetik atık su 121 °C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra kullanılmıştır.

3.1.2.3. Kalibrasyon çözeltisinin hazırlanması

Çalışma aralığına uygun 4 ile 8 tane kalibrasyon çözeltisi, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Riedel-de Haën 12849) stok çözeltisinden seyreltme yapılarak hazırlanmıştır. İlk kalibrasyon çözeltisi hazırlanırken 100 mg/L'lik bakır solüsyonundan 50 ml'lik bir seri balon jøjeye sırasıyla 1 ml, 2,5 ml, 5 ml ve 10 ml aktarılmış ve her bir ölçülü balon jöjenin hacmi saf suyla tamamlanarak karıştırılmıştır. Bu solüsyonlar sırasıyla mililitrede 2, 5, 10 ve 20 µg bakır içermektedir. İkinci kalibrasyon çözeltisi hazırlanırken 200 mg/L'lik bakır solüsyonundan 50 ml'lik bir seri balon jøjeye sırasıyla 2,5 ml, 6,25 ml, 12,5 ml ve 25 ml aktarılmıştır. Her bir ölçülü balon jöjenin hacmi saf suyla tamamlanarak karıştırılmıştır. Bu solüsyonlar 10, 25, 50 ve 100 µg/ml bakır

içermektedir. Hazırlanan bu çözeltilerin atomik absorpsiyon cihazında ölçümleri yapılarak konsantrasyonları kontrol edilmiştir.

3.1.2.4. Hidroklorik asit çözeltisinin hazırlanması

1 M HCl çözeltisi hazırlamak için %37 lik derişik hidroklorik asit çözeltisinden 83 ml alınıp 1000 ml distile su ile tamamlanmıştır. 1 M HCl çözeltisinden 10 ml alınıp 90 ml distile suyla karıştırılarak 1/10 oranında seyreltilmiş HCl asit çözeltisi elde edilmiştir. Hazırlanan HCl çözeltisi besiyeri pH'sını ayarlamak için kullanılmıştır.

3.1.2.5. Potasyum hidroksit çözeltisinin hazırlanması

1 M KOH çözeltisi hazırlamak için potasyum hidroksitten 5,6 g tartılıp 100 ml distile su ile çözülür. Hazırlanan bu çözelti besiyeri pH'sını ayarlamak için kullanılmıştır.

3.1.2.6. NaCl çözeltisinin hazırlanması

% 0,9 konsantrasyona sahip NaCl çözeltisi hazırlamak için sodyum klorürden 0,9 g tartılıp 100 ml distile su ile çözelti haline getirilmiştir. Hazırlanan bu çözelti otoklavlandıktan sonra seyreltme yöntemi için kullanılmıştır.

3.1.3. Besiyerleri

Bu çalışmada toprak örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar için besiyeri olarak LB (Luria Broth) besiyeri seçilmiştir. Luria Broth besiyerinin bileşimi aşağıda verilmiştir.

- Luria Broth Besiyeri (LB)

Pepton 10 g

Yeast ekstrakt 5 g

NaCl 10 g

Bakır solüsyonu (Bakır stok solüsyonundan 50 veya 100 ml)

Katı besiyeri (Luria Agar) hazırlamak için besiyerine 15 g/L olacak şekilde agar ilave edilmiştir. 121°C'de 15 dakika otoklavlanmış ve soğutulduktan sonra kullanılmıştır. Hazırlanan besiyerinin pH'sı 7,5 a ayarlandıktan sonra distile su eklenerek 1 litre hacime tamamlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edildikten sonra kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Toprak örneklerinden mikroorganizmaların izolasyonu

Steril ortamda laboratuvara getirilen 5 adet toprak örneğinin her birinden 1 gr alınarak önceden otoklavlanmış 15 ml'lik falkon tüplere konulmuş ve bu toprak parçacıklarının üzerine 20 ppm Cu⁺² içeren 10 ml LB besiyeri eklenmiştir. Hazırlanan falkon tüpler 30 °C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında üreme gösteren karışık kültürlerden 1 ml alınmış ve bakır içeren taze besiyerine transfer edilmiştir. Toprak örneklerinden mikroorganizmaları izole edebilmek için bu işlem 3 defa tekrarlanmıştır. Yapılan bu özengenleştirme işleminden sonra elde edilen karışık kültürlerden 5 ml alınarak bakır 20 ppm bakır içeren 50 ml LB besiyerine ekim yapılmıştır. Bu çalışmalar esnasında steril bir ortam sağlamak, farklı mikroorganizmalar ile kontaminasyonu önlemek amacıyla kullanılan besiyeri 121 °C de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir. İşlemler gerçekleştirilirken steril mikropipet ucu, öze kullanılmış ve olası kontaminasyon riskini ortadan kaldırmak için laminar kabin içerisinde ateş yanında çalışılmıştır.

3.2.2. Saf kültürlerin eldesi

1, 2, 3, 4 ve 5 olarak numaralandırılmış toprak örneklerinden izole edilen beş farklı karışık kültür N₁, N₂, N₃, N₄ ve N₅ olarak adlandırılmıştır. Elde edilen karışık kültürler % 0,9 konsantrasyona sahip steril tuzlu su çözeltisinde 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ ve 10⁻⁴ oranında seyreltilmiş ve LA besiyerlerine 200 µl aktarılarak yayma işlemi yapılmıştır. Petriyer kolonilerin oluşması için inkübatöre konularak 30 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. N₃ karışık kültürü iyi üreme gösteremediği için daha

sonraki çalışmalarda kullanılmamıştır. Birbirinden farklı görünüşe sahip olan koloniler yeni LA besiyerine çizgi ekim yöntemi ile aktarılmış ve saf kültürler elde edilmiştir.

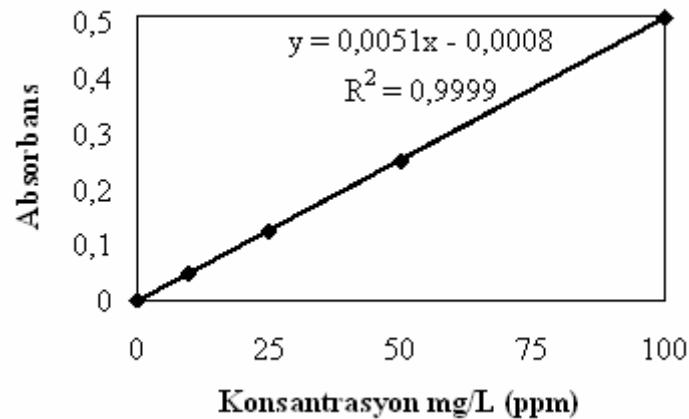
3.2.3. Atomik absorpsiyon cihazı ile bakır tayini

Atomik absorpsiyon cihazı ile bakır analizi yapmak için öncelikle hazırlanan kalibrasyon çözeltilerinin konsantrasyonları ölçülmüş ve ölçülen değerlere göre bir kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. AAS'de bakır analizi için örnek hazırlarken, 50 ml'lik falkon tüplere mikroorganizmaların ekim işlemi gerçekleştirildikten sonra inkübasyonun 0., 80., ve 160. saatlerinde 15 ml'lik falkon tüplerine 10 ml kültür alınmıştır. Alınan örneklerin öncelikle U.V spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Daha sonra bu örnekler 60 rpm de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı mikropipetle alınarak yeni tüplere aktarılmış, tüpün dibinde kalan kısım atılmıştır. Santrifüj işlemi sonrasında yeni tüplere aktarılan süpernatantlar bakır miktarı tayini için AAS'de analiz edilmiştir. Bakır miktarları bilinen kalibrasyon çözeltileri ile deney numunelerinin optik yoğunlukları karşılaştırılarak deney numunesindeki bakır miktarı tayin edilmiştir. Bakır tayini için Perkin Elmer 1100 model Alevli AAS kullanılmıştır. Son aşamada ise laboratuvar analizlerinden elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

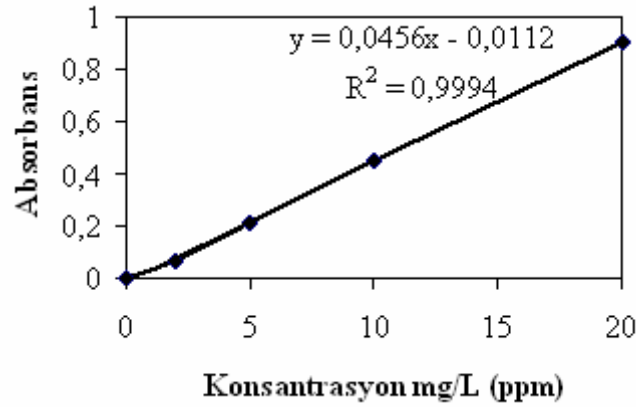
Atomik absorpsiyon spektrofotometresi, elementel analizlerde kullanılan önemli bir araçtır. Örnekteki aranan elementler, o elemente has dalga boyundaki ışığı soğurması yardımıyla bulunmaktadır. Oyuk katot lambada (Hallow cathode Lamp), aranan elementin dalga boyu genelde elementin kendisinin uyarılması ile elde edildiği için, örnekteki miktarlar için kesin sonuçlar verebilmektedir. Alevli AAS, sonuçları ppm cinsinden okumaktadır. Bu yüzden büyük konsantrasyonlu metallerin analizlerinde tercih edilmektedir [52].

3.2.3.1. Kalibrasyon eğrilerinin çıkarılması

Kalibrasyon grafiği oluşturabilmek için, öncelikle analizi yapılacak olan bakır elementinin belirli konsantrasyonlarda çözeltileri yani kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır. 10 mg/L bakır(II) içeren analizi için, atomik absorpsiyon spektrofotometresi (Perkin Elmer 1100) kullanılarak $\lambda=216,5$ nm'de önce kalibrasyon çözeltilerinin absorbans değerleri okunmuş, daha sonra aynı şekilde 10mg/L bakır konsantrasyonuna sahip solüsyonun absorbans değerleri okunarak tayin edilmiştir. 20mg/L bakır(II) analizi için ise atomik absorpsiyon spektrofotometresi (Perkin Elmer1100) kullanılarak $\lambda=324,8$ nm'de kalibrasyon çözeltilerinin absorbans değeri okunduktan sonra 20mg/L bakır içeren numunelerin absorbans değerleri okunarak tayin edilmiştir. Elde edilen veriler ışığında kalibrasyon çözeltilerinin absorbans-konsantrasyon grafikleri çizilerek, doğru denklemi belirlenmiştir. 20 ppm bakır analizi için hazırlanan kalibrasyon çözeltilerinin konsantrasyonları $\lambda=324,8$ nm dalga boyunda iyi absorbans gösterirken, 10 ppm bakır analizi için hazırlanan kalibrasyon çözeltilerinin konsantrasyonları ise $\lambda=216,5$ nm'de iyi absorbans gösterir. Hazırlanan kalibrasyon çözeltilerinin konsantrasyonlarının farklı olduğu için, farklı dalga boylarında absorbans değerleri ölçülerek analiz yapılmıştır.



Şekil 3.2. AAS'de 10 mg/L bakır analizi için elde edilen kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.3. AAS'de 20 mg/L bakır analizi için elde edilen kalibrasyon eğrisi

3.2.4. Elde edilen karışık kültürlerde bakır gideriminin incelenmesi

Elde edilen karışık kültürler 20mg/L konsantrasyonunda Cu^{+2} iyonu içeren Luria Broth besiyerine ekildikten sonra 30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Deneyle 160 saat boyunca devam etmiştir. 20 mg/L konsantrasyonunda Cu^{+2} iyonu içeren sıvı besiyerine ekim işlemi gerçekleştirildikten sonra her bir karışık kültür örneğinden ekimin 0., 80. ve 160. saatlerinde 10 ml alınmış ve bakır konsantrasyonu AAS'de ölçülmüştür.

3.2.5. Karışık kültürlerden izole edilen kültürlerde bakır gideriminin incelenmesi

Karışık kültürlerden izole edilen kültürler 10mg/L ve 20 mg/L konsantrasyonlarında Cu^{+2} iyonu içeren LB besiyerine ekildikten sonra 30 °C'de 160 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 10 mg/L ve 20 mg/L konsantrasyonlarında içeren Cu^{+2} iyonu içeren sıvı besiyerine ekim işlemi gerçekleştirildikten sonra her bir saf kültür örneğinden ekimin 0., 80. ve 160. saatlerinde 10 ml alınarak besiyerindeki bakır konsantrasyonları AAS'de ölçülmüştür. Yapılan ölçümler sonucunda Cu^{+2} iyonlarının gideriminde oldukça etkili olduğu anlaşılan N_1c ve N_5a saf kültürleri üzerinde farklı sıcaklık (25 °C-30 °C-37 °C), farklı pH (5,0-6,8-8,0) ve farklı bakır konsantrasyonlarının etkisine bağlı olarak Cu^{+2} iyonlarının giderimi incelenmiştir.

3.2.6. Sentetik atık su içerisinde bakır biyogideriminin incelenmesi

Elde edilen karışık kültürler 20 mg/L konsantrasyonunda bakır solüsyonu içeren sentetik atık suya transfer edildikten sonra 30° C’de 160 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 20 mg/L Cu⁺² iyonu içeren sentetik atık su içerisine karışık kültürlerin transfer ekimi yapıldıktan sonra her bir karışık kültür numunesinden ekimin 0., 80. ve 160. saatlerinde bir miktar alınarak kültürlerin zamana bağlı bakır giderimi AAS’de ölçüm yapılarak incelenmiştir.

3.2.7. Bakır(II)’nin % giderim verimliliğinin hesaplanması

Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresinde konsantrasyon değerleri belirlenen örneklerin Cu⁺² % giderim verimliliği aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır [53].

$$\% \text{ Giderim} = \frac{C_0 - C_{\text{son}}}{C_0} \times 100$$

C₀ : Başlangıç metal konsantrasyonu (mg/L)

C_{son} : Temas süresinin ardından sıvı kısımda kalan metal konsantrasyonu (mg/L)

3.2.8. Mikroorganizmaların üreme eğrilerinin çıkarılması

Karışık kültürden izole edilen kültürlerde hücre miktarındaki zamana bağlı artış UV-VIS spektrofotometre (GBC-Cintra20) ile ölçülmüştür. Üreme eğrileri hücre kültürlerinin 600 nm dalga boyunda verdiği absorbans değeri kullanılarak oluşturulmuştur.

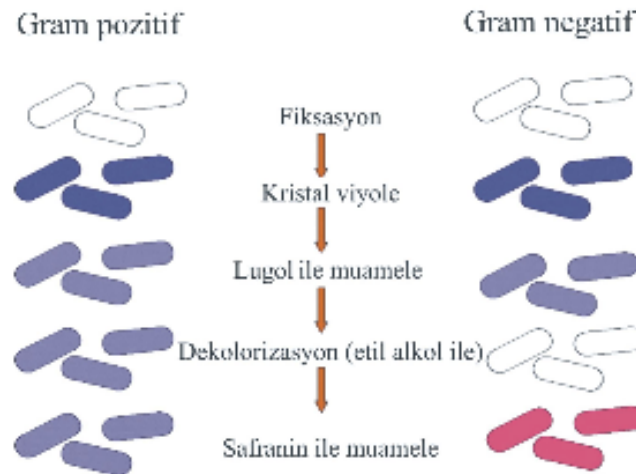
3.2.9. Mikroorganizmaların tanımlanma çalışmaları

İzole edilen saf kültürler 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ ve 10⁻⁴ oranında seyreltildikten sonra 20 mg/L Cu⁺² iyonu içeren LA besiyerine her bir dilüsyondan 100 µl aktarılarak yayma ekim yapılmıştır. Petriler 30 °C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan

sonra agar üzerinde oluşan koloniler görüntülenmiştir. Koloni sayımı ve tespitinden sonra koloniler %20 gliserol içeren 1ml LB besiyerine aktarılarak -20 °C’de saklanmıştır. Cu⁺² iyonlarının gideriminde etkin özellik gösteren N_{1c} ve N_{5a} kültürleri gram boyama yöntemi ile boyanarak mikroskop altında incelenmiştir. N_{1c} ve N_{5a} olarak adlandırılan saf kültürlerin koloni morfolojileri, aerobik büyüme, mezofilik büyüme, spor oluşturma özellikleri belirlenmiş ve Bergey’s teşhis anahtarında (Bergey’s Manuel of Determinative Bacteriology (1994)) özellikleri bilinen mikroorganizma cinsleri ile kıyaslanmıştır [54].

3.2.9.1. Gram boyama yöntemi

Danimarkalı biyolog Gram tarafından geliştirilen boyalarla mor renkte boyanan bakteriler Gram (+), pembe renkte boyanan bakteriler Gram (-) olarak değerlendirilir. Farklı boyanmalarının temel nedeni hücre duvarlarının farklı olmasıdır [55]. Gram (+) bakterilerin hücre duvarı kalındır. Peptidoglikan ve teikoik asit bulundurur. Gram (-) bakterilerin ise hücre duvarı daha incedir. Peptidoglikan, lipopolisakkarit ve lipoprotein bulundurur [56]. Boyama işleminin basamakları şekil 3.4’de gösterilmiştir [57].



Şekil 3.4. Gram boyama prosesi

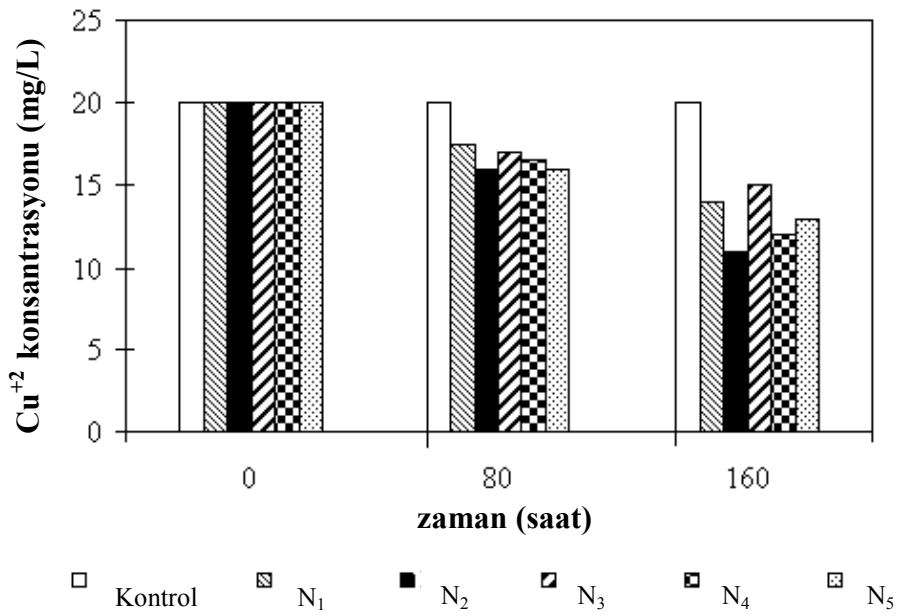
3.2.9.2. Spor oluşturma özelliğini tespit yöntemi

Bazı mikroorganizma hücreleri olumsuz evre şartlarında hayatta kalabilmek için spor oluştururlar. Ortam şartları elverişli hale geçtiğinde sporlar imlenirler ve normal hücreler tekrar remeye başlar. Spor oluşturan mikroorganizmalar dışında birçok mezofilik mikroorganizmanın 50-60 derecenin üzerindeki ısılarda canlılığını yitirdiği bilinmektedir [58]. Cu^{+2} iyonlarının gideriminde oldukça etkili olduğu anlaşılan N_{1c} ve N_{5a} kültürlerinin spor oluşturup oluşturmadığı zcengiz ve Alaeddinoğlu (1991) tarafından geliştirilmiş olan prosedür kullanılarak tespit edilmiştir [59]. Kültürler % 0,9 konsantrasyona sahip steril NaCl zeltisi içeren farklı tüplere aktararak 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4} oranında seyreltikten sonra her bir dilüsyondan LA besiyerine 200 μ l aktararak yayma ekim yapılmıştır. Daha sonra seyreltme yapılan tüpler su banyosunda 90 $^{\circ}C$ 'de 15 dk ısıtıldıktan sonra tekrar her bir dilüsyondan Luria Agar besiyerine 200 μ l aktararak yayma ekim işlemi yapılmıştır. Yayma ekim işleminin yapıldığı petriler 30 $^{\circ}C$ 'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında yayma ekim yapılan petrilere koloni oluşumlarına bakılarak spor oluşturup oluşturmadığı tespit edilmiştir. Sporlanma yeteneğine sahip mikroorganizmalar 90 $^{\circ}C$ ' de inkübasyona tabi tutulduklarında sporlar ölmeyeceği için inkübasyondan sonra sporların LA besiyeri üzerinde koloni oluşturması beklenmektedir.

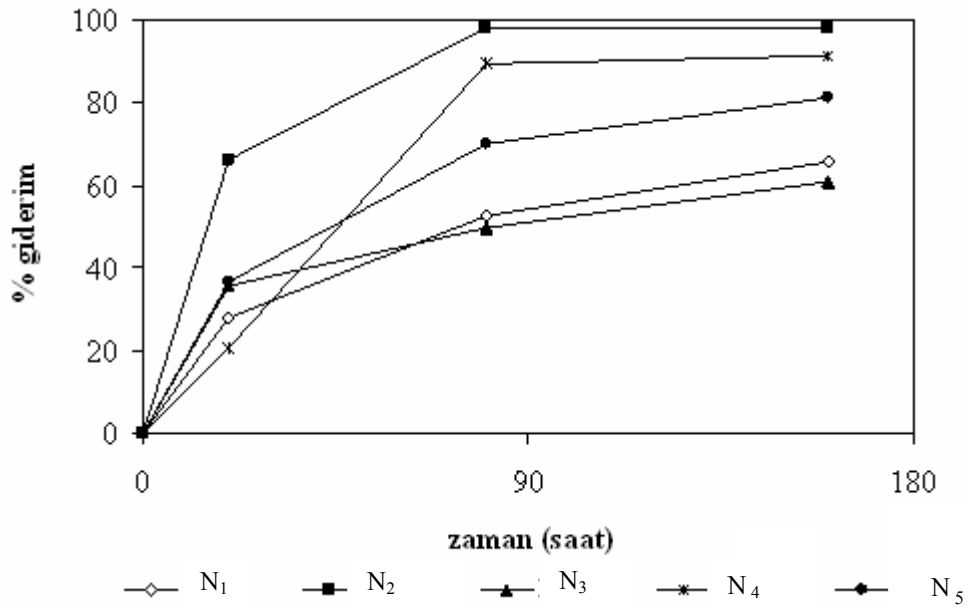
BÖLÜM 4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. Elde edilen karışık kültürlerde bakır gideriminin belirlenmesi

Bakır (Cu^{+2}) giderimi yapabilen mikroorganizmaların izolasyonu için ağır metal içeriğinin yüksek olduğu düşünülen sanayi bölgesinden alınan toprak numuneleri kullanılmıştır. Toprak örneklerinin alındığı bölgenin konumu gösterilmiştir (Bkz. Şekil 3.1). Beş adet farklı toprak örneğinden mikroorganizmalar izole edilmiş ve laboratuvar ortamında çoğaltılmıştır. Karışık kültürlerin Cu^{+2} iyonu giderim kapasitelerini belirlemek için zamana bağlı olarak besiyerindeki bakır konsantrasyonunun değişimi incelenmiştir. Bakır analizleri AAS (Perkin Elmer 1100) cihazıyla yapılmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda N_2 olarak adlandırılan karışık kültürün 20 mg/L Cu^{+2} iyonu içeren besiyerinde bakır giderim kapasitesinin diğer kültürlerle kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1a). Şekil 4.1a karışık kültürlerdeki zamana bağlı Cu^{+2} iyonu konsantrasyonundaki azalmayı göstermektedir. Zamana bağlı Cu^{+2} gideriminin % verimlilik ($(C_0 - C_{\text{son}}) : C_0 \times 100$) grafiği ise Şekil 4.1b'de görülmektedir.



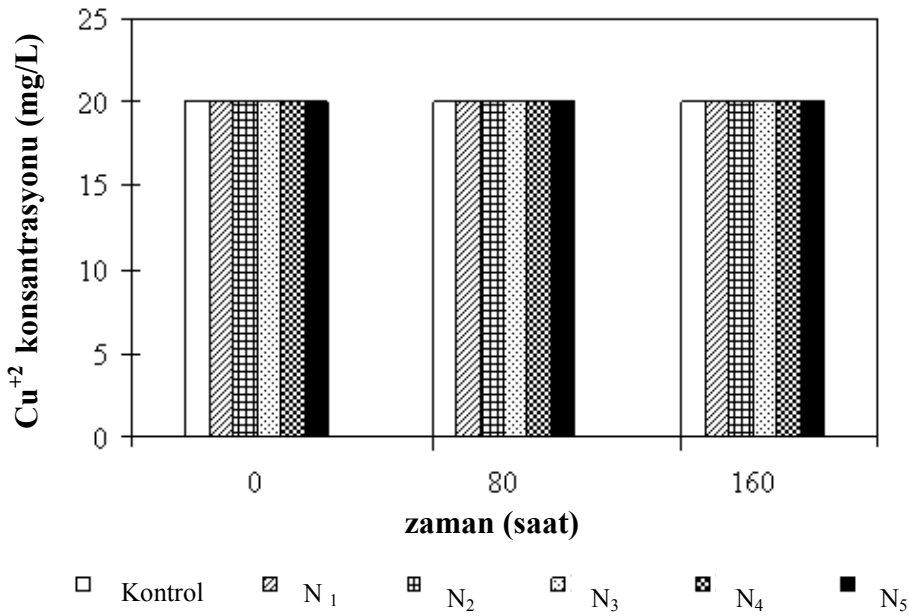
Şekil 4.1a. Karışık kültürlerin zamana bağlı bakır(II) giderimi



Şekil 4.1b. Karışık kültürlerin zamana bağlı bakır giderim verimlilikleri

4.1.1. Sentetik atık suda karışık kültürler ile bakır giderimi

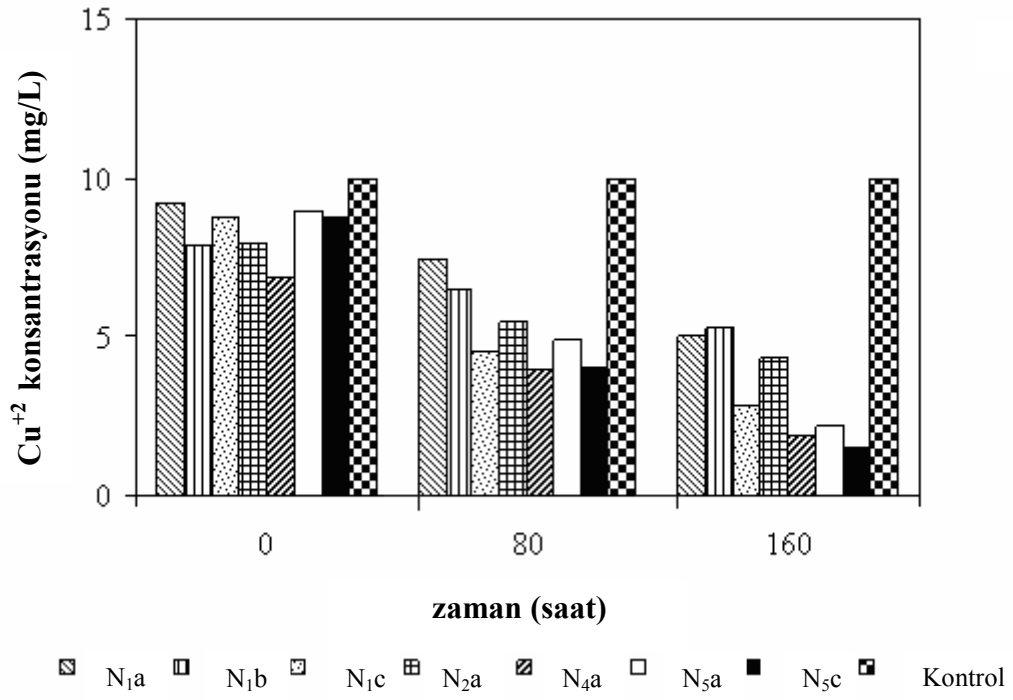
Sentetik atık su içerisinde canlı mikroorganizmalar aracılığıyla bakır(II) iyonlarının giderimini belirlemek için elde edilen karışık kültürler LB besiyeri yerine 20 mg/L Cu⁺² iyonu içeren sentetik atık su içerisine ekilmiştir. Hücrelerin sentetik atıksuda bakır(II) giderimi yapamadıkları tespit edilmiştir (Şekil 4.2).



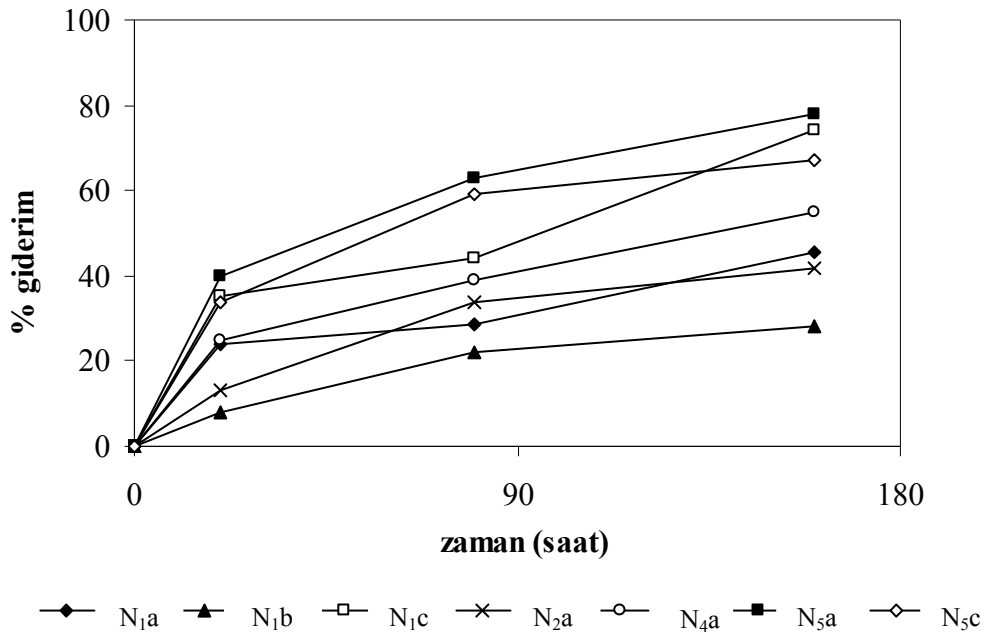
Şekil 4.2. Sentetik atık suda karışık kültürler ile bakır(II) giderimi

4.2. Karışık kültürlerden izole edilen saf kültürler ile bakır giderimi

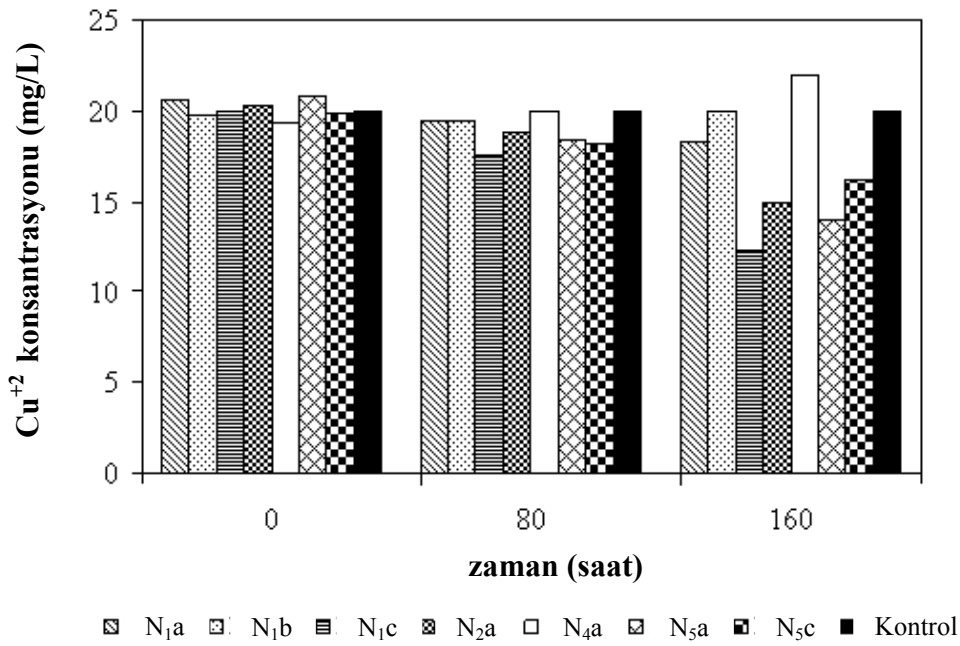
Karışık kültürlerden elde edilen her bir kültür elde edildiği karışık kültür numarasının ardına a, b ve c harfleri gelecek şekilde kısaltılarak N₁a, N₁b, N₁c, N₂a, N₂b, N₄a, N₅a, N₅b, N₅c şeklinde adlandırılmıştır. N₂b ve N₅b kültürü karışık kültürlerden elde edilmesine rağmen birbirinden ayrılmayan iki farklı koloni içerdiğinden saf olarak elde edilememiştir. İzole edilen kültürler 10 mg/L ve 20 mg/L konsantrasyonlarında Cu⁺² iyonu içeren besiyerlerine ekilmiş ve farklı zamanlarda alınan örneklerdeki Cu⁺² konsantrasyonu ölçülmüştür. 10 mg/L Cu⁺² içeren sıvı besiyerinde üreme gösteren kültürlerden N₄a, N₅a ve N₅c saf kültürlerinin Cu⁺² gideriminde oldukça etkili olduğu görülmüştür (Şekil 4.3a). 20 mg/L Cu⁺² içeren besiyerinde ise N₁c ve N₅a izolatlarının daha etkin olduğu ve 160 saat sonunda bakır konsantrasyonunu sırasıyla 12 mg/L ve 14mg/L'ye düşürdükleri görülmüştür (Şekil 4.4a). Saf kültürlerin 10 mg/L ve 20 mg/L Cu⁺² içeren besiyerindeki zamana bağlı Cu⁺² giderim verimlilikleri Şekil 4.3b ve Şekil 4.4b'de görülmektedir.



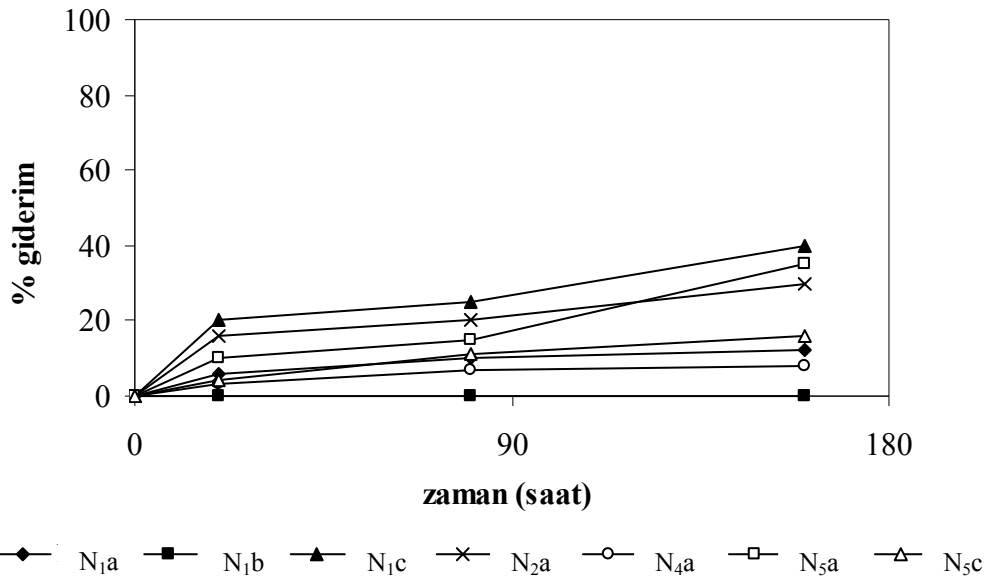
Şekil 4.3a. 10mg/L Cu(II) içeren besiyerinde saf kültürlerin bakır(II) giderimi



Şekil 4.3b. 10 mg/L Cu(II) içeren besiyerinde saf kültürlerin bakır (II) giderim verimlilikleri



Şekil 4.4a. 20 mg/L Cu(II) içeren besiyerinde saf kültürlerin bakır (II) giderimi



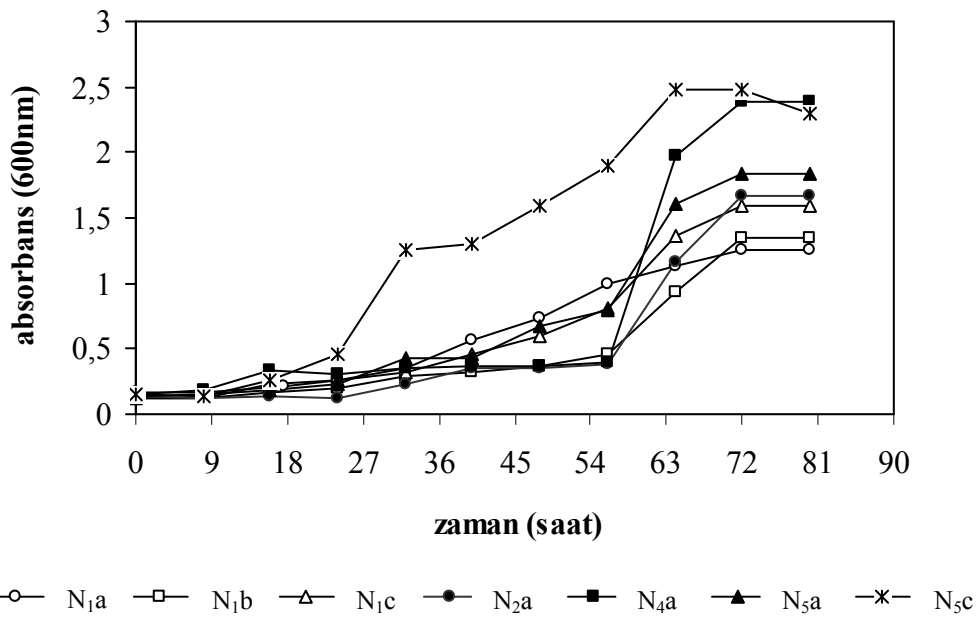
Şekil 4.4b. 20 mg/L Cu(II) içeren besiyerinde saf kültürlerin bakır(II) giderim verimlilikleri

10 mg/L Cu²⁺ içeren besiyerinde N_{5a} ile giderim verimi 80. saat sonunda yaklaşık % 40 oranında gerçekleşmiş, giderim verimi artarak deney süresi sonuna kadar (160 saat sonunda) %78'e çıkmıştır. 20 mg/L Cu²⁺ içeren besiyerinde N_{1c} saf kültürü 80. saat sonunda yaklaşık % 20 oranında bakır giderimi yaparken 160 saat sonunda verim % 40'a yükselmiştir. Besiyerindeki bakır konsantrasyonundaki artış %

verimliliğin düşmesine neden olmaktadır. Ancak yüksek bakır konsantrasyonunda giderilen net bakır miktarı daha yüksektir.

4.3. Saf kültürlerin üreme eğrileri

Elde edilen saf kültürlerin 10 mg/L Cu^{+2} iyonu içeren besiyerinde üremeleri sonucu her bir saf kültürün hücre miktarındaki zamana bağlı artışları ölçülmüştür. Elde edilen saf kültürlerin belirlenen üreme eğrileri Şekil 4.5’de verilmektedir.



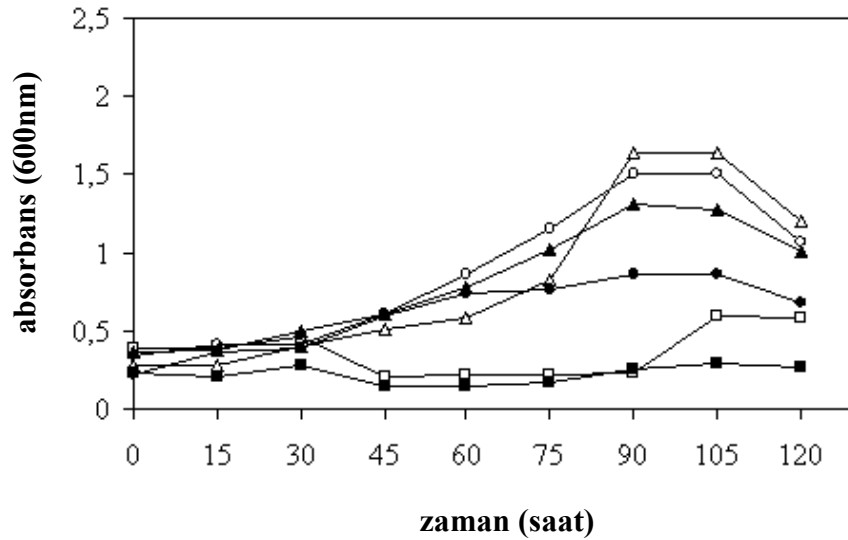
Şekil 4.5. Saf kültürlerin üreme eğrileri

4.4. pH, sıcaklık ve bakır konsantrasyonunun yüksek bakır giderimi gösteren saf kültürlerin üremeleri ve bakır giderimlerine olan etkisinin belirlenmesi

20 mg/L bakır varlığında en yüksek bakır giderimi gösteren N_{1c} ve N_{5a} izolatlarının üremeleri ve bakır giderim kapasiteleri üç farklı sıcaklıkta (25°C-30°C-37°C), üç farklı pH’da (5,0-6,8-8,0) ve yedi farklı bakır konsantrasyonunda (0 mg/L-10 mg/L-20 mg/L-40 mg/L-70 mg/L-100 mg/L-150 mg/L) incelenmiştir. Deney sonucunda N_{1c} ve N_{5a} izolatlarının en iyi üreme ve giderim gösterdikleri optimum sıcaklık, pH ve bakır konsantrasyonları belirlenmiştir.

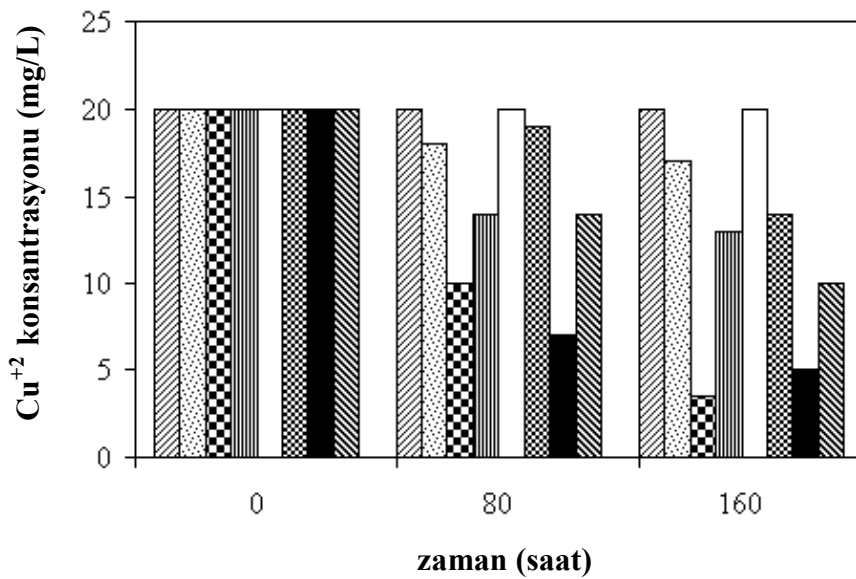
4.4.1. pH etkisi

Yüksek bakır giderimi gösteren N_{1c} ve N_{5a} izolatlarının farklı pH'larda üreme eğrileri, bakır giderim kapasiteleri ve bakır giderim verimlilikleri aşağıdaki şekillerde görülmektedir.



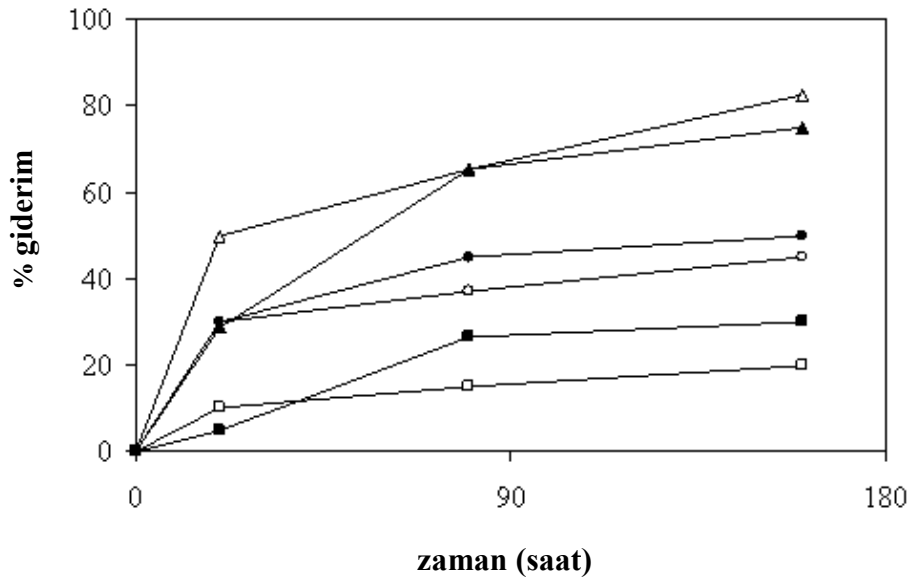
N_{1c} ; □-pH 5.0 △-pH 6.8 ○-pH 8.0 N_{5a} ; ■-pH 5.0 ▲-pH 6.8 ●-pH 8.0

Şekil 4.6a. Farklı pH'larda N_{1c} ve N_{5a} izolatlarının üreme eğrileri



N_{1c} ; □Kontrol ▨pH 5.0 ▩pH 6.8 ■pH 8.0 N_{5a} ; □Kontrol ▨pH 5.0 ▩pH 6.8 ■pH 8.0

Şekil 4.6b. Farklı pH'larda N_{1c} ve N_{5a} izolatlarının bakır giderim kapasiteleri



N_{1c}; □—pH 5.0 △—pH 6.8 ○—pH 8.0 N_{5a}; ■—pH 5.0 ▲—pH 6.8 ●—pH 8.0

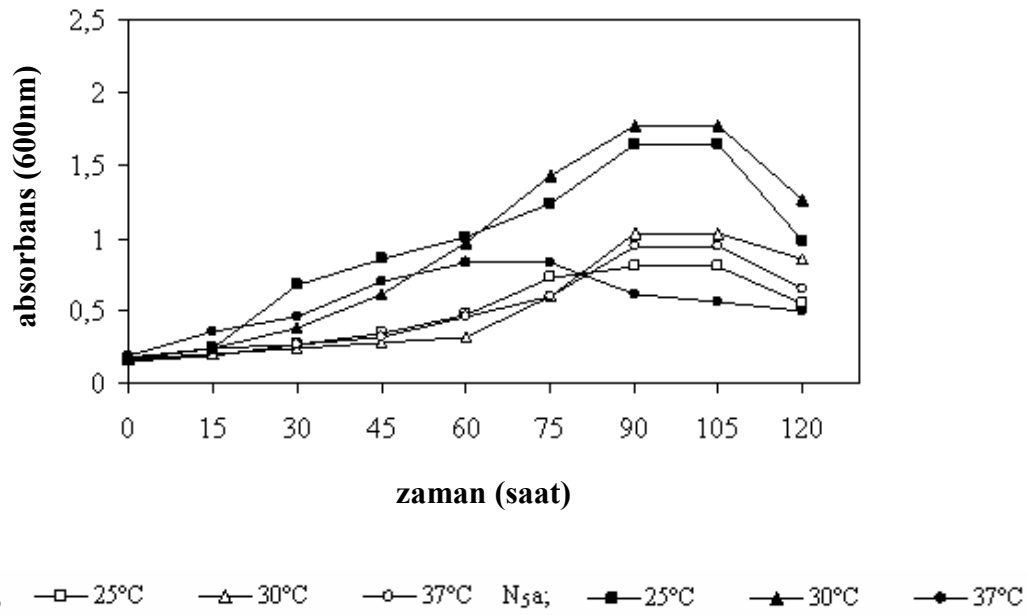
Şekil 4.6c. Farklı pH'larda N_{1c} ve N_{5a} izolatlarının bakır giderim verimlilikleri

Şekil 4.6a'da görüldüğü gibi N_{1c} ve N_{5a} izolatları pH 6.8 değerinde en yüksek üreme hızına ulaşmışlardır. pH sı 5.0 olan besiyerinde her iki izolatında iyi üreme gösteremedikleri görülmektedir. Benzer şekilde N_{1c} ve N_{5a} izolatlarının pH 6.82 değerinde oldukça iyi Cu⁺² giderimi gösterdiği, pH 5.0 değerinde ise iyi bakır(II) giderimi gösteremedikleri görülmektedir (Şekil 4.6b).

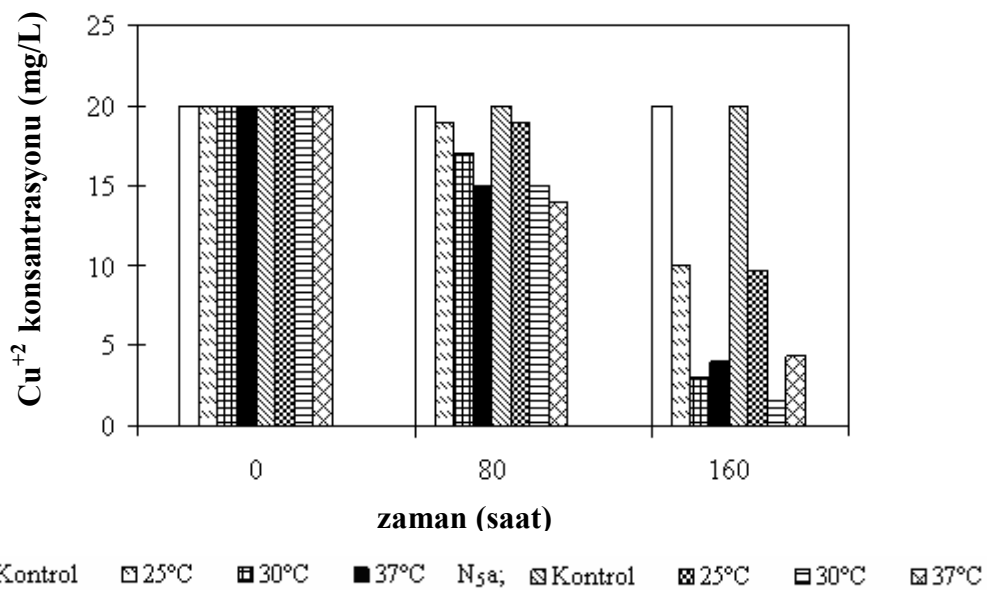
Şekil 4.6c'de görüldüğü gibi N_{1c} saf kültürü ile en iyi bakır(II) giderim verimine pH 6.82 değerinde ulaşılmıştır. N_{1c} saf kültürü ile pH 6.82'de % giderim verimi 80. saat sonunda yaklaşık % 50 oranında gerçekleşmiş, giderim verimi artarak deney süresi sonuna kadar yaklaşık % 82'ye ulaşmıştır. N_{5a} saf kültürü ile en yüksek giderim verimine pH 6.82 değerinde ulaşmıştır. N_{5a} izolatu ile pH 6.82'de % giderim verimi 80. saat sonunda yaklaşık % 29 oranında gerçekleşmiş, giderim verimi artarak 160 saat sonunda yaklaşık % 75'e yükselmiştir.

4.4.2. Sıcaklık etkisi

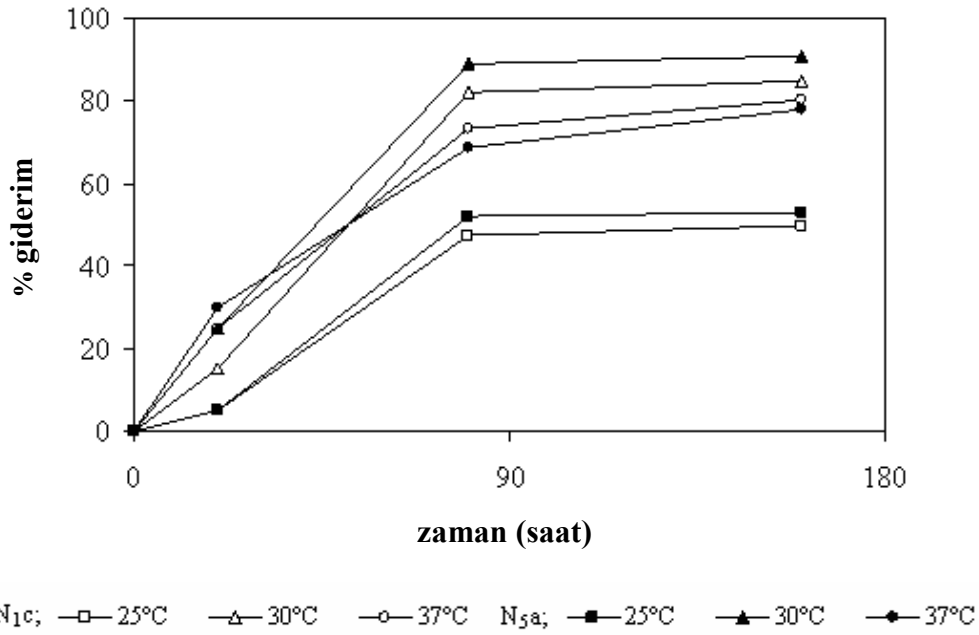
Tez çalışmasının bu bölümünde sıcaklığın N_{1c} ve N_{5a} izolatlarının üremeleri ve bakır giderim kapasitelerine olan etkisi incelenmiştir. Şekil 4.7a incelendiğinde N_{1c} ve N_{5a} izolatlarının optimum üreme sıcaklıklarının $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ olduğu görülmektedir. N_{5a} izolatının $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ de iyi üreme gösteremediği dikkat çekmektedir.



Şekil 4.7a. Farklı sıcaklıklarda N_{1c} ve N_{5a} izolatlarının üreme eğrileri



Şekil 4.7b. Farklı sıcaklıklarda N_{1c} ve N_{5a} izolatlarının bakır giderim kapasiteleri

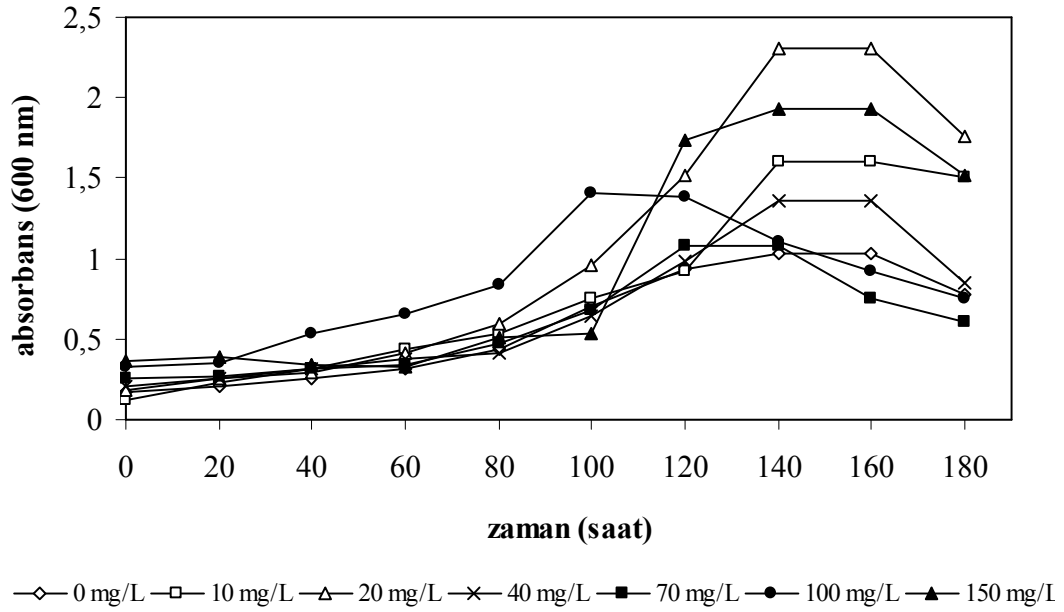


Şekil 4.7c. Farklı sıcaklıklarda N_{1c} ve N_{5a} izolatlarının bakır giderim verimlilikleri

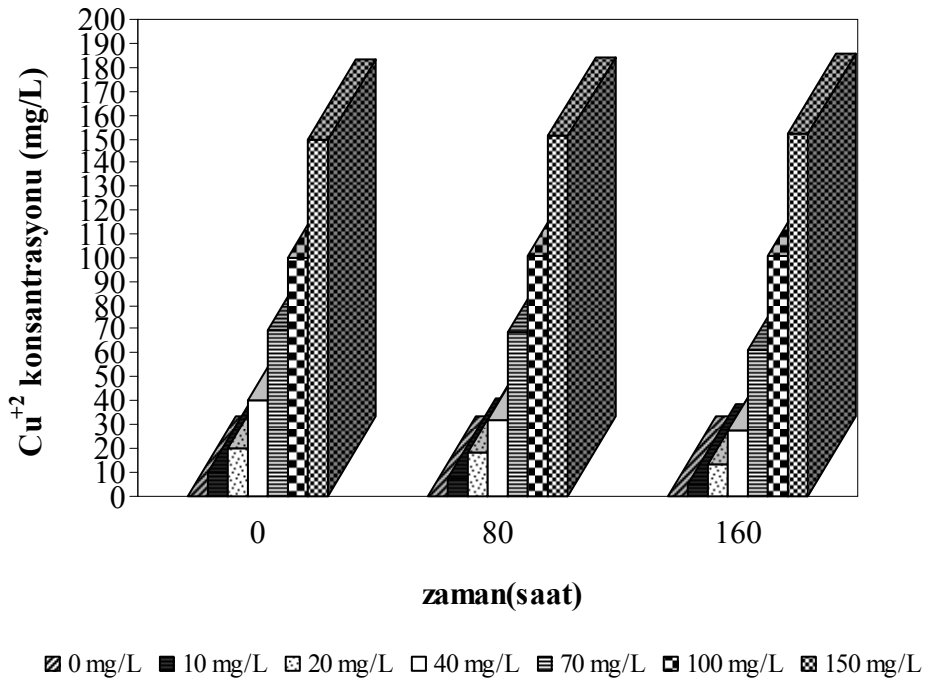
N_{1c} ve N_{5a} kültürlerinde 30°C'de bakır gideriminin yüksek olduğu, sıcaklığın 25°C'ye düşmesinin giderimi olumsuz yönde etkilediği görülmüştür (Şekil 4.7b). N_{1c} kültürü ile 30°C'de giderim verimi 80 saatin sonunda yaklaşık % 15, 160 saat sonunda ise % 85 olarak ölçülmüştür. N_{5a} izolatu da en yüksek giderimi 30°C'de gerçekleştirmiş, % giderim verimi deney sonunda %91 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.7c).

4.4.3. Farklı bakır konsantrasyonlarının etkisi

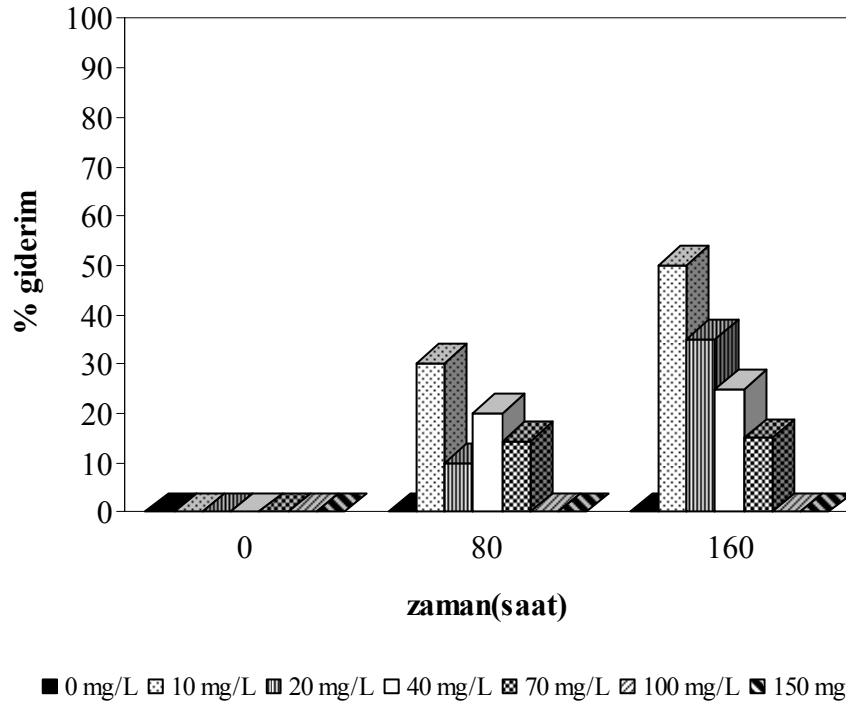
Farklı bakır konsantrasyonlarına sahip besiyerlerinde izolatların üreme eğrilerini ve giderim verimliliklerini görmek amacıyla izolatlar yedi farklı bakır konsantrasyonunda üretilmişlerdir. N_{1c} ve N_{5a}'nın farklı bakır konsantrasyonlarındaki üreme eğrileri, bakır giderim kapasiteleri ve bakır giderim verimlilikleri sırasıyla şekil 4.8a, 4.8b, 4.8c ile şekil 4.9a, 4.9b, 4.9c'de görülmektedir.



Şekil 4.8a. N₁c izolatının farklı Cu(II) konsantrasyonlarındaki üreme eğrisi

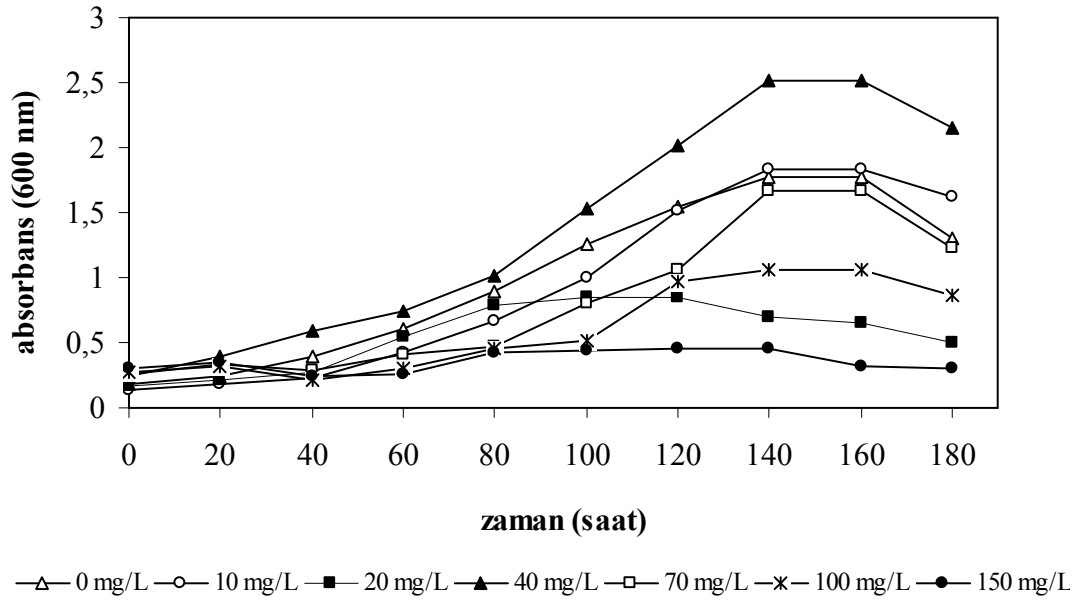


Şekil 4.8b. N₁c izolatının farklı Cu(II) konsantrasyonlarında bakır giderim kapasitesi

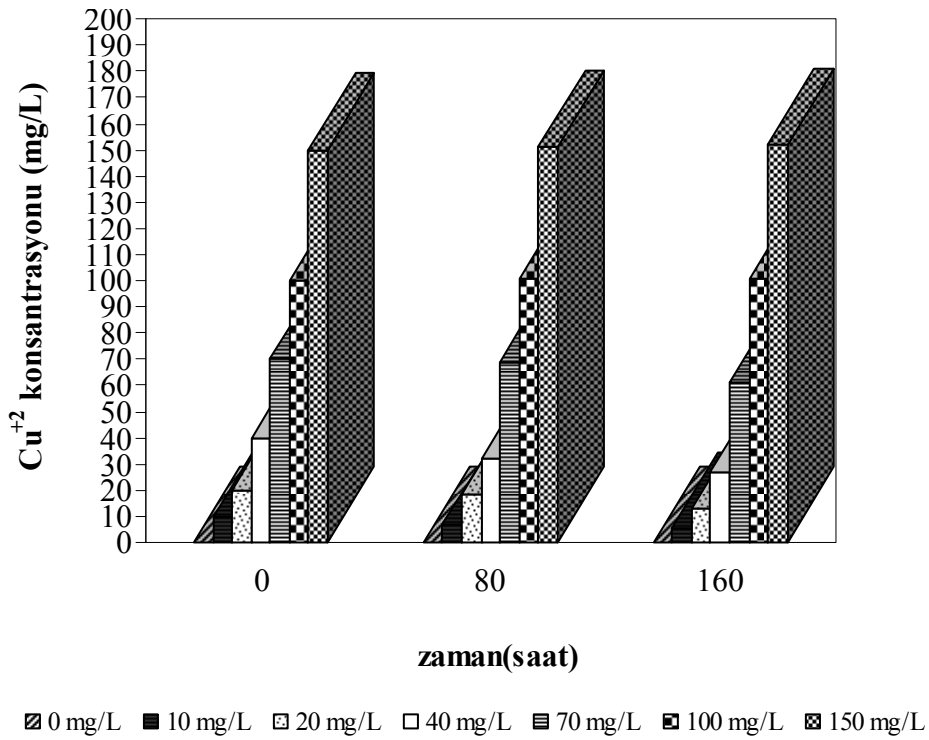


Şekil 4.8c. N₁c izolatının farklı Cu(II) konsantrasyonlarında bakır giderim verimi

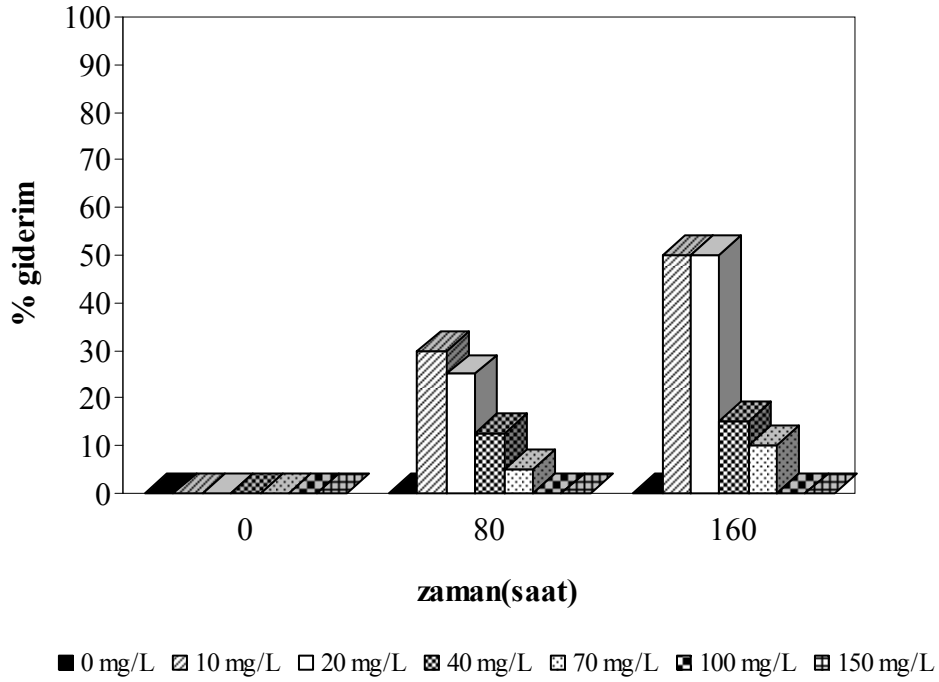
Farklı bakır konsantrasyonlarının üremeye olan etkisi incelendiğinde 20 mg/L Cu⁺² konsantrasyonunun N₁c'nin üremesi için en elverişli konsantrasyon olduğu görülmektedir (Şekil 4.8a). N₁c izolatının bakır içermeyen ortamda üreme hızının düşük olduğu da gözden kaçmamaktadır. Bakırın N₁c'nin üremesini olumlu yönde etkilediği söylenebilir.



Şekil 4.9a. N_5a izolatının farklı Cu(II) konsantrasyonlarındaki üreme eğrisi



Şekil 4.9b. N_5a izolatının farklı Cu(II) konsantrasyonlarında bakır giderim kapasitesi



Şekil 4.9c. N₅a izolatının farklı Cu(II) konsantrasyonlarında bakır giderim verimi

Şekil 4.9a'da N₅a izolatının farklı bakır konsantrasyonlarında üreme eğrileri incelendiğinde bakırın N₅a'nın hızlı üremesi için gerekli bir element olduğu görülmektedir. İzolatın 40 mg/L Cu⁺² iyonu içeren besiyerinde en yüksek üreme hızına ulaştığı görülmektedir.

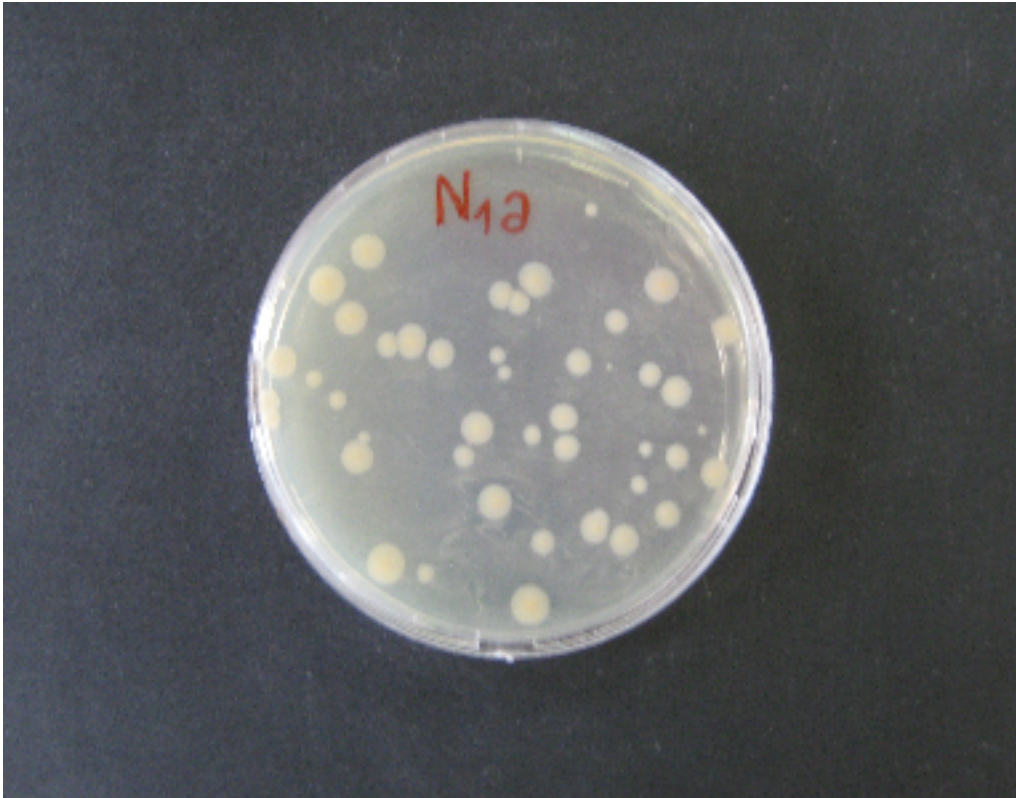
Şekil 4.8b ve Şekil 4.9b'ye bakıldığında N₁c ve N₅a'nın 10 mg/L ve 20 mg/L Cu⁺² içeren besiyerlerinde oldukça yüksek miktarda Cu⁺² giderimi gerçekleştirdiği görülmektedir. Besiyerindeki Cu⁺² konsantrasyonu miktarı arttıkça izolatların bakır(II) giderim kapasitesi azalmaktadır.

Şekil 4.8c'de görüldüğü gibi N₁c saf kültürü ile 10 mg/L Cu⁺² konsantrasyonunda yaklaşık % 50 oranında giderim verimi elde edilmiş, 20 mg/L Cu⁺² konsantrasyonunda ise yaklaşık % 35 giderim verimi elde edilmiştir. N₅a saf kültürü ile 10 mg/L ve 20 mg/L Cu⁺² konsantrasyonlarında yaklaşık %50 oranında giderim verimi elde edilmiştir (Şekil 4.9c).

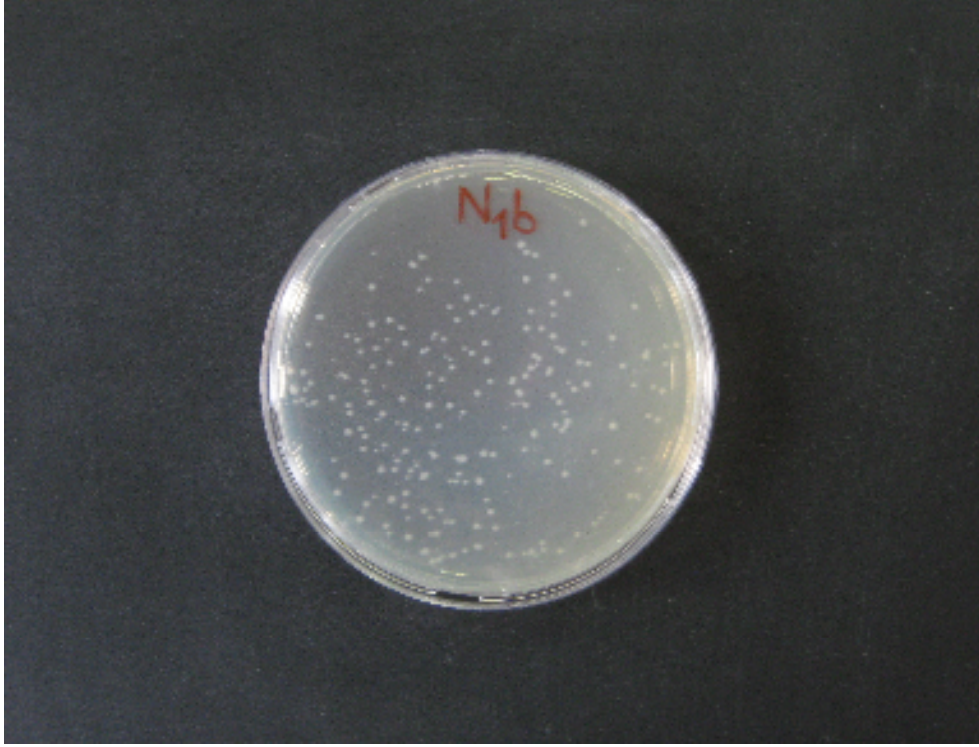
4.5. Yüksek bakır giderimi gösteren saf kültürlerin tanımlama çalışmaları

4.5.1. Koloni morfolojisi

Bu çalışmada karışık kültürlerden izole edilen kültürler seyreltilerek LA besiyerine yayma ekim yapılmış, 30°C’de 48 saat inkübasyona tabi tutulduktan sonra agarlı besiyeri üzerinde saf kültürlerle ait koloni oluşumları gözlenmiştir. Saf kültürlerin oluşturduğu kolonilerin büyüklüğü ve şekli incelenerek koloni morfolojileri belirlenmiştir. Elde edilen saf kültürlerle ait koloni morfolojilerinin fotoğrafları çekilerek görüntüleri tespit edilmiştir (Şekil 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15 ve 4.16). Karışık kültürlerden izole edilen kültürler seyreltip ekildiğinde petriler üzerinde üreyen bazı kolonilerin birbirinden ayrılamadığı görülmüştür. Tek başına üreme gösteremedikleri için saf olarak elde edilemeyen bu kolonilerin de fotoğrafları çekilerek koloni morfolojileri tespit edilmiştir (Ek A1 ve Ek A2).



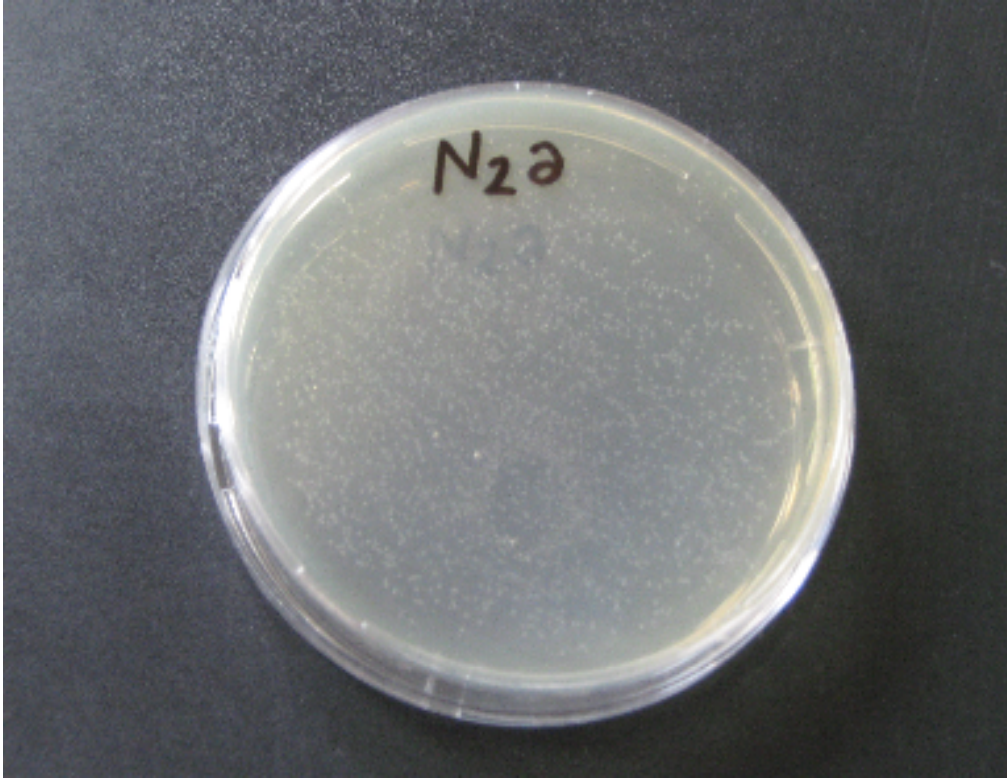
Şekil 4.10. N₁ a izolatına ait koloniler



Şekil 4.11. N₁ b izolatına ait koloniler



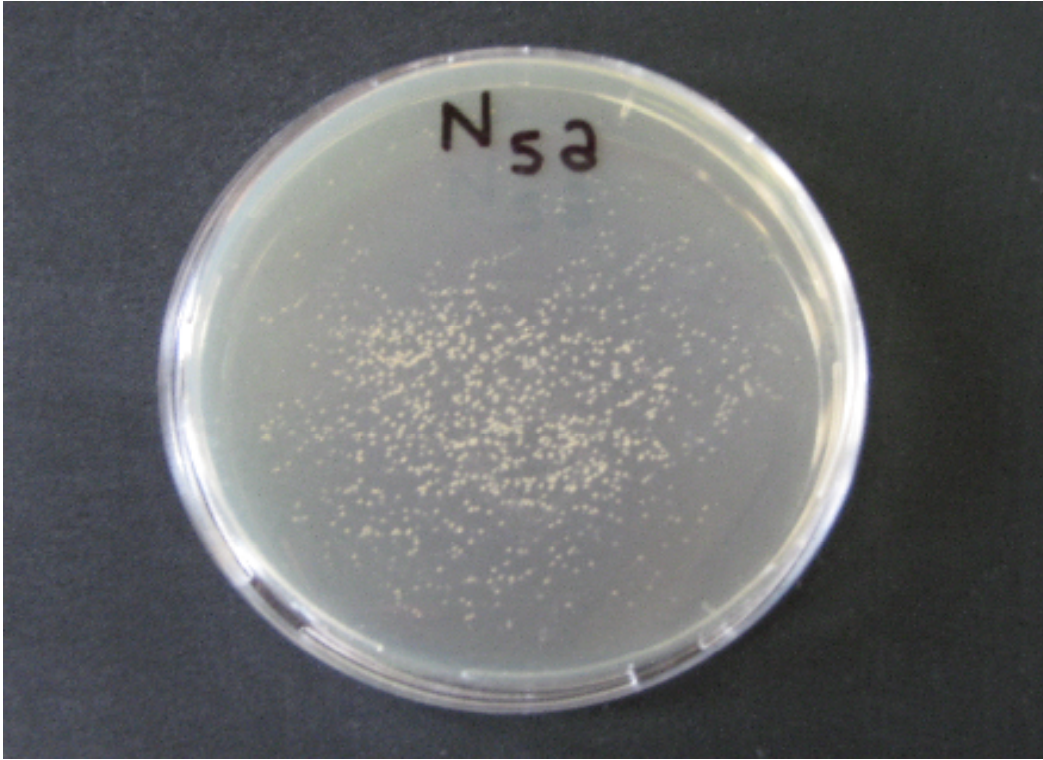
Şekil 4.12. N₁ c izolatına ait koloniler



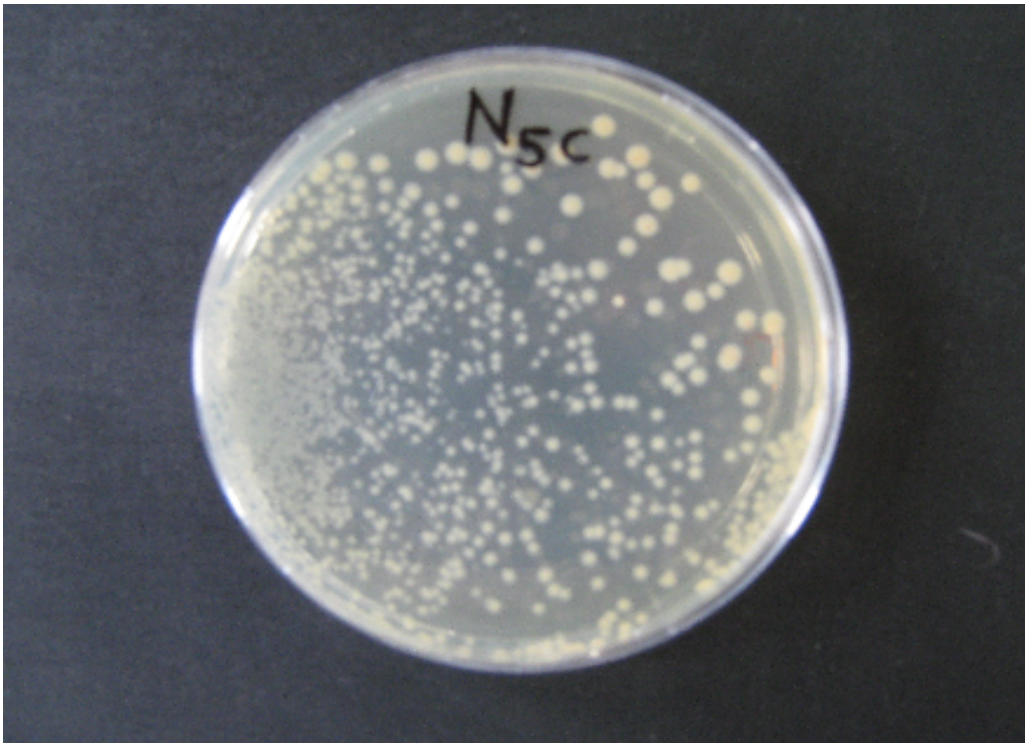
Şekil 4.13. N₂ a izolatına ait koloniler



Şekil 4.14. N₄ a izolatına ait koloniler



Şekil 4.15. N₅a izolatına ait koloniler



Şekil 4.16. N₅c izolatına ait koloniler

Elde edilen izolatlarla ait kolonilerin görüntülerine bakılarak belirlenen özellikler Tablo 4.1’de verilmiştir.

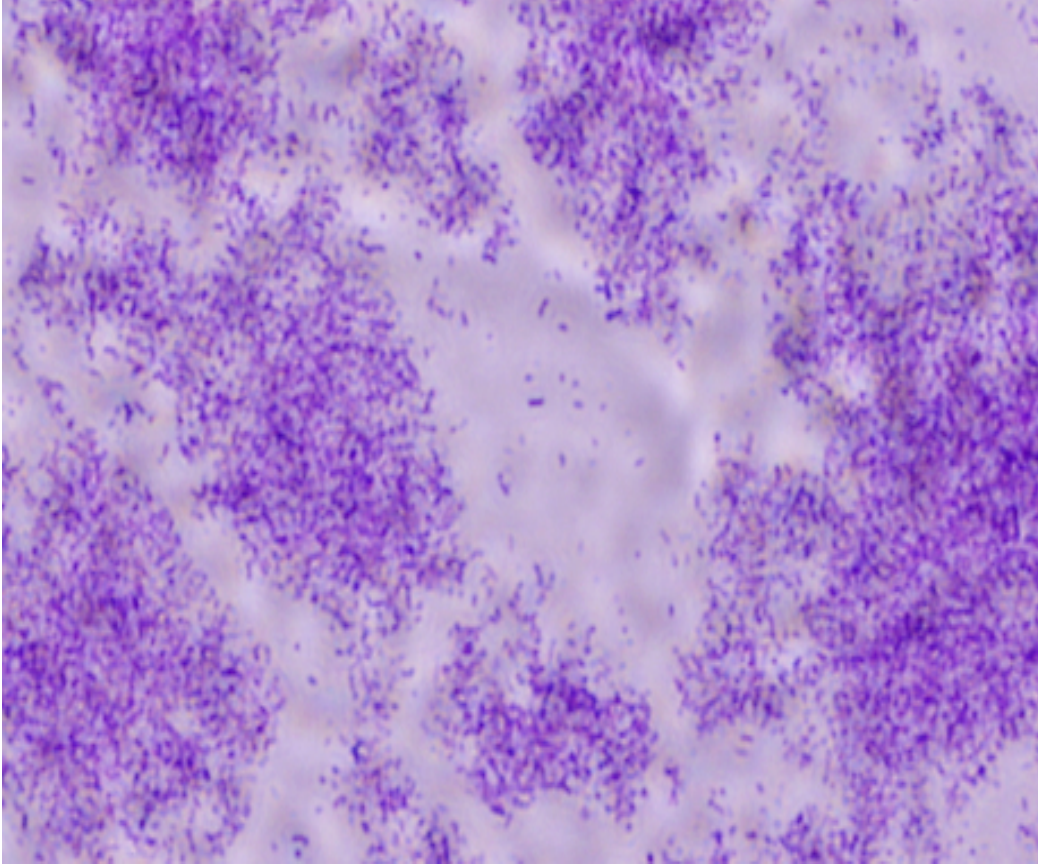
Tablo 4.1. Elde edilen saf kültürlerin koloni morfolojilerine ait özellikler

Saf Kültür	Koloni Rengi	Koloni Boyutu	Koloni Morfolojisi
N ₁ a	Açık sarı renkli	2 mm	Yuvarlak, Düzgün
N ₁ b	Krem-beyaz renkli	0.50 mm	Yuvarlak, Düzgün
N ₁ c	Krem-beyaz renkli	1 mm	Yuvarlak, ortası kalkık
N ₂ a	Şeffaf renkli	0.25 mm	Çok küçük, Düzgün
N ₄ a	Krem-beyaz renkli	1,2 mm	Yuvarlak, Düzgün
N ₅ a	Krem-beyaz renkli	0.40 mm	Yuvarlak, Düzgün
N ₅ c	Krem-beyaz renkli	1,1 mm	Yuvarlak, Düzgün, Etrafı şeffaf zonlu

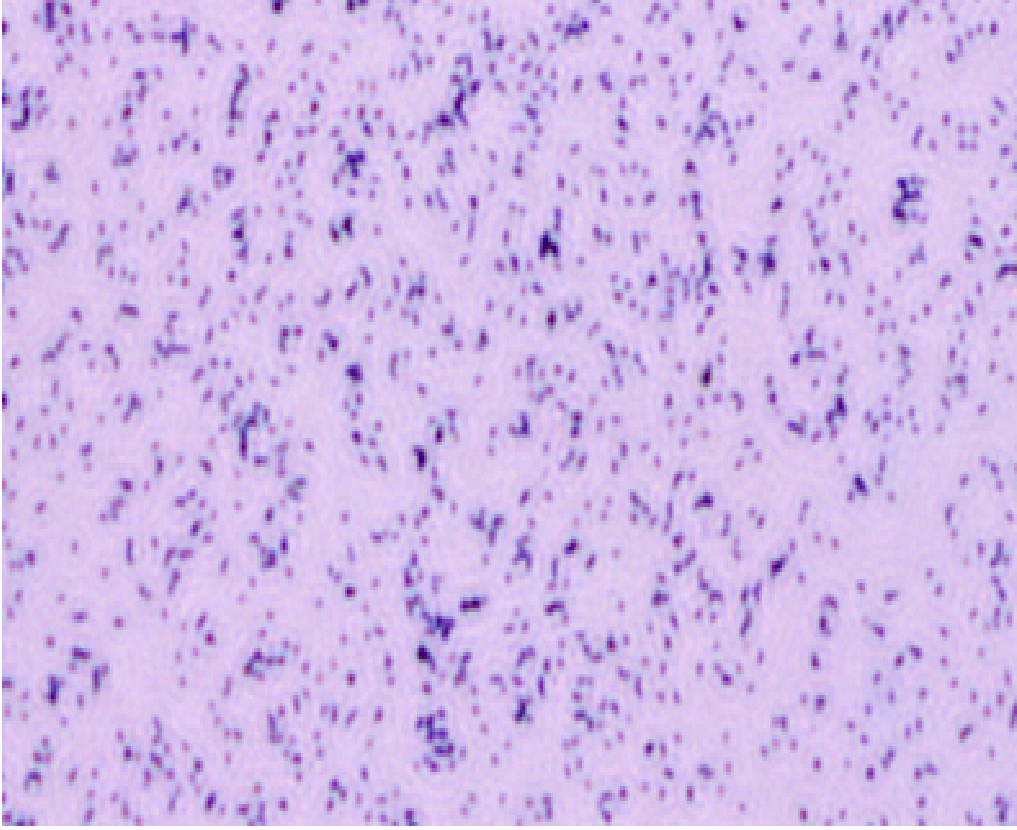
4.5.2. Gram boyama ve sporlanma

Yüksek bakır giderimi gösteren N₁c ve N₅a izolatlarının tanımlanmasına yönelik olarak her iki saf kültür gram boyama yöntemi ile boyanmış ve sporlanma deneyi yapılarak spor oluşturup oluşturmadıkları belirlenmiştir.

Yüksek bakır giderimi gösteren N₁c ve N₅a izolatlarının gram boyama yöntemi ile boyanması sonucu her iki saf kültür mor renkte boyandığı için gram (+) olarak değerlendirilmiştir. N₁c ve N₅a izolatlarının gram boyama yöntemi ile boyandıktan sonra mikroskopta gözlenen görüntüleri Şekil 4.17 ve Şekil 4.18’de verilmiştir.



Şekil 4.17. N₁c izolatının gram boyama sonrası mikroskopik görüntüsü (60x)



Şekil 4.18. N₅a izolatının gram boyama sonrası mikroskopik görüntüsü (60x)

Şekil 4.17'de N₁c izolatının gram boyama yöntemi ile boyandıktan sonraki mikroskopik görüntüsüne bakıldığında N₁c saf kültürüne ait hücrelerin ince, uzun basil şeklinde ve mor renkte olduğu görülmektedir.

Şekil 4.18'da N₅a izolatının gram boyama yöntemi ile boyandıktan sonraki mikroskopik görüntüsüne bakıldığında N₅a hücreleri mor renkli kokobasil şeklinde görülmektedir. Gram boyama sonucunda yüksek bakır giderimi gösteren her iki izolatın da gram pozitif olduğu saptanmıştır. Bu izolatların spor oluşturup oluşturmadığını tespit etmek için yapılan deney sonrasında her iki saf kültürün de sporlanamadıkları tespit edilmiştir.

4.5.3. Yüksek bakır giderimi gösteren saf kültürlerin cins düzeyinde tayini

Yüksek bakır giderimi gösteren N_{1c} ve N_{5a} izolatlarının taksonomik cinslerinin tayin edilmesi için izolatların yukarıda belirlenen özellikleri Bergey's teşhis anahtarındaki (Bergey's Manuel of Determinative Bacteriology (1994)) farklı mikroorganizma cinslerinin özellikleri ile kıyaslanmıştır. Bergey's teşhis anahtarında N_{1c} ve N_{5a}'ya benzer özellik gösteren cinsler ve özellikleri aşağıda Tablo 4.2'de verilmiştir. Bu tez çalışmasında izolasyonu yapılan hücrelerin tabloda adı geçen bakteri cinslerinden olduğu düşünülmektedir. İzolatların ait oldukları cins ve tür grupları yapılacak olan ileri karakterizasyon çalışmaları (16SrRNA dizi analizi) sonucunda tespit edilecektir.

Tablo 4.2. Bergey's teşhis anahtarında yer alan N_{1c} ve N_{5a}'ya benzer özellik gösteren cinsler

	Belirlenen Cinsler
<p>N_{1c}</p> <p>Belirlenen Özellikler</p> <p>Düzenli, spor oluşturmeyan, gram pozitif, basil şeklinde, mezofilik, zorunlu aerob</p>	<p>Genus: <i>Caryophanon</i>*</p> <p>Genus: <i>Kurthia</i>*</p>
<p>N_{5a}</p> <p>Belirlenen Özellikler</p> <p>Düzensiz, spor oluşturmeyan, gram pozitif, kokobasil şeklinde, mezofilik, zorunlu aerob</p>	<p>Genus: <i>Aeromicrobium</i></p> <p>Genus: <i>Arthrobacter</i></p> <p>Genus: <i>Aureobacterium</i></p> <p>Genus: <i>Brachybacterium</i></p> <p>Genus: <i>Brevibacterium</i>*</p> <p>Genus: <i>Caseobacter</i>*</p> <p>Genus: <i>Curtobacterium</i>*</p> <p>Genus: <i>Microbacterium</i></p> <p>Genus: <i>Pimelobacter</i></p> <p>Genus: <i>Terrabacter</i></p>

(*zorunlu aerobik özellik gösteren cinsler)

BÖLÜM 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, endüstride yaygın kullanımı olan ve çevre sağlığını tehdit eden bakır metalinin biyogiderimi araştırılmış, endüstriyel tesislerin arıtım ünitelerinde kullanılmak üzere bakıra dirençli yeni mikroorganizmalar izole edilmiştir. Metal kirliliği yüksek bölgelerden alınan toprak örneklerinden mikroorganizma izolasyonu yapılmış ve dirençli olduğu düşünülen izolatlar elde edilmiştir. Yapılan deneylerde toprak örneklerinden izole edilen karışık ve saf kültürlerin bakır(II) giderimi incelenmiştir. Yüksek bakır giderimi gösteren iki saf kültür (N_{1c} ve N_{5a}) üzerinde yedi farklı Cu^{+2} konsantrasyonu (0mg/L, 10mg/L, 20mg/L, 40mg/L, 70mg/L, 100mg/L, 150mg/L) ile üç farklı pH (pH 5.0, pH 6,8, pH 8.0) ve üç farklı sıcaklık (25 °C, 30 °C, 37 °C) değerinin etkisine bakılmıştır.

Literatür incelendiğinde Sannasi ve arkadaşları (2004) tarafından yapılan çalışmada metal işleme aktiviteleri ile ilgili bölgelerden toplanan karışık kültürlerin bakır(II) iyonunun gideriminde etkin özellik gösterdiği saptanmıştır. pH 6-8 aralığında canlı hücrelerin ölü hücrelerden daha fazla Cu (II) tutma kapasitesine sahip olduğu görülmüştür. [49]. Benzer şekilde yapılan bu çalışmada metal fabrikalarının bulunduğu bölgelerden alınan toprak numunelerinden izole edilen karışık ve saf kültürlerin bakır(II) iyonlarını giderim kapasitesi incelenmiştir ve elde edilen izolatların bakır(II) gideriminde etkin özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda bakır giderim deneyleri canlı hücrelerle yapılmış ve 20 ppm bakır varlığında N_{1c} ve N_{5a} 'nın bakır giderim kapasitesi sırasıyla % 35 ve % 50 olarak ölçülmüştür. Bakır konsantrasyonu 70 ppm'e yükseltildiğinde ise % giderim verimi %10'a düşmüştür.

Çalışmamızda yüksek bakır(II) iyonu giderimi gösterdiği belirlenen N_{1c} ve N_{5a} izolatlarının bakır(II) iyonu giderimi üzerinde farklı Cu (II) konsantrasyonlarının belirgin bir etkisi olduğu görülmüştür. Özellikle yüksek Cu (II) konsantrasyonlarında

(100mg/L ve 150 mg/L) N_{1c} ve N_{5a} izolatlarının bakır(II) giderimi yapmadığı ve yüksek bakır(II) konsantrasyonlarının N_{1c} ve N_{5a} üzerinde toksik etki göstermesinin mümkün olabileceği tespit edilmiştir. Yüksek bakır konsantrasyonunun toksik etkisi Tsekova ve Galabova (2003) tarafından yapılan çalışmada da rapor edilmiştir.

Farklı bakır(II) konsantrasyonlarında üreme eğrileri incelendiğinde N_{1c}'nin 20 mg/L, N_{5a}'nın da 40 mg/L Cu⁺² iyonu içeren besiyerinde iyi üreme gösterdiği görülmüştür. Sonuçlar N_{1c} ve N_{5a}'nın hızlı üremesi için bakır(II) elementinin gerekli olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca bakır(II) içeren sentetik atık suda LB besiyerinde bulunan maya özütü ve pepton gibi karbon ve nitrojen kaynağı açısından zengin bileşenlerin bulunmaması nedeniyle mikroorganizmalar sağlıklı üreme gösterememişlerdir.

Yüksek bakır giderimi gösteren N_{1c} ve N_{5a} izolatları üzerinde pH'nin etkisi incelendiğinde N_{1c} ve N_{5a}'nın pH'sı 6.8 olan besiyerinde en iyi Cu⁺² giderimi gerçekleştirdiği görülmüştür. pH'sı 5.0 olan besiyerinde ise her iki izolatında iyi bakır(II) giderimi gerçekleştirilemediği görülmüştür. Ayrıca pH'nin N_{1c} ve N_{5a} izolatlarının üremeleri üzerindeki etkisi incelendiğinde her iki izolatın pH 6.8 değerinde en yüksek üreme hızına ulaştığı, pH 5.0 değerinde ise iyi üreme gösteremedikleri tespit edilmiştir.

Yüksek bakır giderimi gösteren N_{1c} ve N_{5a} izolatları üzerinde sıcaklığın etkisi incelendiğinde N_{1c} ve N_{5a}'nın 30 °C 'de en yüksek Cu⁺² giderimi gerçekleştirdiği, 25 °C'de ise iyi bakır(II) giderimi gerçekleştirilemedikleri görülmüştür. N_{1c} ve N_{5a}'nın üremesi üzerinde sıcaklığın etkisi incelendiğinde her iki izolatında 30 °C'de optimum üreme gösterdiği tespit edilmiştir. Anand ve arkadaşları (2005) ise Cu(II) iyonunun *Trichoderma viride* ile giderimi sırasında biyoakümülyasyon mekanizmasını incelemişler ve Cu(II) iyonu gideriminin sıcaklık ve pH a bağımlı olduğunu saptamışlardır. Çalışmamızda yüksek Cu(II) iyonu giderimi yapan izolatlar üzerinde üç farklı sıcaklık ve pH değerinin etkisi incelenmiş ve bulgularımıza göre Cu(II) gideriminde sıcaklık ve pH'nin belirgin bir etkisi olduğu görülmüştür. Literatürde

yapılan çalışmanın sonuçları ile bizim bulgularımızın benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Elde edilen izolatların koloni morfolojisini tespit etmek amacıyla seyreltme yöntemi ile yayma ekim işlemi uygulandıktan sonra yaklaşık 48 saat inkübasyonun ardından petrielerde koloni oluşumları gözlenmiştir. Petrielerde gözlenen koloniler morfolojik olarak değerlendirilmiş ve kolonilerin birbirlerinden farklı özellikler gösterdiği tespit edilmiştir.

Yüksek bakır giderimi gösteren N_{1c} ve N_{5a} izolatlarının tanımlanması amacıyla her iki izolat gram boyama yöntemi ile boyanmış ve gram pozitif özellikte oldukları belirlenmiştir. Ayrıca N_{1c} ve N_{5a}'nın spor oluşturup oluşturmadığını belirlemek amacıyla sporlanma deneyi yapılmış ve her iki izolatında spor oluşturmadıkları tespit edilmiştir.

Bu çalışmada yüksek bakır giderimi gösteren N_{1c} ve N_{5a} izolatlarının mezofilik, zorunlu aerob, spor oluşturmayan, gram pozitif özellikte oldukları belirlenmiştir. N_{1c} ve N_{5a}'nın taksonomik cinslerinin tayin edilmesi için izolatların belirlenen özellikleri ve koloni morfolojileri Bergey's teşhis anahtarındaki (Bergey's Manuel of Determinative Bacteriology (1994)) farklı mikroorganizma cinslerinin özellikleri ile karşılaştırılmış, N_{1c} nin benzer özellikler gösterdiği cinsler, genus *Caryophanon* ile genus *Kurthia*, N_{5a} nın benzer özellik gösterdiği cinsler ise, genus *Brevibacterium*, genus *Caseobacter* ve genus *Curtobacterium* olarak belirlenmiştir.

Ağır metallerin biyolojik süreçlerle giderimi diğer yöntemlere göre daha etkili, ekonomik ve pratik olması nedeniyle daha çok tercih edilmektedir. Günümüzde gelişen teknolojiye paralel olarak canlı mikroorganizma hücreleri kullanılarak ağır metallerin uzaklaştırılmasına yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Literatürde *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluveromyces marxianus*, *Schizosaccharomyces pombe* ve *Candida* sp, gibi mikroorganizma hücreleri bakır(II) iyonlarının giderimi için kullanılmış ve önemli ölçüde verim edildiği görülmüştür. Ancak literatürde bulunan mikroorganizmaların izolasyonu ve tanımlanması ile ilgili çalışmaların yeterli

olmadığı görülmektedir. Bu tez çalışmasında elde edilen izolatlar bakır giderimi yapan mikroorganizmaların çeşitliliğini artıracak böylece farklı bölgelerden izole edilmiş değişik mikroorganizmaların giderim verimlerinin kıyaslanmasına imkan sağlayacaktır. Elde edilen bu izolatlar endüstriyel kuruluşlarının atıksularına atılarak endüstriyel atıklardaki bakır miktarının azaltılması için kullanılabilir. Böylece bakırın yarattığı çevre problemleri azaltılabilir. Bakır gideriminde etkin özellik gösteren izolatların endüstriyel uygulamalarda kullanılabilmesine yönelik araştırmalar yapılabilir.

Yapılan tanımlama çalışmaları sonucunda yüksek bakır giderimi gösteren iki izolatın özellikleri Bergey's teşhis anahtarında (Bergey's Manuel of Determinative Bacteriology (1994)) yer alan taksonomik cinslerin özellikleri ile kıyaslanarak, her iki izolatında ait olabileceği cins grupları tespit edilmiştir. Ancak bu izolatların ait oldukları cins ve tür gruplarının yapılacak olan ileri karakterizasyon çalışmaları (16SrRNA dizi analizi) sonucunda kesin olarak tespit edilmesi mümkün olacaktır. Bu konu ile ilgili araştırmalarımız devam etmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] SAĞLAM, N., CİHANGİR, N., Ağır Metallerin Biyolojik Süreçlerle Biyosorpsiyonu Çalışmaları, Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi, 11:157-161, 1995
- [2] İLERİ, R., ÇAKIR, G., Bakır İyonlarının (Cu^{+2}) Sıvı Ortamdan Biyosorpsiyonla Gideriminin İzoterm Sabitlerinin Matlab Programı İle Belirlenmesi, Ekoloji Dergisi, 59:8-17, 2006
- [3] ÇABUK, A., AKAR, T., KOTLUK, Z., ŞAŞMAZ, S., *Saccharomyces cerevisiae* Hücreleri İle Ağır Metal Giderimi Ve Metal Toleransı, Ortaokul On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, [www.mikrobiyoloji.org / pdf /702070301.pdf](http://www.mikrobiyoloji.org/pdf/702070301.pdf), Şubat 2009
- [4] ASLAN, S., BOZKURT, Z., TEKELİ, A.N., Removal of Cu (II), Ni (II), Cd (II) and Cr (VI) ions from aqueous solutions by biosorption processes, Journal of Engineering and Natural Sciences 25 (2): 209-222, 2007
- [5] YILMAZER, P., Sulu Ortamlardan Ağır Metallerin Mikroorganizmalar Yoluyla Giderimi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, SF. 2-7, 2006
- [6] ÇABUK, A., Sıkıştırılmış Yatak Biyoreaktörde İmmobilize Bakteriyel Biyokütle Kullanılarak Atık Sulardan Ağır Metal Giderimi, Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, SF. 3-28, 2001
- [7] www.genetikbilimi.com/araştırma/haberler18.html, Şubat 2009
- [8] Kahvecioğlu, Ö., KARTAL, G., GÜVEN, A., TİMUR, S., Metallerin Çevresel Etkileri-I, www.metalurji.org.tr/dergi/dergi136/d136_4753.pdf, Mart 2009
- [9] GÖKAĞAÇLI, N, G., *Microcystis sp.* İle Demir, Bakır ve Çinko Metallerinin Giderimi, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, SF. 1-17, 2007
- [10] www.teknolojikarastirmalar.com/e-egitim/peryodik/images/resimler/Cu.JPG, Şubat 2009

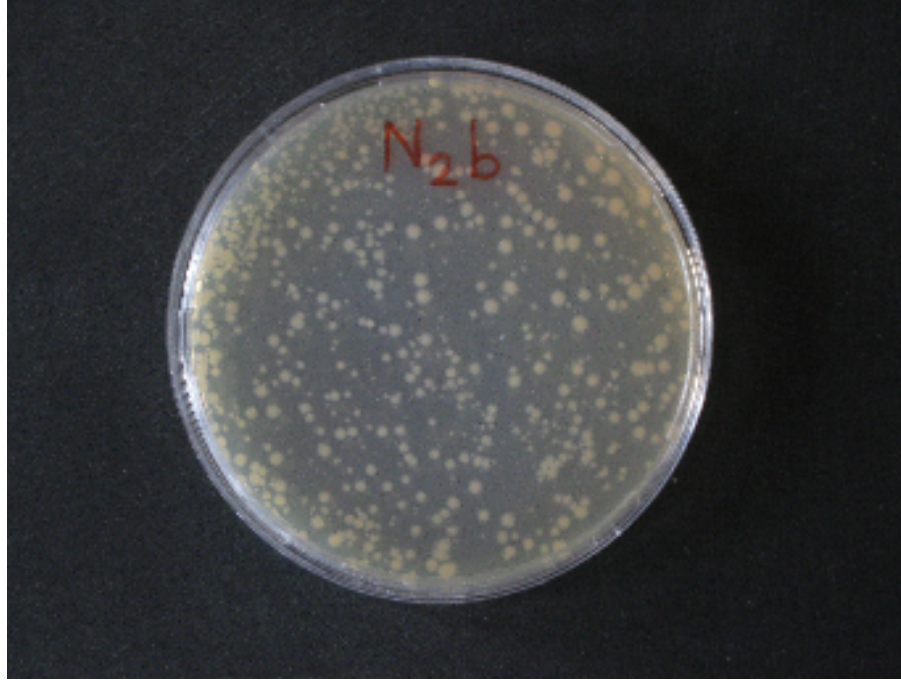
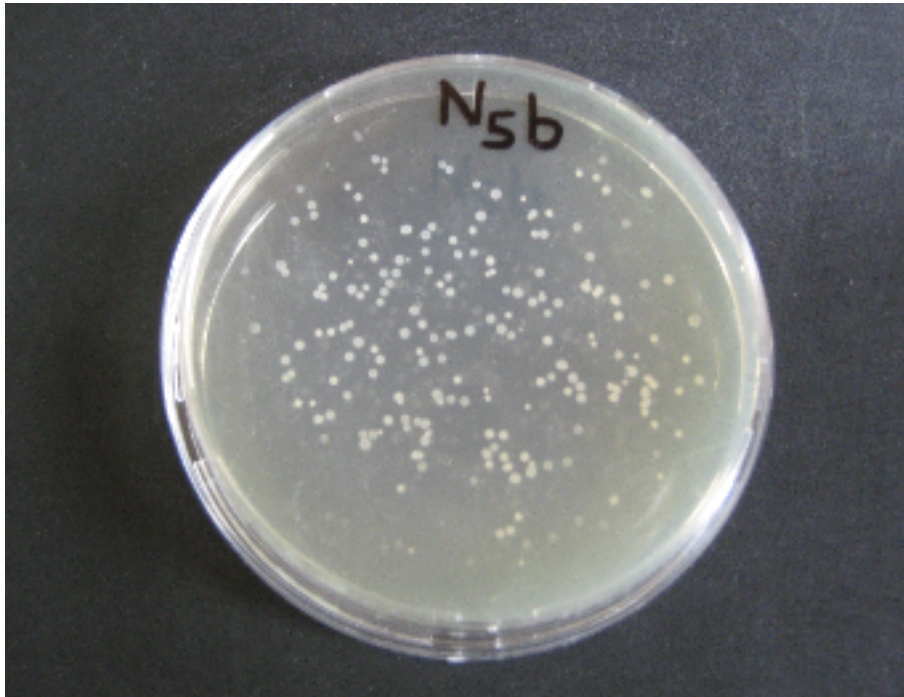
- [11] KARTAL, G., GÜVEN, A., KAHVECİOĞLU, Ö., TİMUR, S., Metallerin Çevresel Etkileri-II, www.metalurji.org.tr/dergi/dergi137/d137_4651.pdf, Mart 2009
- [12] www.ansiklopedi.turkcebilgi.com/Bakir, Şubat 2009
- [13] www.kimyaevi.org/elementler/bakir/alan.asp, Mart 2009
- [14] BAYINDIR, Ü., *Zooglea ramigera*'nın Ağır Metali Toplama Kapasitesinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, SF. 1-32, 2003
- [15] www.cevreonline.com/cevreKR/toprak_kirlilik.htm, Mart 2009
- [16] www.forumps.com/kimya/3159-toprakkirliliginin-cevresel-etkileri-ve-agir-metaller.html, Şubat 2009
- [17] BOYSAN, F., Poliüre-Poliamin Reçinesi Kullanılarak Atıksulardaki Ağır Metal Kirliliğinin Adsorpsiyonla Gideriminin İncelenmesi, Doktora Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, SF. 5-12, 2008
- [18] GAVRİLESCU, M., Removal of heavy metals from environment by biosorption, Eng. Life Sci., 3: 219-232, 2004
- [19] NORTON, L., BASKARAN, K., MCKENZIE, T., Biosorption of zinc from aqueous solutions using biosolids, Advances in Environmental Research, 8: 629-635, 2004
- [20] 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
- [21] SCRAGG, A. H., Bioreactors in biotechnology, Ellis Horwood Limited, West Sussex, England, 45-53, 1991
- [22] GADD, G.M., Accumulation of metal by microorganisms and algae. In: REHM, H., editor. Biotechnology: a complete treatise, vol. 6B, special microbial processes vol. 4 Veelagsgesellschaft, Weinheim: VCH; 401-430, 1988
- [23] İLHAN, S., NOURBAKHS, M. N., KILIÇARSLAN, S., ÖZDAĞ, H., Removal of chromium, lead and copper ions from industrial waste waters by *Staphylococcus saprophyticus*, Turkish Electronic Journal Biotechnology, 2 : 50-57, 2004
- [24] DURSUN, A.Y., USLU, G., CUCİ, Y., AKSU, Z., Bioaccumulation of Cu (II), Pb(II) and Cr(VI) by growing *Aspergillus niger*, Process Biochemistry, 38:1647-1651, 2003

- [25] DÖNMEZ, G., AKSU, Z., Bioaccumulation of copper (II) and nickel (II) by the nonadapted and adapted growing *Candida* spp, *Water Res.* 35(6): 1425-1434, 2001
- [26] COSSÍCH, 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
- [27] KRATOCHVÍL, D., VOLESKY, B., Advantages in biosorption of heavy metals, *Tib tech*, 16:291-300, 1998
- [28] BAİK, W.Y., BAE, J.H., CHO, K.M, HARTMEIER, W., Biosorption of heavy metals using whole mold mycelia and parts thereof, *Bioresource Technology*, 81:167-170, 2002
- [29] BEVERIDGE, T. J., The role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization, *Annual Review of Microbiol.*, 43:147–171, 1989
- [30] NUZHAT, A., UZMA, B., RALHAN, S., Industrial and environmental biotechnology, In: NUZHAT, A., QURESHI, F.M., KHAN, O., KHAN, Y., editors, *Whymondham, UK: Horizon Scientific Press*, 81-102, 2001
- [31] MAIER, R.M., PEPPER, I.L., GERBA, C.P., *Environmental Microbiology*, Academic press, pp. 403-423, United States of America, 2000
- [32] web.deu.edu.tr/erdin/tr/ders/kati_atik/ders_not/kompost.pdf, Nisan 2009
- [33] yunus.hacettepe.edu.tr/~emreca/tez/adsorpsiyon.htm, Mart 2009
- [34] YALÇUK, A., Sürekli Karıştırmalı Reaktörlerde *Rhizopus arrhizus* İle Çoklu Metal Karışımlarında Yarışmalı Biyosorpsiyonun İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, SF.167, 1999
- [35] TSEZOS, M., VOLESKY, B., Biosorption of uranium and thorium, *Biotech. and Bioeng.* 23:583-604, 1981
- [36] AKSU, Z., KUTSAL, T., A comparative study for biosorption characteristics of heavy metal ions with *Chlorella vulgaris*, *Environmental Technology*, 11: 979-987, 1990
- [37] İLHAN, S., ÇABUK, A., FİLİK, C., ÇALIŞKAN, F., Effect of pretreatment on biosorption of heavy metals by fungal biomass, *Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 5(1):11-17, 2004
- [38] ÖZVARDARLI, A., Çevre Biyoteknolojisi Uygulamalarında Biyosorpsiyonun Yeri, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, SF. 4-12, 2006

- [39] BAHADIR, T., Endüstriyel Atıksulardan Biyosorpsiyonla Kurşun Gideriminin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, On Dokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, SF. 25-37, 2005
- [40] ÇUBUKÇU, H.E., Krom (VI), Bakır (II), Demir (II) İyonlarının Tek ve Çok Bileşenli Metal Sistemlerinde *R.arrhizus*'la Biyosorpsiyonunun Sürekli Karıştırmalı Kaplarda İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, SF.95, 1998
- [41] UCUN, H., Sarı Çam (*Pinus sylvestris*) Kozalağı Biyoması Kullanılarak Atıksulardaki Ağır Metallerin Biyosorpsiyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, SF.54, 2001
- [42] MATHEICKAL, J. T., YU, Q., Biosorption of lead (II) from aqueous solutions by *Phellinus badius*. Miner. Eng, 10(9): 947-957, 1997
- [43] RHO, J., KIM, J., Heavy metal biosorption and its significance to metal tolerance of streptomycetes, The Journal of Microbiology, 40:51-54, 2002
- [44] HARTLEY, E., CAIRNEY, J. W. G., MEHARG, A. A., Do ectomycorrhizal fungi exhibit adaptive tolerance to potentially toxic metals in the environment?, Plant and Soil, 189:303-319, 1997
- [45] TAM, P.C.F., Heavy metal tolerance by ectomycorrhizal fungi and metal amelioration by *Pisolithus tinctorius*, Mycorrhiza, 5:181-187, 1995
- [46] VODNÍK, D., BYRNE, A.R., GOGALA, N., The uptake and transport of lead in some ectomycorrhizal fungi in culture. Mycol. Res, 102: 953-958, 1998
- [47] CHANG, J.S., LAW, R., CHANG, C.C., Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomans aeruginosa* PU21, Wat. Res, 31:1651-1658, 1997
- [48] TSEKOVA, K., PETROV, G., Phosphatase production and activity in copper (II) accumulating *Rhizopus delemar*, Enzyme and Microbial Technology, Volume 33, Issue 7, 926-931, 2003
- [49] SANNASÍ, P., KADER, J., ISMAIL, B.S., SALMIJAH, S., Sorption of Cr(VI), Cu(II) and Pb(II) by growing and non-growing cells of a bacterial consortium, Bioresource Technology, 97(5):740-747, 2006
- [50] ANAND, P., ISAR, J., SARAN, S., SAXENA, R.K., Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*, Bioresource Technology, 97:1018-1025, 2006
- [51] AKAR, T., TUNALI, S., Biosorption characteristics of *Aspergillus flavus* biomass for removal of Pb(II) and Cu (II) ions from an aqueous solution, Bioresource Technology, Volume 97, Issue 15, 1780-1787, 2006

- [52] 64.233.183.104/search?q=cache:fk VKc-60dqdJ:www.canerler.com /AAS NAZIM.PPT+Atomik+absorbsiyon+spektrofotometresi, Nisan 2009
- [53] e-kutuphane.cmo.org.tr/pdf/1072.pdf , Mart 2009
- [54] HOLT, J. G., KRIEG, N.R., SNEATH, p.H.A., STALEY, J.T., WILLIAMS, S.T., Bergey's Manuel of Determinative Bacteriology, SansTeche pres 9., HENSYL, W.R., Williams & Wilkins, pp. 565-582, United States of America, 1994
- [55] ÖRGEV, C., Çevre Mikrobiyolojisi, Değişim Yayınları, sf. 21-34, İstanbul, 2003
- [56] ÖNER, M., Genel Mikrobiyoloji, Ege Üniversitesi Kitaplar Serisi No:94, sf. 20-56, İzmir, 2006
- [57] www.nadidem.net/k/grmbym/index.htm, Şubat 2009
- [58] 74.125.77.132/search?q=cache:TWSK1dXt3iAJ:www.cem.yildiz.edu.tr/5-belgeler/ders_notlari/0412021- CM1/cm1_ders_notu_2008.12.17.doc+ Mikrobiyolojinin+konusu&cd=1tr&ct=clnk&gl=tr, Mart 2009
- [59] ÖZCENGİZ, G., ALAEDDİNOĞLU, N.G., Bacilysin production and sporulation in *Bacillus subtilis* Current Microbiology, 23:61-64, 1991

EKLER

EK A. ResimlerEK A1. N₂ b izolatna ait kolonilerEK A2. N₅ b izolatna ait koloniler

ÖZGEÇMİŞ

Elif Ölmezoğlu, 28.09.1986 tarihinde İzmit'te doğdu. İlk, orta okul ve lise öğrenimimi İzmit'te tamamladı. 2003 yılında İzmit Atılım Lisesinden mezun oldu. 2007 yılında Çanakkale On Sekiz Mart Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü bitirdi. Aynı sene Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Enstitü Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2008 yılında İzmit Başöğretmen Lisesi'nde ücretli Biyoloji öğretmeni olarak görev yaptı.