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

METALE TOLERANSLI YEREL BAKTERİYEL İZOLATLARIN KARAKTERİZASYONU ve BİYOGİDERİM KAPASİTELERİNİN İNCELENMESİ

BİNNUR KIRATLI HERAND
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

GEBZE
2013

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

METALE TOLERANSLI YEREL BAKTERİYEL İZOLATLARIN KARAKTERİZASYONU ve BİYOGİDERİM KAPASİTELERİNİN İNCELENMESİ

BİNNUR KIRATLI HERAND

YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
DOÇ. DR. MELEK ÖZKAN

GEBZE
2013

GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ	**YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU**

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 10/10/2013 tarih ve 2013/55 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 01/11/2013 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Binnur Kıratlı Herand'ın tez çalışması Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE
(TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr. Melek ÖZKAN

ÜYE : Doç. Dr. Mehmet Salim ÖNCEL

ÜYE : Doç. Dr. Ali TÜRKAN

ONAY

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

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Çevre kirliliği açısından büyük problem oluşturan ağır metalleri çevreden kalıcı olarak uzaklaştırmak oldukça zordur. Ağır metallerin giderimi amacıyla son zamanlarda daha ekonomik olması ve çevreye zararsız olması nedeniyle biyoteknolojik yöntemlere de başvurulmaktadır.

Bu tez çalışmasında Kocaeli Darıca ilçesinde endüstriyel kirlilik gösteren bölgeden izole edilmiş altı adet bakteri izolatı farklı yöntemler kullanılarak karakterize edilmiştir. Bakteri izolatlarının metal işletmesi atıksularında bulunabilecek beş farklı metali (Bakır, Krom, Demir, Nikel ve Çinko) giderme kapasiteleri sentetik atıksu kullanılarak kesikli ve sürekli sistemde belirlenmiştir. Hücreler giderim veriminin artırılması açısından polimere tutuklanmışlardır. N1a, N1c, N3a N4c, N5a, N5b olarak kodlanan altı izolat arasında kesikli sistemde en yüksek giderimi gösteren suş N4c olarak belirlenmiştir.

N4c izolatı sürekli sistemde polimere immobilize edilmiş ve immobilize olmuş hücrelerin karışık metal içeren sentetik atıksudaki metalleri giderme kapasitesi iki farklı akış hızında çalışılmıştır.

N4c ile Cu^{2+} giderimi yaklaşık altı gün süresince yüksek verimde (%90 verimle) gerçekleşmiştir. İzolatların atık çamur ortamında gerçekleştirdikleri giderim metal fabrikasından alınan atıkçamur ve bir tesisten alınan evsel atıksu çamuru kullanılarak yapılmıştır. Çamur kullanıldığında metallerin büyük bir kısmının çamur taneciklerine yapıştığı için ortamdan uzaklaştığı görülmüştür. İzolatların tanımlanması için 16SrRNA gen dizileri tespit edilmiş ve gen bankasındaki diğer mikroorganizmalarla kıyaslanmıştır. Diğer test sonuçları da (koloni morfolojisi, oksidaz testi, gram boyama gibi) dizi sonuçlarını destekler niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: Ağır metaller, biyogiderim, hücre immobilizasyonu.

SUMMARY

Nowadays heavy metals are major problem. Permanent removal of metals, which create major health problems for the human beings and other living organisms, from environment is very difficult. Biotechnical methods are resorted for the removal of heavy metals because these methods are more economical and environmentally friendly as compared to physical and chemical methods.

In this study, six bacterial strains isolated from industrially polluted region of Darıca district of Kocaeli were characterized by using different characterization techniques. The ability of bacterial isolates for removing five different metals (copper, cromium, iron, nickel and zinc), which can be found in the wastewater of metal plating industries, was determined in batch and continuous system by using synthetic wastewater.

The cells were immobilized on polymeric matrix in batch system. Among the six bacterial isolates coded as N1a, N1c, N3a N4c, N5a, N5b, the isolate N4c was determined to be the most efficient strain for metal bioremoval in batch system. Bioremoval of Cu^{2+} reached above 90% and system could work for 6 days. Bioremoval efficiency of the isolates were studied by using the sludge from metal plating industry and also domestic waste water. When sludge was used, most of the soluble metals were adsorbed on the surface of particules in the sludge. The bacterial isolates were identified by determining their 16SrRNA gene sequences and comparing the sequences with those of other batcteria in gene bank. The cellshape, oxidase test, Gram reaction also supported this result.

Key words: Heavy metals, biyoremoval, cell immobilization.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim sürecince çalışmalarımın her safhasında engin bilgi, deneyim ve yardımlarını hiçbir zaman benden esirgemeyen saygı değer tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Melek ÖZKAN'a bana sağlamış olduğu imkanlardan ve özellikle de manevi desteğinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında deneyimlerine ve bilgi birikimine başvurduğum, Sayın Doç. Dr. Salim ÖNCEL'e desteğinden ve özellikle ICP cihazı ile yapılan ölçümlerdeki yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman bana destek olan ve bilgi paylaşımında bulunduğum sevgili arkadaşım Arş. Gör. Pınar KARAGÖZ'e, Gaye ÖZDEMİR'e, Eren TURAN'a, Faruk CAN'a teşekkür ederim.

Tüm sıkıntılı anlarımda maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen sevgili eşim Deniz HERAND'a, annem Sabahat KIRATLI'ya babam Mustafa KIRATLI'ya ve çalışmalarıma yön veren değerli ablam Nursel KIRATLI YILMAZÇOBAN'a ve diğer tüm yakınlarıma sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLOLAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM	3
3.1. Mikroorganizmaları Tanımlama Çalışmaları	9
3.1.1. İzolatların 16SrRNA Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması	9
3.1.2. Gram Boyama	9
3.1.3. Oksidaz Testi ve RAPID Kiti ile Biyokimyasal Karakterizasyon	10
3.2. Mikroorganizmaların Metal Giderim Kapasitelerinin İncelenmesi	10
3.2.1. Kesikli Sistemde Giderim	10
3.2.2. Sürekli Sistemde Giderim	12
3.3. Üreme Eğrisi ve Canlı Hücre Sayısının Belirlenmesi	13
3.4. ICP ile Metal Analizi	13
4. BULGULAR	14
4.1. Karakterizasyon Çalışmaları	14
4.1.1. 16SrRNA Dizilerinin Belirlenmesi	14
4.1.2. Gram Boyama	14
4.1.3. Koloni Morfolojisi	17
4.1.4. RAPID Test Sonuçları	18
4.2. İzolatların Metal Giderim Kapasiteleri	20
4.2.1. Metal Dirençliliği	20
4.2.2. Tutuklanmış hücrelerle Metal Giderimi	26

Sayfa

4.2.3. Atık Çamurda Giderim 33

4.2.4. N1c N5a ve N4c izolatlarının Metal Dirençliliklerinin *E.coli* ile kıyaslanması 36

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 42

KAYNAKLAR 44

ÖZGEÇMİŞ 48

EKLER 49

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Kısaltmalar	Açıklamalar
^{o}C	: Santigrat derece
Cr^{3+}	: Krom iyonu
CFU	: Colony Forming Units (Koloni oluşturabilen hücre)
Cu^{2+}	: Bakır iyonu
Fe^{2+}	: Demir(II) iyonu (Ferrous)
Fe^{3+}	: Demir(III) iyonu (Ferrik)
LA	: Luria Agar besiyeri
LB	: Luria Broth besiyeri
mg/L	: Miligram/Litre
Ni^{2+}	: Nikel iyonu
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
Rpm	: Devir/Dakika, dakikadaki devir sayısı
sp.	: Tür
SWW	: Sentetik waste water (Sentetik atıksu)
Zn^{2+}	: Çinko iyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:		Sayfa
4.1:	İzolatların 16SrRNA genlerinin PCR ile çoğaltılması sonucunda elde edilen bantlar.	14
4.2:	İzolatların Gram boyama sonucundaki görüntüleri.	16
4.3:	İzolatların koloni morfolojileri.	17
4.4:	İzolatların Bakır dirençleri.	20
4.5:	İzolatların Nikel dirençleri.	21
4.6:	İzolatların Krom dirençleri.	22
4.7:	İzolatların Demir dirençleri.	23
4.8:	İzolatların Çinko dirençleri.	24
4.9:	Farklı metal konsantrasyonlarının N4c'nin üremesine etkisi.	25
4.10:	Sürekli sistemde farklı akış hızlarında zamana bağlı biyogiderim verimi: a) 0,5ml/dk, b) 1 ml/dk, c) 2ml/dk.	29
4.11:	N4c ile sürekli sistemde bakır giderimi (1 ml/dk akış hızı).	32
4.12:	N4c ile sürekli sistemde nikel giderimi (1 ml/dk akış hızı).	32
4.13:	Evsel çamurda bakterilerin üremeleri.	33
4.14:	Metal fabrikası çamurunda bakterilerin üremeleri.	33
4.15:	N4c ve *E. coli*'nin metal dirençliliği.	36
4.16:	Farklı Bakır konsantrasyonlarında N1c, N5a ve *E. coli*'nin canlılık ve dirençlerinin kıyaslanması..	38
4.17:	N1c, N5a ve *E. coli*'nin farklı bakır konsantrasyonlarındaki giderim verimleri.	41
4.18:	N1c, N5a ve *E.coli*'nin farklı bakır konsantrasyonlarında hücre başına düşen giderim verimleri.	41

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No:		Sayfa
2.1:	Metal kaplama atıksularının bazı kimyasal parametre değerleri.	6
3.1:	Sentetik Atıksu Bileşimi.	11
3.2:	Luria Broth Besiyeri Bileşimi.	13
4.1:	İzolatların karakterizasyonu.	15
4.2:	RAPID ONE test sonuçları.	18
4.3:	RAPID NF PLUS test sonuçları.	19
4.4:	50 mg/L farklı metal içeren (toplam 50 mg/L) sentetik atıksuda immobilize edilmiş izolatların giderim verimi.	27
4.5:	50 mg/L karışık metal içeren (toplam metal konsantrasyonu 250 mg/L) sentetik atıksuda immobilize edilmiş izolatların giderim verimi.	27
4.6:	Sentetik atık suda ICP ile belirlenen metal iyonu konsantrasyonları.	31
4.7:	Solübilize edilmiş metal kaplama endüstrisi atığında izolatların metal giderimi.	34
4.8:	N4c aşı miktarının ve sıcaklığın atık çamurda bakır giderim verimine etkisi.	36
4.9:	N1c ve N5a izolatlarının bakıra dirençlerinin *E. coli* ile kıyaslanması.	40

1. GİRİŞ

Dünyada giderek artan nüfusla birlikte gelişen teknoloji ve hızlı sanayileşme sağladığı rahatlık ile birlikte çevre kirliliği problemini de beraberinde getirmektedir. Hızlı nüfus artışıyla birlikte artan yerleşim alanları ve sanayi tesislerinden kaynaklanan katı, sıvı ve gaz formundaki atıklar, doğanın dengesini bozmakta ve canlılığı tehdit etmektedir [Arceivala, 1976].

Söz konusu sanayi kuruluşları, süreçleri gereği çeşitli ağır metalleri kullanmakta ve atıklarında yüksek konsantrasyonlarda civa, çinko, kobalt, bakır, demir, kurşun, krom, arsenik ve gümüş gibi ağır metal iyonlarını içermektedirler [Ağcasulu, 2007]. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde kağıt endüstrisi, metal kaplama fabrikalarında, pestisitlerde, gübre endüstrisinde, tabakhanelerde oluşan ağır metaller direk veya indirek olarak çevre kirliliğine yol açmaktadır. Ağır metaller yaşayan organizmalarda birikime sebep olmaktadır ve bunların toksik ve karsinojenik etkileri vardır [Fenglian ve Wang, 2010].

Ağır metaller çevrede pestisit veya petrol ürünleri gibi organik kirleticilere oranla daha kalıcı zararlara sebep olmaktadırlar. Ağır metaller; yeraltı sularında gerçekleşen doğal proseslerle veya topraktaki pH değişimleri ile yer kabuğunda meydana gelmektedirler. Yeraltı sularındaki kirliliğe genellikle maden atıklarından, çöp atıklarından gelen, endüstriyel atıklardan ve lagünlerden gelen sızıntı suları sebep olmaktadır [Hashim et al., 2011].

Doğanın sınırlı ve yavaş bir yenileme kapasitesine sahip olmasından dolayı çevre sorunlarının çözümüne yönelik teknolojilerin geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir. Bu teknolojilerden biri olan çevre biyoteknolojisi, canlı organizmaların ve onlardan elde edilen ürünlerin, zararlı atıkların arıtımında ve çevre kirliliğinin önlenmesinde kullanılmasını kapsamaktadır. Fiziksel veya kimyasal prosesler yüksek miktarlarda metal içeren atıkların arıtılması için elverişli ve ekonomik sayılabilir ancak düşük konsantrasyonlarda metal içeren büyük hacimlerdeki atıksuların arıtımında biyolojik yöntemlerin daha ekonomik olduğu rapor edilmektedir [Wang and Chen, 2009], [Volesky, 2001]. Çevre biyoteknolojisi, sanayi atıklarından ağır metalleri uzaklaştırmak için mevcut konvansiyonel fiziksel ve kimyasal yöntemler yanında doğal bir alternatif sunmaktadır [Chen and Gu, 2005].

Bu çalışmada Kocaeli ili Darıca ilçesinde endüstriyel kirlilik gösteren bölgelerden altı adet bakteri izolasyonu yapılmıştır. Bu izolatlar farklı yöntemler

kullanılarak karakterize edilmiştir. İzolatların koloni morfolojileri, oksidaz testi sonuçları, gram boyamaları ve mikroskobik görüntülerine bakılarak ön karakterizasyonları yapılmıştır. Tanımlanmaları için 16SrRNA gen dizileri belirlenmiştir. Bu diziler gen bankasındaki diğer mikroorganizmaların 16SrRNA dizileri ile kıyaslanarak bilinen mikroorganizmalara benzerlik oranları tespit edilmiştir. Bakteri izolatlarının metal işletmesi atıksularında bulunabilecek beş farklı metale (Demir, Bakır, Çinko, Nikel, Krom) olan toleransları ve bu metallerin farklı konsantrasyonlarını giderme verimleri incelenmiştir. Metal ölçümleri ICP-OES (Perkin Elmer Optima 7000) cihazında yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Toprak veya su kaynaklarına karışan bazı kirletici maddeler uzaklaştırılabildikleri veya biyolojik olarak parçalanabildikleri halde, ağır metallerin parçalanarak giderimleri söz konusu değildir. Alıcı ortamlara girmiş bulunan ağır metaller, yüksek oranlarda birikebilmeleri nedeniyle kimyasal ve biyolojik süreçleri olumsuz yönde etkilemektedirler, bu nedenle en tehlikeli kirletici grubu olarak nitelendirilirler. Ağır metallerin özellikle su ortamındaki besin zincirinde birikerek organizmadan organizmaya artan konsantrasyonlar halinde taşındığı bilinmektedir [Straub et al., 2001].

Bir metalin toksisitesi, makromolekül, metabolit ve hücre organelleriyle birlikte biyolojik sistemlerdeki dinamik yaşam proseslerine zarar verme kapasitesine dayanır. Ağır metaller, metabolik reaksiyonları yavaşlatarak canlı organizmalara toksik etki gösterir. Organizmaya ağız, solunum ve deri yoluyla alınıp birikirler [Ağcasulu, 2007]. Ağır metal içeren çözeltilerin toksik etkisi organizmanın türüne, üreme zamanına, su ortamının ısı, ışık, tuzluluk gibi fiziksel değişkenlerine ve metalin cinsine göre değişir. Ancak genel olarak metallerin hepsi, birden fazla organ ve sistemi etkilediği için tek bir biyokimyasal proses etkilenmemektedir [Förstner and Wlttmann, 1981]. Bu büyük tehlike insanlar tarafından fark edildiğinden beri ağır metal kirliliği oluşturan endüstri kuruluşlarından çıkan atıkların bertarafı ile ilgili çalışmalar önem kazanmıştır.

Bilim adamlarına göre; antropojenik kaynaklı olarak atmosferden diğer ekosistemlere dağılan arseniğin yıllık 22 bin ton, kadmiyumun yıllık 70 bin ton, kurşunun yıllık 400 bin ton, bakırın yıllık 56 bin ton, çinkonun ise yıllık 214 bin ton civarında olduğu ifade edilmektedir [Çepel, 1997].

Doğanın sınırlı ve yavaş bir yenilenme kapasitesine sahip olmasından dolayı çevre sorunlarının çözümüne yönelik teknolojilerin geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir. Bu teknolojilerden biri olan çevre biyoteknolojisi, canlı organizmaların ve onlardan elde edilen ürünlerin, zararlı atıkların arıtımında ve çevre kirliliğinin önlenmesinde kullanılmasını kapsamaktadır [Silva et al., 2008]. Çevre biyoteknolojisi, sanayi atıklarından ağır metalleri uzaklaştırmak için mevcut konvansiyonel fiziksel ve kimyasal yöntemler yanında doğal bir alternatif sunmaktadır. Son yıllarda biyoteknolojik uygulamalar atıksuların arıtılmasında ve

ağır metal gideriminde oldukça yaygın şekilde kullanılmaktadır [Hashim et al., 2011].

Ağır metallerin endüstriyel atık sulardan veya ağır metal ile kirlenmiş/kirletilmiş çevresel su kaynaklarından uzaklaştırılmasında çeşitli kimyasal ve fiziksel yöntemler kullanılmaktadır [Çabuk vd., 2007]. Yöntem seçiminde metalin türü, suda bulunma şekli ve derişimi gibi faktörler önem taşımaktadır [Yılmazer, 2006]. Kimyasal çöktürme, kimyasal oksidasyon, kimyasal indirgenme, elektro-kimyasal yöntemler, buharlaştırma yoluyla geri kazanım, filtrasyon, iyon değiştirme ve membran teknolojisi endüstriyel atık sulardan ağır metalleri uzaklaştırmak için kullanılan bazı metodlardır [Gavrilescu, 2004].

Biyoteknolojik yöntemlerin gelişmesi sayesinde bu geleneksel yöntemlere yeni alternatifler oluşturulmuştur. Biyosorpsiyon ve adsorpsiyon yöntemleri ağır metal gideriminde en çok kullanılan biyoteknolojik yöntemlerdir [Web 1]. Bu yöntemler, maliyetlerinin düşük olması ve kullanılacak materyal olanağının çok olması nedeniyle kullanılmaktadır. Hem canlı hem de ölü mikroorganizmalar metalleri tutma özelliğine sahiptirler [Beveridge et al., 1980]. Algler, mayalar, mantarlar ve bakteriler yüzeylerinde ağır metal adsorplayabilme yeteneği olan mikrobiyal türlerdir. Düşük pH'lar da biyoarıtım sağlayabilmek için en sık kullanılan biyokütle türleri arasında bakteriler bulunmaktadır. Canlı veya ölü birçok mikrobiyal hücre türü metallerin hem çözünen hem de katı hali için etkin birer biyoakümülatördürler. Metal toplayıcı biyoprosesler, ölü biyokütleler tarafından tutunma ile ya da yaşayan hücrelerin biyoakümülasyonu ile gerçekleşebilmektedir [Cossich et al., 2003], [Kratochvil et al., 1998].

Tüm mikroorganizmaların hücre yüzeyi, çeşitli anyonik yapılar nedeniyle negatif yükle yüklüdür ve bu durum sonucunda bakteriler metal katyon bağlama yeteneğine sahiplerdir. Çeşitli mikrobiyal türlerin atıklarda bulunan metal iyonlarının biyosorpsiyonunda oldukça verimli oldukları gözlemlenmiştir. Mantarlar, mayalar, yosunlar, algler ve bakteriler gibi pek çok mikrobiyal türün yüksek miktarlarda ağır metal biriktirebildikleri bilinmektedir. Ağır metal gideriminde kullanılan canlı ve ölü biyokütleler (mikroorganizma, bitki vs.) biyosorbent veya adsorbent terimi ile ifade edilirler. Bakterilerin yüzey/hacim oranlarının yüksek olması nedeniyle çok iyi biyosorbentler oldukları belirtilmiştir [Beveridge et al., 1989], [Nuzhat et al., 2001], [Maier et al., 2000].

Literatürde ağır metal iyonlarının adsorbsiyonunda mikroorganizmaların kullanılması ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır. İlk çalışmalar [Polikarbov, 1966] tarafından gerçekleştirilen radyoaktif elementlerin sulu ortamda mikroorganizmalar tarafından doğrudan adsorblanabildiğini göstermesi ile başlamıştır. Polikarpov, mikroorganizmaların bu özelliğinin yaşam fonsiyonlarından bağımsız olduğunu iddia etmiştir. [Zajic and Chiu, 1972], yaptıkları çalışmalarda, uranyum giderebilen bir fungal kültürü atıktan izole etmeyi başarmıştır. [Beveridge and Murray, 1980], *Bacillus subtilis*'in saf hücre duvarını yüksek atom numaralı elementleri adsorpladığını ve adsorplanan elementlerin geri kazanılabileceğini göstermiştir. [Tsezos and Volesky, 1981], uranyum ve toryum adsorpsiyonunda değişik türde mikroorganizmalar kullanılarak, farklı sıcaklık ve pH değerlerinde adsorpsiyon izotermleri çıkarmış, sonuçları aktif karbon ve iyon değiştirici reçineler ile yapılan adsorpsiyon çalışmalarıyla karşılaştırılmış ve mikroorganizmaların daha etkin adsoptif özelliklere sahip olduklarını kanıtlamışlardır.

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

Ağır metal adsorpsiyonunda canlı hücreler kullanılmasının sağladığı bazı yararlar vardır. Canlı hücreler kullanıldığında metal hücrelerin içinde toplandığından sabit bir konumdadır ve pH değişimine daha az duyarlıdır. Canlı hücre kullanımı kuvvetli bağlanmış kompleksler halindeki metallerin artımında özellikle tercih edilir. Metabolik aktivite, metalin değerliğini değiştirmede veya organik maddelerle kompleks oluşturmuş metalleri gidermede etkili olabilir [Tsezos and Volesky, 1981]. Canlı hücreler kullanılması halinde adsorbsiyonda etkili olan zinciri geliştirmek ya da metalin zehirli etkisini tolere edebilmek için genetik müdahale potansiyeli vardır.

Ağır metallerin toksik etkileri nedeniyle düşük metal konsantrasyonlarında çalışılmasının gerekmesi, hücrelerin üretilmesi için besin ortamı bileşenlerine gereksinim duyulması gibi problemler canlı hücrelerle çalışmanın dezavantajları arasında sayılabilir. Ayrıca tüketilmeyen besin ortamı bileşenleri de dış atımda yer

alır. Sistem tanımlanamadığı için matematiksel modellemesi de güç olabilir [Tsezos and Volesky, 1981]. Biyosorpsiyon metalle biyokütle arasındaki ilişki ile metallerin giderilmesi işlemidir. Serbest veya immobilize formda hücreler biyosopsiyon işlemi için kullanılabilir. Genellikle cansız hücreler özellikle maya hücreleri immobilize sistemlerde iyi bir biyoadsorbant görevi görmektedir [Bayhan, 2001], [Dönmez ve Aksu, 1999], [Stoll and Dunkan, 1997].

Literatürde endüstriyel atıksularların mikroorganizmalar kullanılarak giderimine ilişkin çalışmalar bulunmaktadır [Stoll and Duncan, 1997]. Kaplama endüstrisi atıksularından Cu^{2+}, Cd^{2+}, Cr^{3+}, Ni^{2+} ve Zn^{2+} ağır metallerinin giderimini cansız tutuklanmış maya hücreleri kullanılarak farklı reaktör konfigürasyonlarıyla çalışmıştır [Bayhan vd., 2001]. Eskişehir metal işleme endüstrisi atıksuları ile yaptıkları çalışmada atık biyokütleyi silika jele hapsetmişler ve bu tutuklanmış biyokütle ile atıksudaki nikel iyonlarını gidermişlerdir [Akar vd., 2009]. Chatterjee et. al. tarafından 2010 yılında yapılan bir çalışmada ise *Geobacillus thermodenitrificans* hücrelei kullanılarak Fe^{3+}, Cr^{3+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Ag^{+} ve Pb^{2+} ağır metallerinin giderimi araştırılmıştır.

Metal kaplama işlemlerinde iki tip atıksu oluşur. Kesikli kaplama çözeltileri ve yıkama çalkalama suları sıyırma, yıkama, temizleme ve kaplama işlemlerinden oluşan atıksular karışık kimyasal maddeleri ve siyanür içerir. Farklı tesislerde pH'ya bağlı olarak ölçülen metal miktarları Tablo 2.1'de verilmiştir [Arceivala, 1976]. Metal kaplama endüstrisi atıkları çok yüksek hacimde olmamalarına karşın toksik içerik açısından yoğun atıklardır. Metal kaplama endüstrisi atıklarında bulunan metallerin geri kazanımı için iyon değişimi veya ters ozmoz gibi yöntemler kullanılmaktadır. Biyolojik yöntemlerle de metal atıksuları arıtılabilir. Bunun için aktif çamur prosesleri kullanılır. Aktif çamur işleminden önce siyanürün giderilmesi gerekebilir. Siyanür değişik oksidasyon yöntemleri ile giderilebilir [Şengül, 1991].

Tablo 2.1: Metal kaplama atıksularının bazı kimyasal parametre değerleri.

Farklı tesislerdeki atıksuların pH değerleri	Cu^{2+} (mg/L)	Fe^{2+} (mg/L)	Ni^{2+} (mg/L)	Zn^{2+} (mg/L)	Cr^{6+} (mg/L)	Toplam Cr (mg/L)
A (6)	16	11	0	0	0	1
B (14)	19	3	0	0	0	0.5
C (0.2)	58	1.2	0	0	204	246
D (1.2)	35	8			555	612
E (15)	18	18	26		36	
F (10)	6	2	25	39		

Daha önceki çalışmalarımızda bu çalışma kapsamında kullanılacak olan altı bakteriyel izolatın 40-50 mg/L bakır veya demir varlığında sağlıklı üreyebildikleri ve giderim yapabildikleri gözlenmiştir [Ölmezoğlu, 2008].

Demire dirençli olan mikroorganizmaların 200 mg/L demir varlığında üreyebildikleri de görülmüştür [Karlık, 2010]. Yüksek miktardaki demir (II) havadan kaynaklanan oksidasyonla demir (III)'e dönüşerek çöker ve bu şekilde giderilebilir, düşük konsantrasyonlardaki demir biyolojik yollarla giderilmeye daha elverişlidir. İzolatların bakır konsantrasyonu yükseldikçe üreme hızları düşmesine karşın 100 mg/L bakır konsantrasyonununa kadar üreme gösterdikleri görülmüştür. Ong ve arkadaşlarının (2003) yapmış olduğu bir çalışmada aktif çamurdaki mikroorganizmaların bakıra karşı dirençleri 1-49 mg/L bakır konsantrasyonlarında denenmiş ve bakır içeren atıksudaki giderim verimleri incelenmiştir. Bu çalışmada aktif karbon, pirinç kabuğu gibi materyaller adsorbant olarak kullanılmıştır. Aktif çamurdaki bakır miktarı 7 mg/L'nin üzerine çıktığında mikroorganizmaların aktivitelerinin düştüğü gösterilmiştir.

Atıksudaki metal konsantrasyonları atıksuyun cinsine göre değişmektedir. Örneğin bakır kaplama endüstrisinin atıksuyunda bakır miktarı 1,2 g/L iken akrinonitril atıksuyunda bu değer 0'dır [Shin et al., 2009]. Yüksek metal konsantrasyonlarında mikroorganizmaların aktivite göstermemelerinden dolayı çok yüksek konsantrasyonlarda ağır metal içeren atıksuların arıtımında canlı mikroorganizmalarla giderim yapmak yerine fiziksel veya kimyasal konvansiyonel yöntemler tercih edilmektedir. Aktif çamur sisteminde ise arıtım verimi diğer mikroorganizmalara da bağlıdır. Bu nedenle aktif çamurda aşı olarak kullanılması düşünülen bir mikroorganizmanın 50-100 mg/L bakır konsantrasyonuna direçli olması yeterli olabilir. Ancak bu mikroorganizmanın aktif çamur sistemindeki zor koşullara dirençli olması çok daha önemli bir faktördür. Aktif çamur ile ilgili çalışmalarda test edilen bakır konsantrasyonları genellikle 50 mg/L'nin altındadır ve yüksek konsantrasyonlarda giderim veriminin düştüğü görülmüştür [Pamukoğlu ve Kargı, 2007], [Nicolau et al.,2005], [Sağ vd., 2003], [Cabrero et al., 1998].

N1c ve N5a olarak adlandırdığımız izolatların 20 mg/L bakır içeren besiyerinde pH 6,8 de ve 30 °C de yaklaşık % 80 giderim sağladıkları bulunmuştur. Bakır konsantrasyonunun 70 mg/L ye çıkarılması giderim verimini düşürmüştür [Ölmezoğlu, 2008]. Demir giderimi yapan izolatlardan N1a izolatı ise 50 mg/L demir içeren besiyerinde inkübasyonun ilk saatinde deney koşullarına göre %40-%72

arasında giderim sağlamıştır. Diğer izolatlar bir gün sonunda yüksek verimlilikte giderim sağlamışlardır. İnkübasyonun ilerleyen günlerinde ise biyogiderim % 80'e ulaşmıştır. Havadan kaynaklanan oksidasyon nedeniyle inkübasyonun üçüncü gününden sonra giderim % 95-100 arasında ölçülmüştür [Karlık, 2010].

Bu tez çalışması kapsamında demir ve bakır giderim verimleri daha önceki çalışılmalarda belirlenmiş olan bakteri izolatları kullanılmıştır. İzolatlar giderim veriminin artırılması amacıyla daha önceki çalışmalarda hücre tututklamak amacıyla kullanılmış olan divinylbenzen polimerine immobilize edilmişlerdir. İmmobilize hücreler yüksek yoğunluğa ulaşabilirler ve bu hücrelerin reaktör verimlilikleri yüksektir. İmmobilizasyon daha çok süspansiyon kültürleri destekler niteliktedir. Ayrıca immobilizasyon mikrobiyal reaktörde kütle transfer karakteristiğini desteklemektedir, böylece hücre kütlesi boyunca besin kaynağı ve ürünün etkinliği artmış olur. Bakteri immobilizasyon uygulamaları için mikroporöz yapılı divinil benzen kopolimeri kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır [Akay vd., 2004]. Bu polimer ayrıca maya hücrelerinin tutuklanması ve sürekli sistemde etanol üretimi için de kullanılmıştır [Karagöz vd., 2008]. PolyHIPE olarak da bilinen yüzeyi hidrofobik olan bu polimer mikroporöz bir yapıya sahiptir ve yüksek hücre yoğunluğu için elverişli bir ortam sağlar.

Bu tez çalışmasında, yukarıda bahsi geçen izolatlar genetik yöntemler ve biyokimyasal karakterizasyon kitleri kullanılarak tanımlanmaya çalışılmış ve bu izolatların metal kaplama endüstrisi atıksularında bulunabilecek (Tablo 2.1'de verilmiş olan) beş farklı metali giderme kapasiteleri özgür ve tutuklanmış formlarında, kesikli ve sürekli sistemlerde incelenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Mikroorganizmaları Tanımlama Çalışmaları

Karakterizasyonda 16SrRNA dizileri, gram reaksiyonları, oksidaz testi ve RAPID kimyasal karakterizasyon testine verdikleri reaksiyonlar dikkate alınmıştır. Ancak karakterizasyonda en belirleyici yöntem izolatların 16SrRNA dizilerinin diğer bakteri türleri ile benzerlikleri olmuştur. Diğer yöntemler destekleyici niteliktedir.

3.1.1. İzolatların 16SrRNA Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması

N1a, N1c, N3a, N4c, N5a, N5b olarak isimlendirilen izolatlar LB besiyerinde bir gece üretilmişlerdir. Hücreler toplanmış ve genomik DNA'ları Fermentas genomik DNA izolasyon kiti kullanılarak izole edilmiştir. Bu genomik DNA'lar 16SrRNA genlerinin çoğaltılması amacıyla PCR'da kalıp DNA olarak kullanılmıştır. 16SrRNA genlerinin PCR ile çoğaltılması için evrensel primerler olarak bilinen primerler kullanılmıştır (Primerler: ileri 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ve geri 5'ACGGCTACCTTG TTACGACTT).

PCR reaksiyon karışımı 28 µl su, 5 µl 10x PCR Mg^{2+} tamponu, her bir primerden 50 pmol, 5µl 2 mM dNTP, 0.5 µg genomik DNA ve 3 Uf Taq polymeraz enzimi içermektedir. PCR 35 döngüde tamamlanmıştır ve her döngü 94 °C'de 1 dakika, 58 °C'de 1 dakika ve 72 °C'de 2 dakika sürmektedir. Reaksiyon sonrası elde edilen DNA'lar % 0.9'luk agaroz jelde ayrıştırılarak gözlemlenmişlerdir. PCR ürünleri DNA dizilerinin belirlenmesi amacıyla Qiagen DNA saflaştırma kiti kullanılarak jelden saflaştırılarak çıkarılmışlardır. DNA dizileri İontek firmasında belirlenmiştir.

3.1.2. Gram Boyama

Gram boyama işlemi için öncelikle taze bakteri kültüründen bir damla bakteri solusyonu lam üzerine damlatılmış, kurutulmuş ve 1-2 saniye aleve tutularak lama yapışmaları sağlanmıştır. Preparat üzerine kristal viyole (Gentiana viyole) dökülmüş ve 1 dakika bekletilmiştir. Lam üzerinde kalan kristal viyolet boyası döküldükten sonra Gram iyot (Lugol) preparat üzerine ilave edilmiş, yaklasik 1

dakika beklenmiştir. Daha sonra Preparat %96'lık etil alkol ile 2-3 kez yıkanmıştır. Su ile yıkandıktan sonra safranin boyasi ile 15 saniye boyanmıştır.

Tekrar su ile yıkama yapıldıktan sonra kurutulmuştur. Preparatlar trinokular Faz Kontrast Mikroskop (Carl Zeiss, Axio Scope Model) kullanılarak immersiyon objektifi ile incelenmiş ve Axiocam Icc3 3.3 Mp Firewire Connection Dijital Kamera (Carl Zeiss) kullanılarak görüntü alınmıştır.

3.1.3. Oksidaz Testi ve RAPID Kiti ile Biyokimyasal Karakterizasyon

Oksidaz testi RAPID kiti ile birlikte gelen bir solusyon ile yapılmaktadır. RAPID kiti ise tezin ekinde verilen farklı test sonuclarını 4 saat inkübasyondan sonra görebileceğimiz kuyucuklardan oluşan bir kit şeklindedir. Test sonucunda oluşan renkler RAPID test kitapçığında verilmiş olan standart bakteri türlerinin vermiş olduğu sonuçlarla kıyaslanmakta ve tanımlama bu şekilde yapılmaktadır.

3.2. Mikroorganizmaların Metal Giderim Kapasitelerinin İncelenmesi

3.2.1. Kesikli Sistemde Giderim

Çalışma kapsamında metal giderim kapasiteleri belirlenecek olan altı izolatın metal giderim verimleri beş farklı metalin farklı konsantrasyonları için belirlenmiştir. Bu deney kesikli koşullarda 100 ml hacimli vidalı kapaklı şişeler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kesikli sistemde tutuklanmış hücrelerin metal giderim kapasiteleri 48 saat süresince örnek alınarak belirlenmiştir. Hücreler öncelikle 50 ml LB besiyerinde 30 °C de 2 gün süreyle çalkalanarak üretilmişlerdir. Üreyen hücre kültürü içinde 3-4 mm boyutunda 2 gr polimer bulunan 100 ml'lik vidalı kapaklı şişelere alınmış ve çalkalanmadan inkübasyona bırakılmışlardır.

Polimerler [Karagöz vd., 2009] tarafından tarif edildiği gibi hazırlanmıştır. 5.6 ml stiren, 2.6 ml divinilbenzen ve 1.8 ml span 80 50 ml'lik falkon tüplerde karıştırılmıştır. Daha sonra 40 ml %1.25 potasyum peroksi disülfat eklenip hızlı bir şekilde 5 dk çalkalanmıştır. 60 °C'lik etüvde 5 dk dik bir şekilde bekletildikten sonra 3 dk hızlı bir şekilde çalkalanıp karıştırılarak tekrar etüve yerleştirilmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlandıktan sonra polimer etüvde 24saat bekletilmeye alınmıştır. 24 saat

sonunda katılaşan polimer falkon tüpünden dikkatlice çıkarıldıktan sonra yine aynı sıcaklıktaki etüvde kurumaya bırakılmıştır. İyice kuruyan polimer daha sonra el ile küçük parçalara ayrılmış ve bu parçalar elekten geçirilmiştir. Boyutu 4-8 meş (3,2-6,3 mm) aralığındaki tanecikler reaktörde hücre tutuklamak için kullanılmışlardır.

Bir gün sonra şişe içindeki sıvı kültür boşaltılmış, yüzeyinde hücrelerin tutuklanmış olduğu polimerler üzerine 30 ml taze LB besiyeri eklenmiş ve bir gün inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem üç kez tekrar edilmiştir. Bu sayede polimer üzerine tutuklanan hücrelerin miktarının artması sağlanmıştır. Tutuklu hücrelerin metal giderim verimleri sentetik atıksu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sentetik atıksuya ilave edilen beş farklı metal için (Fe^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Cr^{3+} ve Ni^{2+}) giderim kapasiteleri iki gün boyunca alınan üç örnekte (0., 24. ve 48. saat örnekleri) ölçülmüştür. Ölçüm için bölümümüzde bulunan ICP-OES (Perkin Elmer Optima 7000) cihazı kullanılmıştır. Metal giderimi aşağıda içeriği verilen sentetik atıksu kullanılarak yapılmıştır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Sentetik Atıksu Bileşimi.

Sentetik atıksu	g/L
Glikoz	2
Pepton	1
Üre	0.5
KH_2PO_4	1
K_2HPO_4	1.5
$(NH_4)_2SO_4$	0.1
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0.2
$NaHCO_3$	0.0154
$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	0.05
NaCl	0.05
KCl	0.01
$CuSO_4 \times 5H_2O$	0.00015
$MnSO_4 \times H_2O$	0.0108
$ZnCl_2$	0.00038
$CoCl_2 \times 6H_2O$	0.0007
$FeCl_3 \times 6H_2O$	0.0015

Metallerin stok solusyonları aşağıdaki kimyasallar kullanılarak hazırlanmıştır.

- $CuSO_4 \times 5H_2O$
- $ZnCl_2$
- $Cr\ (NO_3)_3 \times 9H_2O$
- $N_2NiO_6 \times 6H_2O$
- $FeSO_4 \times 7H_2O$

3.2.2. Sürekli Sistemde Giderim

180 ml hacimli reaktör kullanılmıştır. Bu reaktör; paslanmaz çelikten yapılmıştır, iç çapı 5cm dir, duvar et kalınlığı 3 mm dir, 9,2 cm su sütunu yüksekliğine sahiptir.

Reaktör Karagöz ve arkadaşlarının (2009) tarif ettiği şekilde hazırlanmıştır. Yaklaşık 3 mm çapında polimer parçaları ile doldurulan reaktör hücre immobilizasyonundan önce steril edilmiştir. Polimer %90 poroz yapıya sahiptir. Reaktörde kullanılacak polimerlerden 7,9 g tartıldıktan sonra reaktör bu malzemeyle doldurulmuş ve polimerlerin üzerine cam yünü konularak reaktör kapağı kapatılmıştır. Steriliasyon için reaktör ve kullanılacak hortum gibi malzemeler, alüminyum folyo ile sarılıp 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir.

LB besiyerinde (Tablo 3.2) 2 gün üretilmiş 1 L N4c hücre kültürü 1 ml/dk akış hızıyla reaktöre gönderilmiş ve hücrelerin polimere tutuklanmaları sağlanmıştır.

Hücrelerin reaktöre gönderilmesi işlemi tamamlandıktan sonra giderim yapılacak olan sentetik atıksu reaktöre farklı akış hızlarında gönderilmiştir. Her akış hızı için reaktör yeniden polimerle doldurulmuş ve hücreler immobilize edilmişlerdir. Reaktörün kurulması ve işletilmesi her akış hızı için 1 haftada tamamlanmıştır. Reaktör üç farklı akış hızında (0,5 ml/dk, 1 ml/dk ve 2 ml/dk) ikişer kez çalıştırılmış ve toplamda 6 kez çalıştırılmıştır. Ayrıca farklı sürelerde reaktör çıkışından LB agar besiyerine ekim yapılmış ve immobilize hücrelerin ölüm süreleri tespit edilmiştir. Polimere tutuklanan hücre miktarının tespit edilmesi için polimerler reaktöre yerleştirilmeden önce ve proses bitiminde tartılmışlardır. Aradaki ağırlık farkı immobilize olan hücre kütlesi olarak alınmıştır.

Tablo 3.2: Luria Broth Besiyeri Bileşimi.

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

3.3. Üreme Eğrisi ve Canlı Hücre Sayısının Belirlenmesi

İzolatların farklı metaller varlığındaki üremeleri OD 600nm'de spektrofotometre kullanılarak alınan absorbans ile belirlenmiştir. İnkübasyonun 0. saatinde alınan absorbans değerleri dört günlük inkübasyon sonunda alınan absorbans değerlerinden çıkarılarak üreme miktarı tespit edilmiştir. CFU (colony forming unit, koloni oluşturabilen ünite) tespitinde ise üremenin belirli günlerinde alınan kültür seyreltilerek LA besiyerine yayılmış ve oluşan koloniler sayılmıştır. Hesaplama aşağıdaki gibi yapılmıştır:

- CFU/ml= (koloni sayısı x seyreltme katsayısı)/agara ekilen kültür miktarı.

3.4. ICP ile Metal Analizi

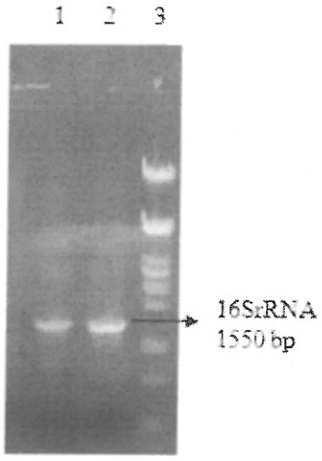
Metal analizi yapmak için öncelikle hazırlanan kalibrasyon çözeltilerinin konsantrasyonları ölçülmüş ve ölçülen değerlere göre bir kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Kültürlerden alınan 2 ml örnek 6000 rpm de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı mikropipetle alınarak yeni tüplere aktarılmış, tüpün dibinde kalan kısım atılmıştır. Santrifüj işlemi sonrasında yeni tüplere aktarılan süpernatantlar 1/10 oranında seyreltilmiş ve metal miktarı tayini ICP-OES (Perkin Elmer Optima 7000) cihazı ile metal analizleri için sertifikalı standart çözelltilerinden uygun kalibrasyon aralıklarında konsantrasyonlar hazırlanarak analizler gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Karakterizasyon Çalışmaları

4.1.1. 16SrRNA Dizilerinin Belirlenmesi

Bakteri izolatlarının genomik DNA'ları kit kullanılarak izole edilmiş ve metot kısmında verilen primerlerle PCR gerçekleştirilmiştir. PCR sonucunda alınan bantlar (Şekil 4.1) jelden kesilerek DNA dizi analizi için saflaştırılmıştır. Bu şekilde 1 ve 2 bakteri izolatlarına ait PCR ürünlerini 3; markörü ifade etmektedir. İontek Firması (İstanbul, Türkiye) tarafından tespit edilen 16SrRNA gen dizileri diğer bakterilerle benzerliklerinin saptanması amacıyla NCBI BLAST analizi için kullanılmıştır. Dizilerin BLAST analizi sonucunda en yüksek benzerlik gösterdikleri bakteri türleri aşağıda verilmiştir. Alınan sonuçların doğruluğu Gram boyama, koloni morfolojisi ve biyokimyasal testlerle de desteklenmiştir. İzolatların gen dizileri Gen Bankası'na yüklenmiş ve aksesyon numaraları alınmıştır, numaralar parantez içinde verildiği gibidir: N1a (JX025017), N1c (JN899140), N3a (JX025018), N4c (JX025019), N5a (JN899141), N5b (JX025016).



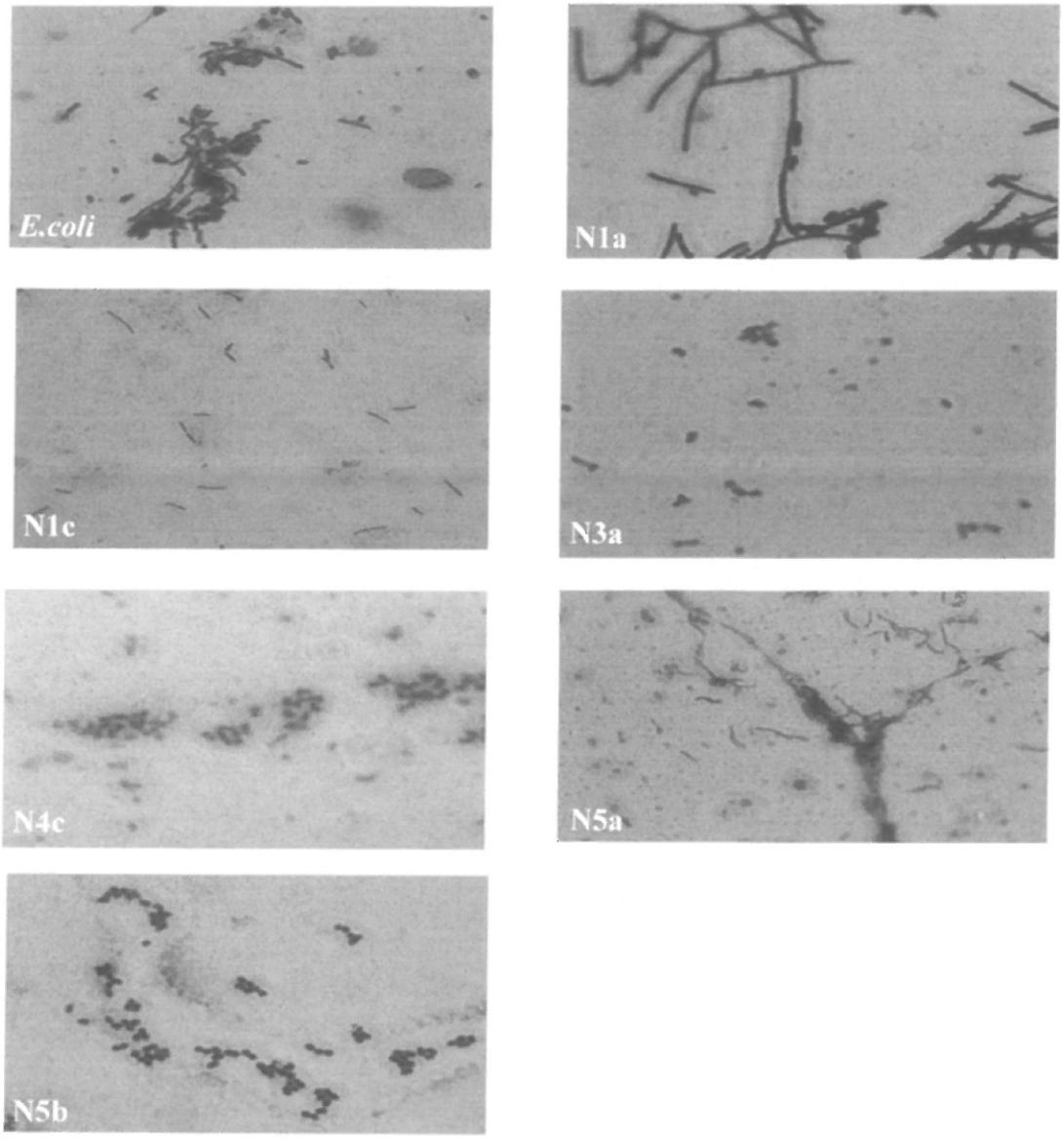
Şekil 4.1: İzolatların 16SrRNA genlerinin PCR ile çoğaltılması sonucunda elde edilen bantlar.

4.1.2. Gram Boyama

Gram boyama, oksidaz testi ve 16SrRNA benzerlik analizi sonuçları aşağıdaki tabloda verilmiştir. Oksidaz testi ve gram boyama sonuçları 16SrRNA dizi benzerliklerini destekler niteliktedir. Örneğin *Pseudomonas* türleri oksidaz pozitif ve gram negatif organizmalardır. N5a koloni morfolojisi itibari ile de *Pseudomonas stutzerii*'ye benzerlik göstermektedir ve oksidaz pozitif ve gram negatif olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: İzolatların karakterizasyonu.

İzolat adı	16SrRNA benzerlik analizi	Gram reaksiyonu	Oksidaz testi
N1a:	*Lysisnibacillus sphaericus (% 95)*	Gram +	(+)
N1c:	*Achromobacter sp., Alcaligenes (% 96)*	Gram değişken	(+)
N3a:	*Shigella, E. Coli O157:H7 (%98-99)*	Gram -	(-)
N4c:	*E. Coli (% 95)*	Gram -	(-)
N5a:	*Pseudomonas stutzeri, Pseudomonas sp. (% 98)*	Gram -	(+)
N5b:	*Enterecoccus durans (% 99)*	Gram +	(-)



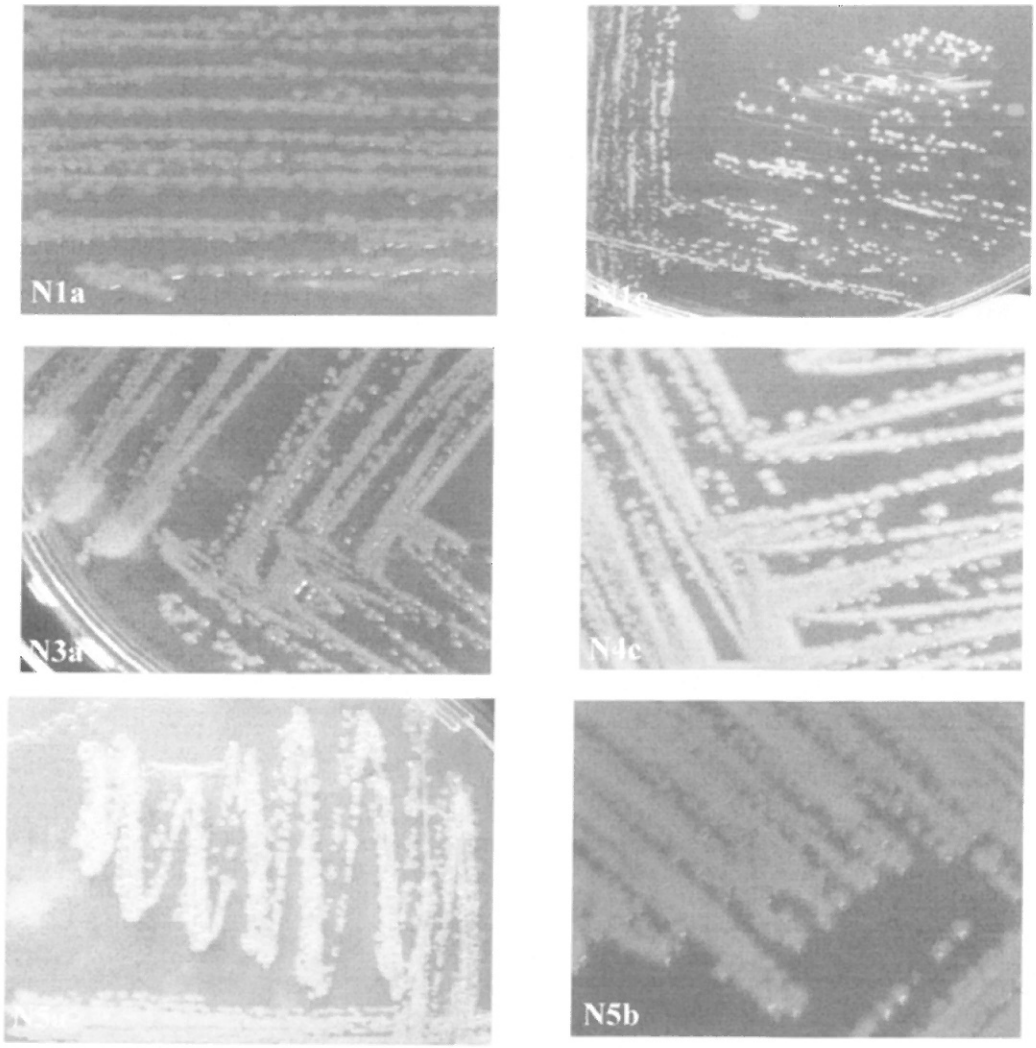
Şekil 4.2: İzolatların Gram boyama sonucundaki görüntüleri.

Gram reaksiyonu sonucunda N5a'nın gram negatif olduğu görülmüştür. Genomik karakterizasyon sonucunda N5a'nın *Pseudomonas* cinsine benzerlik gösterdiği görülmüş olduğundan gram negatif reaksiyon vermesi beklenmektedir.

N1c ise gram negatif *E. coli*'ye kıyasla daha mor görünmesine rağmen Şekil 4.2'de görülen gram pozitif koklar gibi tam olarak gram pozitif bir reaksiyon da vermemiştir. *E.coli* gram boyama prosedürünün doğruluğunu tespit etmek amacıyla kullanılmıştır. Genomik karakterizasyonu dikkate alındığında N1c'nin gram negatif basil olması beklenmektedir. *Achromobacter* cinsi bakterilerin değişken gram reaksiyonlar verebildikleri bazı çalışmalarda belirtilmektedir.

4.1.3. Koloni Morfolojisi

N1c ve N5a'ya ait kolonilerin görüntüleri Şekil 4.3'de verilmiştir. N5a kolonileri literatürde verilen *Pseudomonas stutzerii* türüne ait kolonilere benzerlik göstermektedir.



Şekil 4.3: İzolatların koloni morfolojileri.

Karakterizasyon çalışmaları sonucunda RAPID biyokimyasal testi sonucunda N3a ve N4c'nin *E. coli*'ye benzer olduğu görülmüştür. Ancak 16SrRNA dizi analizinde N4c için en yüksek benzerlik *E. coli* ile olmuştur ve bu oran %95 olarak bulunmuştur. Bu oran tür seviyesinde benzerlik için düşüktür.

Bunun yanısıra N3a ve N4c Gram negatif olmalarına rağmen hücreler *E. coli* hücrelerine kıyasla daha yuvarlak kokkobasil şeklindedirler. N5a tüm testler sonucunda *Pseudomonas stutzerii*'ye tam benzerlik vermiştir. Koloni morfolojisi de

bunu desteklemektedir. N5b'nin hücre morfolojisi, oksidaz test sonucu ve gram reaksiyonu 16SrRNA dizi benzerliğini desteklemektedir. *Enterococcus durans* ile benzerlik %99 olarak tespit edilmiştir. N1a gram pozitif oksidaz pozitif basil olması nedeniyle *Lysinobacillus* olma olasılığı yüksektir. 16SrRNA dizi benzerliği *Lysinobacillus sphaericus ile* %95 tir. N1c gram boyama sonucunda değişken reaksiyon göstermiştir.

4.1.4. RAPID Test Sonuçları

Tablo 4.2: RAPID ONE test sonuçları.

Testler		N1c	N5a	N1a	N4c	N3a	N5b
URE	Üre				-	-	
ADH	Arginin				+	+	
ODC	Ornitin				+	+	
LDC	Lizin hidrolizi				+	+	
TET	Tiol kullanımı				-	-	
LIP	Yağ asidiesterleri hidrolizi				-	-	
KSF	Aldehid şekeri kullanımı				-	-	
SBL	Sorbitol kullanımı				+	+	
GUR	p-Nirofenil β-D-glukorinit hidrolizi				+	+	
ONPG	o-Nirofenil β-D-galaktosit hidrolizi				+	+	
BGLU	p-Nirofenil β-D-glukosit hidrolizi				-	-	
BXYL	p-Nirofenil β-D-xylosit hidrolizi				-	-	
NAG	p-Nirofenil-n-asetil-β-D-glukozaminit hidrolizi				-	-	
MAL	Malonat kullanımı				+	+	
PRO	Prolin β-naftilamid hidrolizi				-	-	
GGT	γ-Glutamil β-naftilamid hidrolizi				+/-	+	
PYR	Pirrolidonil-β-naftilamid				-	-	
ADON	Adonitol kullanımı				-	-	
IND	Triptofan kullanımı				+	+	
OXI	+	+	+	+	-	-	-
Gram					-	-	

Tablo 4.3: RAPID NF PLUS test sonuçları.

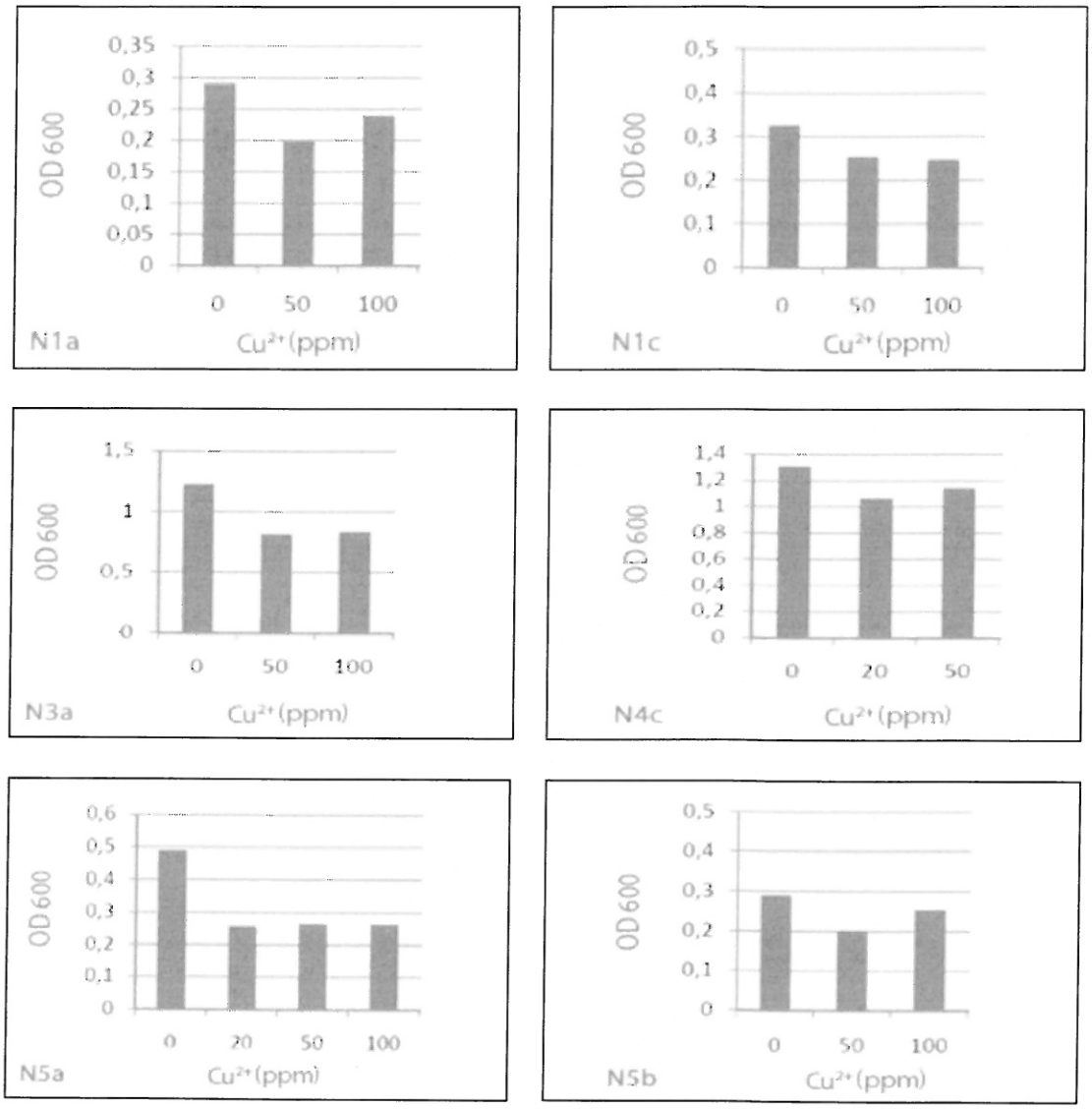
Testler	N1a	N1c	N5a	N5b
ADH	+/-	+	-	+
TRD	+	+/-	+	+
EST	+	-	+/-	+
PHS	+	+	-	+
NAG	+	-	+	+
aGLU	+	+	+	+
BGLU	+	+	+	+
ONPG	+	+	+	+
URE	+/-	-	-	+
GLU	-	-	-	-
PRO	+	-	+	-
PYR	+	+	-	+
GGT	-	-	-	-
TRY	-	-	-	+/-
BANA	-	-	+/-	-
IND	-	-	+/-	-
NO3	-	-	-	-
OXI				

- N1a, N1c, N3a, N4c, N5a, N5b: Bakteri izolatları.

RAPID NF plus gram pozitif oksidaz pozitif bakteriler için uygulanan bir testtir. Elimizde bulunan 4 gram pozitif oksidaz pozitif izolat RAPID NF plus ile test edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.3'te verildiği gibidir. Ancak izolatların verdikleri sonuçlar RAPID kitapçığında bulunan başka bakterilerle benzerlik göstermemiştir. Dolayısıyla RAPID kiti N1a, N1c, N5a ve N5b izolatları için kullanılabilir sonuçlar vermemiştir. Oksidaz negatif gram negatif izolatlar için ise (N4c ve N3a) RAPID One kiti kullanılmıştır. N1a, N1c, N3a, N4c, N5a ve N5b ile gösterilenler bakteri izolatlarıdır (Tablo 4.2). Bu izolatların özellikleri *Escherichia coli* ile yüksek benzerlik göstermiştir.

4.2. İzolatların Metal Giderim Kapasiteleri

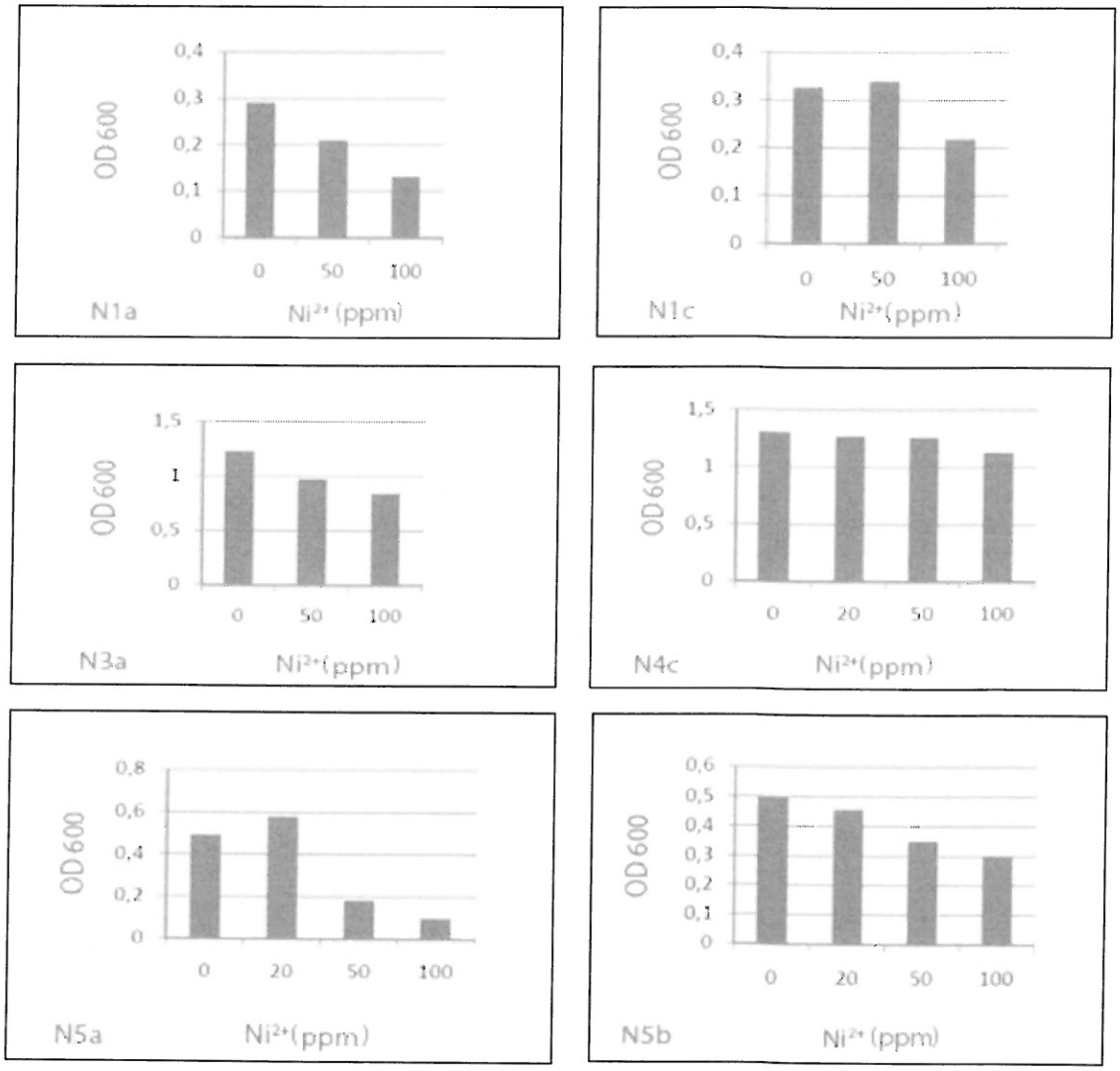
4.2.1. Metal Dirençliliği



Şekil 4.4: İzolatların Bakır dirençleri.

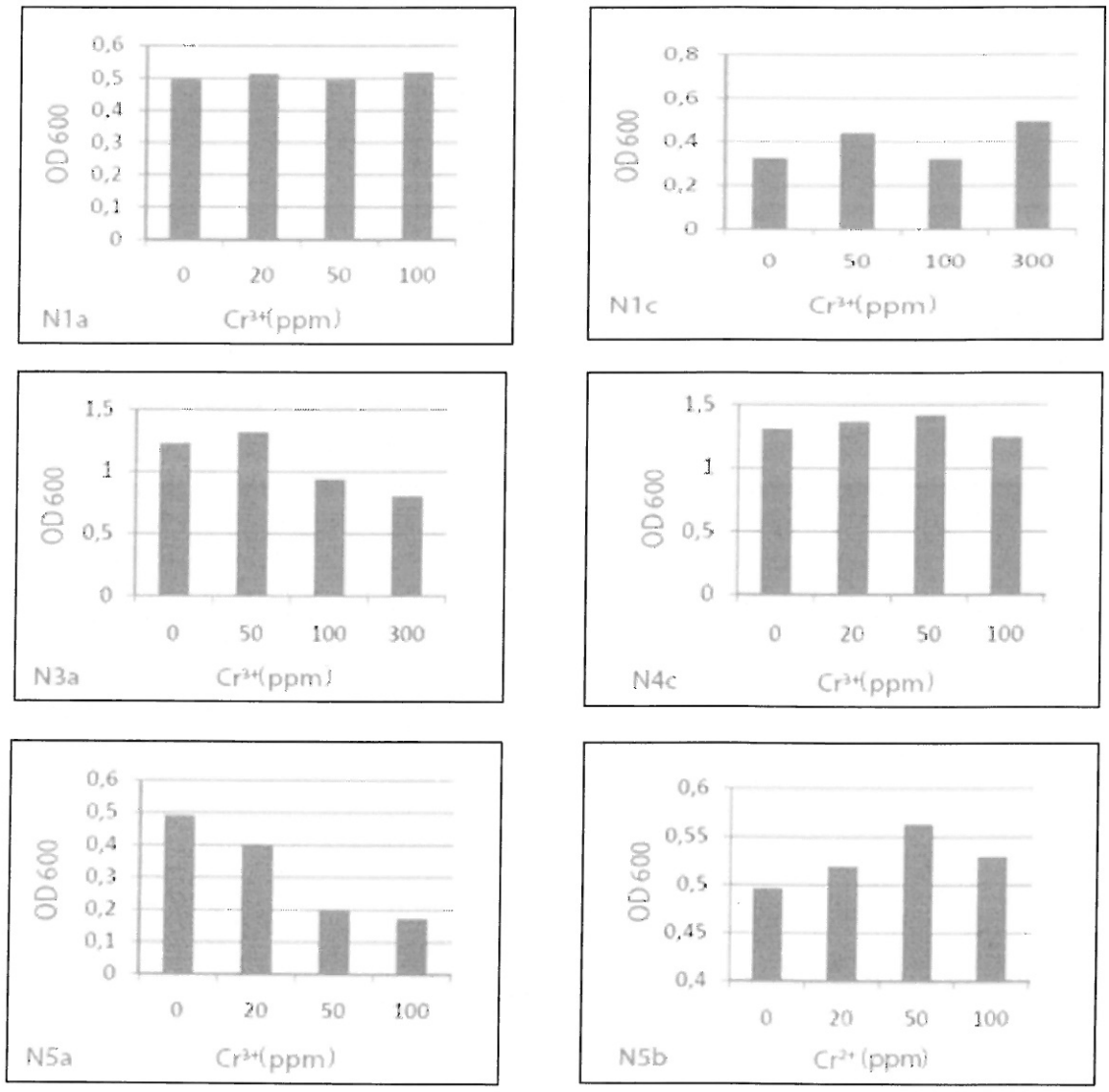
Bakteriyel izolatların metal giderim kapasiteleri incelenmeden önce metallere dirençlilikleri tespit edilmeye çalışılmıştır. Deneyleri 15 ml'lik falkon tüplerde LB besiyeri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Falkon tüplerde çalkalama ve oksijen alımı sağlıklı olmadığı için bazı izolatlar, N1a, N1c, N5a ve N5b, sağlıklı üreme göstermemişlerdir. Dört gün sonunda absorbans değerleri yaklaşık 0.5 civarındadır. Deney sonuçlarına bakıldığında N4c ve N3a'nın bir çok metalin 100 mg/L ve 300 mg/L gibi yüksek konsantrasyonlarında bile sağlıklı üreyebildikleri

görülmüştür. Farklı konsantrasyonlarda Cu^{2+} içeren LB besiyerinde dört günlük inkübasyon sonucunda ölçülen absorbans değerleri Şekil 4.4'de görülmektedir.



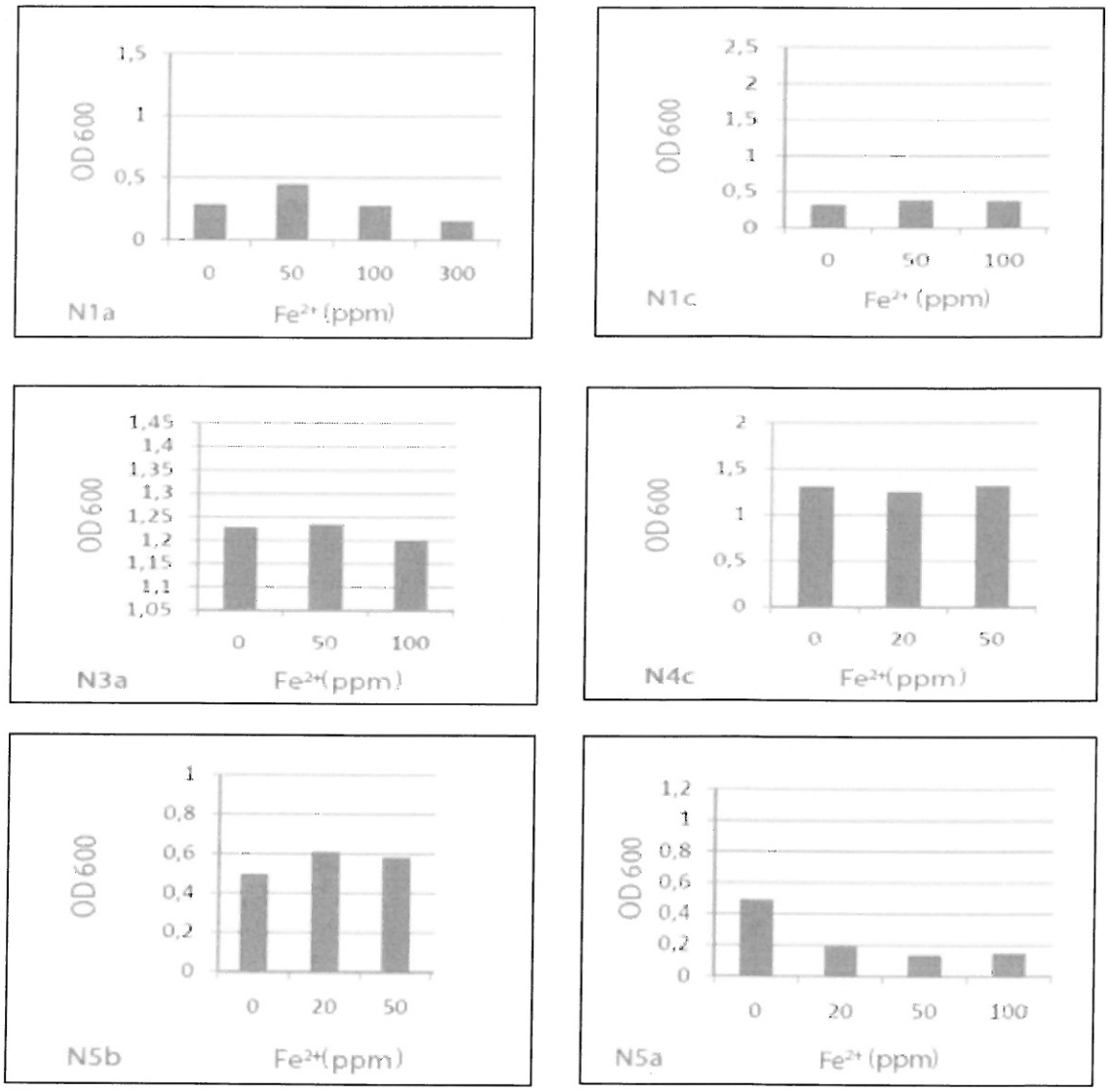
Şekil 4.5: İzolatların Nikel dirençleri.

N3a ve N4c'nin 100 mg/L nikel varlığında sağlıklı üreyebildikleri belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda Ni^{2+} içeren LB besiyerinde dört günlük inkübasyon sonucunda ölçülen absorbans değerleri Şekil 4.5'de görülmektedir.



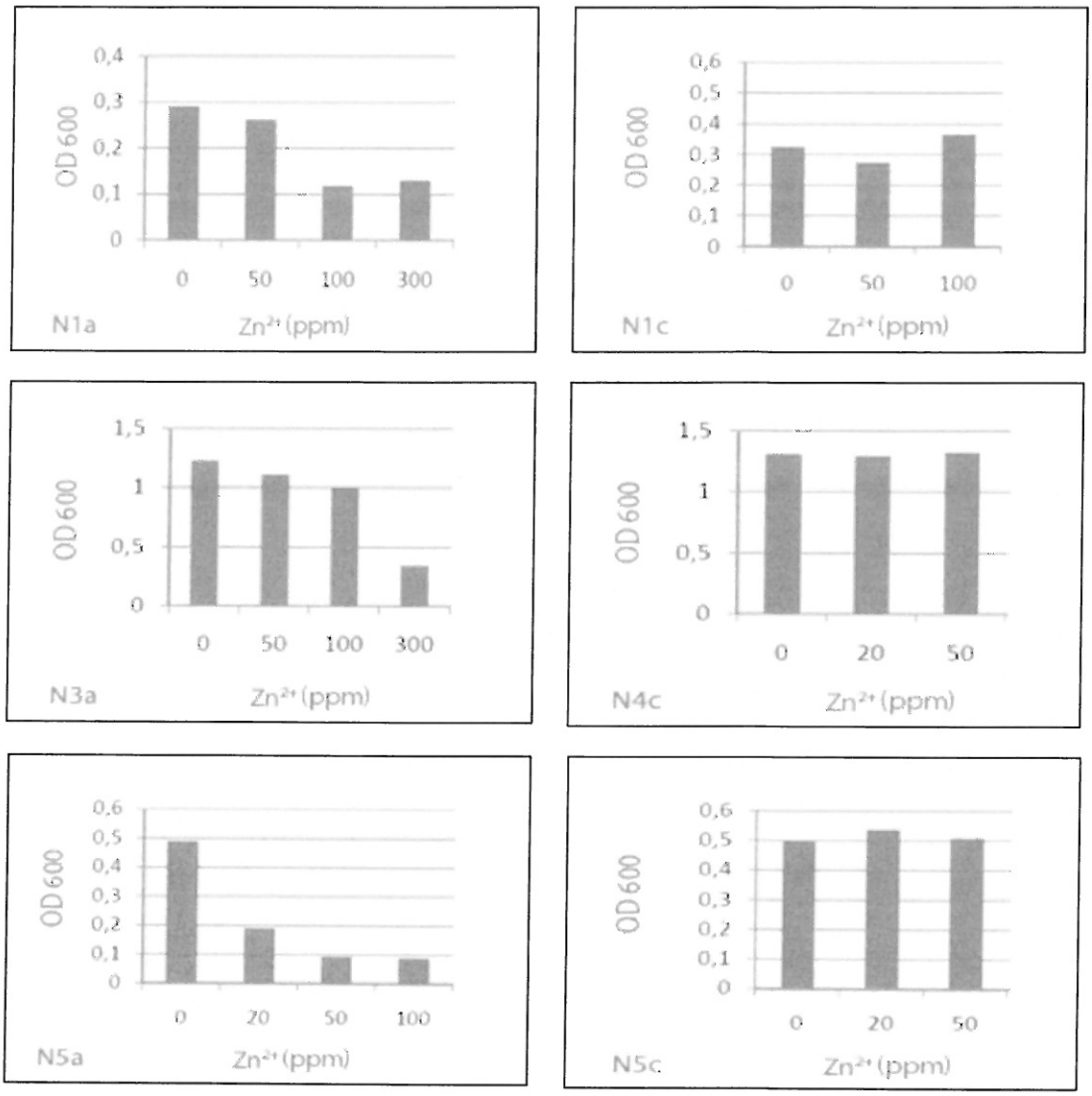
Şekil 4.6: İzolatların Krom dirençleri.

Krom varlığında N3a ve N4c'nin sağlıklı üreme gösterdikleri N1a, N1c ve N5b'nin ise düşük hızda da olsa üreyebildikleri görülmüştür. Farklı konsantrasyonlarda Cr^{3+} içeren besiyerinde dört günlük inkübasyon sonucunda ölçülen absorbans değerleri Şekil 4.6'da görülmektedir.



Şekil 4.7: İzolatların Demir dirençleri.

500 mg/L konsantrasyonda eklendiğinde demir çökmektedir. Bu nedenle bu konsantrasyonda alınan OD değerleri grafiğe yansıtılmamıştır. N3a, N4c ve N5b'nin yüksek demir konsantrasyonlarına dirençli oldukları görülmüştür. Farklı konsantrasyonlarda Fe^{2+} içeren LB besiyerinde dört günlük inkübasyon sonucunda ölçülen absorbans değerleri Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



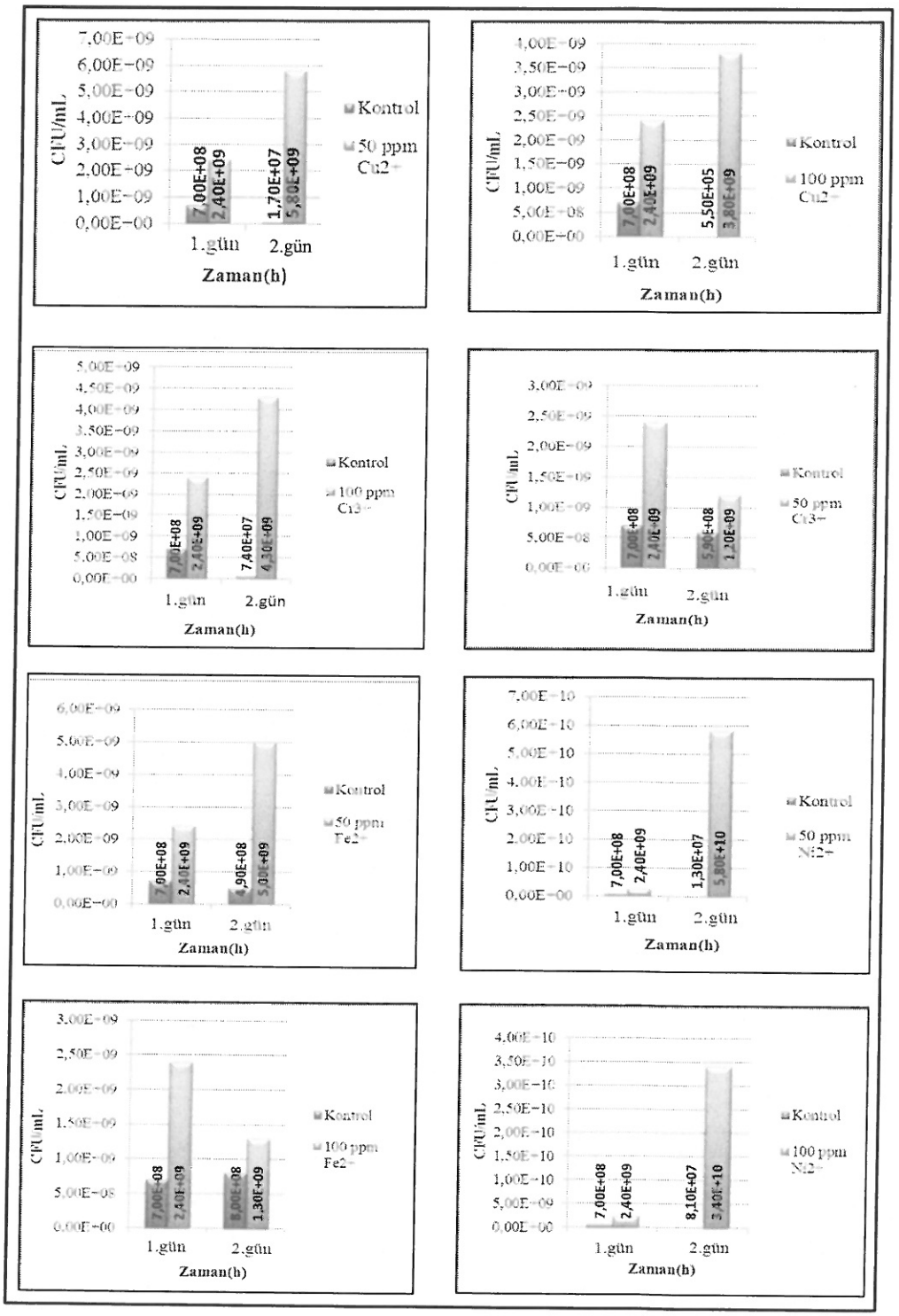
Şekil 4.8: İzolatların Çinko dirençleri.

Farklı konsantrasyonlarda Zn^{2+} içeren LB besiyerinde dört günlük inkübasyon sonucunda ölçülen absorbans değerleri Şekil 4.8'de gösterilmiştir.

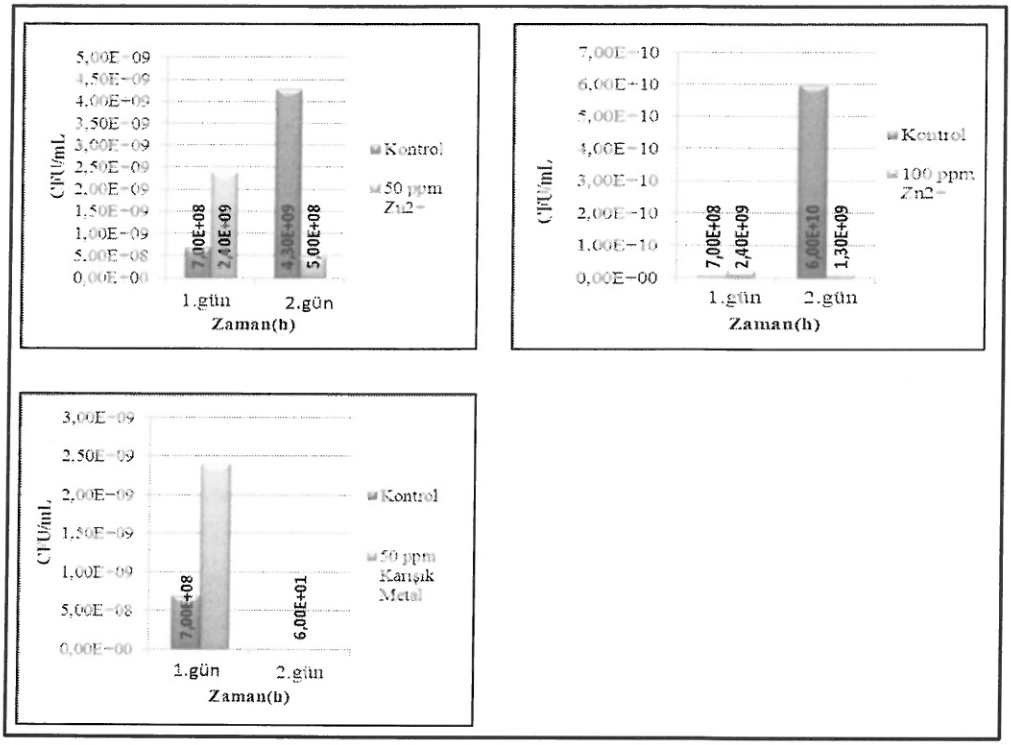
İzolatların metal dirençlilikleri onların canlı halde iken metalleri giderip gideremeyeceklerinin de bir göstergesidir. İzolatların metal giderim verimleri metal dirençliliklerine paralel sonuçlar vermiştir. N4c metal gideriminde de en verimli olan suştur.

Metal varlığında canlı hücre sayısı yalnızca yüksek toleransa sahip N4c suşu için tespit edilmiştir. CFU (koloni oluşturabilen ünite) değerleri bize bakterinin ne zaman öldüğünü göstermesi açısından önemlidir. Şekil 4.9 N4c izolatının beş metalin 50 ve 100 mg/L konsantrasyonlarında ve tüm metallerden 50 mg/L olacak şekilde toplam 250 mg/L metal içeren sentetik besiyerinde 2 gün boyunca ölçülen CFU değerlerini göstermektedir (deneyin başlangıç saatinde tüm kültürlerde bakteri

konsantrasyonu 4 x 107 CFU/mL'dir). N4c tüm metallerin 50 ve 100 mg/L konsantrasyonlarında canlılığını devam ettirmekte ancak 250 mg/L karışık metal içeren (her metalden 50 mg/L olacak şekilde) besiyerinde ikinci gün ölmektedir.



Şekil 4.9: Farklı metal konsantrasyonlarının N4c'nin üremesine etkisi.



Şekil 4.9: Devam.

4.2.2. Tutuklanmış Hücrelerle Metal Giderimi

4.2.2.1. Kesikli Koşullarda Giderim

PolyHIPE Polimer olarak bilinen divinil benzen polimerine tutuklanmış hücrelerle kesikli sistemde yapılan metal giderimi sonucu ölçülen metal miktarları Tablo 4.4 ve 4.5'da verilmiştir. Sonuçlar kesikli koşullarda N1c ve N1a izolatlarının iyi giderim sağlayamadıklarını göstermektedir. N4c izolatı ise diğerlerine kıyasla tüm metaller için daha yüksek biyogiderim sağlamıştır. Giderim büyük oranda ilk saatlerde gerçekleşmiş, verim ilerleyen günlerde düşük bir artış göstermiştir. Giderim özellikle Cr^{3+}, Fe^{2+} ve Zn^{2+} metalleri için yüksek bulunmuştur. Cu^{2+} giderim verimi ise üçüncü gün sonunda %100'e ulaşmıştır (Tablo 4.4). Tablo 4.5 ise seçilen bazı izolatların tüm metallerden 50 mg/L (toplam 250mg/L) içeren sentetik atıksudaki 3. saatteki giderim verimlerini göstermektedir. Bu deney iki kez tekrar edilmiştir ve sonuçlar hata payları ile birlikte verilmiştir. Tablo 4.5'de en yüksek giderimin N4c izolatı tarafından gerçekleştiği görülmektedir..

Tablo 4.4: 50 mg/L farklı metal içeren (toplam metal konsantrasyonu 50 mg/L) sentetik atıksuda immobilize edilmiş izolatların giderim verimi.

Metaller (Toplam 50 mg/L)	Zaman (Saat)	Bakteri izolatları					
		N1a	N1c	N3a	N4c	N5a	N5b
Cr^{3+}	3	-46*	30	-57*	90.8	94	87.7
	28	-63*	-178*	-35*	69.5	83	84.1
	52	12.8	-77*	-5.6*	72.5	92	89.8
Cu^{2+}	3	13.2	-4.4*	44.6	73.7	19.9	65.4
	28	14.2	4.9	40.9	81.6	6.2	93.9
	52	-21*	-48*	7	93.3	-30.1*	90.7
Fe^{2+}	3	97.1	96	99.1	100*	97.3	99
	28	-3785*	-671*	-248*	-242*	-131*	-228*
	52	-336*	-309*	-127*	-204*	-404*	-254*
Ni^{2+}	3	-114*	-92*	-181*	83.4	89.5	82.7
	28	-128*	-112*	-135*	93.2	91.3	80.7
	52	-99.4*	-213*	-134*	87.2	83.4	87.8
Zn^{2+}	3	60	72.1	43.4	94.1	98.5	92.2
	28	-1020*	-714*	-937*	16.1	98.7	-31.6*
	52	-1040*	-1132*	-1486*	88.4	98.1	63.6

Tablo 4.5: 50 mg/L karışık metal içeren (toplam metal konsantrasyonu 250 mg/L) sentetik atıksuda immobilize edilmiş izolatların giderim verimi.

İzolatlar	Cr^{3+}	Cu^{2+}	Fe^{2+}	Ni^{2+}	Zn^{2+}
N1a	29.66±23.56	45.02±0.06	90.79±13.02	12.50±5.21	4.45±3.56
N3a	95.21±4.78	57.01±1.18	100±0.00	57.22±6.26	79.87±1.22
N4c	98.7±1.06	68.55±9.84	100±0.00	60.85±5.25	97.33±0.96
N5b	94.18±4.84	52.8±7.14	100±0.00	53±0.29	33.02±27.0

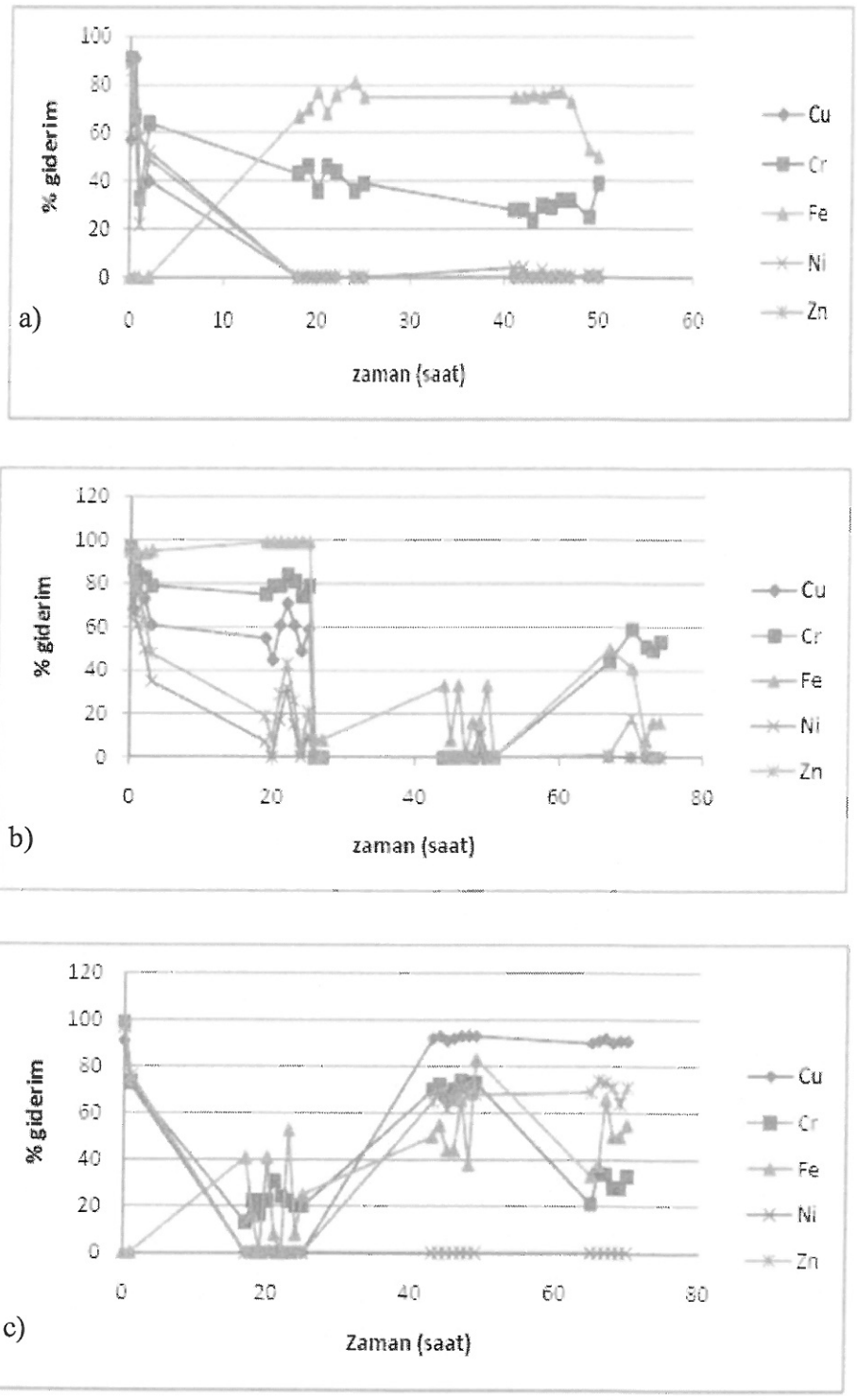
Metallerin çözünürlükleri pH ve diğer ortam koşullarından etkilenmektedir. Kesikli kültürlerde bakterilerin ürünleri ortam pH'sını değiştirmektedirler. Bazı metallerin özellikle demirin havadan kaynaklanan oksidasyonla çökmesi ve pH değişiminin oksidasyonu etkilemesi nedeniyle negatif verim değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.4). Negatif verim değerlerinin pH değişiminin yanısıra hücrelerin giderimin son günlerine doğru parçalanmasından ve metallerin kültür ortamına karışmasından da kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Hesaplamalar bakterilerle yapılan deney sonuçları bakteri içermeyen kontrol deneyi ile kıyaslanarak yapılmaktadır. Giderim aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

- % giderim=[C]k - [C]d / [C]k × 100
- [C]k = hücre içermeyen kontrol
- [C]d = hücre içeren deneyler

4.2.2.2. Sürekli Sistemde Metal Giderimi

Kesikli sistemde en yüksek giderim sağlayan izolatın N4c olduğu tespit edilmiştir. N4c'nin metallere dirençli olması ve metal varlığında üreme hızının yüksek olması nedeniyle giderim veriminin de yüksek olduğu düşünülmektedir. Reaktör materyal ve metod kısmında açıklandığı şekilde hazırlanmış ve reaktördeki polimerlere N4c izolatı immobilize edilmiştir. Sürekli sistemde ilk olarak karışım halinde metal içeren (her metalden 50 mg/L olacak şekilde) sentetik atıksudaki giderim incelenmiştir. Reaktör bir gün hücre immobilizasyonu için üç gün de giderim için toplam dört gün çalıştırılmıştır. Şekil 4.10 0,5ml/dk (a), 1 ml/dk (b) ve 2ml/dk (c) akış hılarında çalıştırılan reaktördeki biyogiderim verimlerini göstermektedir.

Reaktör ilk 0,5 ml akış hızında 20. saatte, 2 ml/dk akış hızında ise 40. saatte stabil olmuştur. 2 ml/dk akış hızında 65. saatte en yüksek giderim verimi krom için hesaplanmıştır. Yapılan deneylerde reaktörün stabil hale geçmesi için gerekli sürenin her işletimde farklı olduğu görülmüştür ve bu sürenin tam olarak akış hızına bağlı olmadığı söylenebilir. Örneğin 1 ml/dk akış hızıyla çalışıldığında (Şekil 4.10 b) reaktör 20. saat sonunda stabilitesini kaybetmiştir Reaktör oda sıcaklığında çalıştırıldığı için ısı değişimleri reaktör performansını etkileyebilir. Genel olarak sonuçlara bakıldığında nikel ve çinko gideriminin düşük olduğu görülmektedir. Ancak aşağıda açıklandığı gibi çinko ve nikel karışım içinde çökmeyen ve konsantrasyonları yüksek olan metallerdir. Giderim verimleri bu nedenle düşük görülmektedir. Krom gideriminin diğer metallere kıyasla daha yüksek olduğu söylenebilir. 2 ml/dk akış hızında (Şekil 4.10 c) bakır giderimi daha yüksek bulunmuştur. Reaktör 1 ml/dk akış hızında çalıştırıldığında giderim 25. saatte (Şekil 4.10 b) sonlanmış görünmektedir. Bu akış hızında da demir ve krom için yüksek giderim sağlanmıştır.



Şekil 4.10: Sürekli sistemde farklı akış hızlarında zamana bağlı biyogiderim verimi: a) 0,5ml/dk, b) 1 ml/dk, c) 2ml/dk.

Reaktör çıkışından seyreltme yapmadan agar üzerine ekim yapılarak tutuklu hücrelerin canlılığına bakılmıştır. Reaktör ilk çalıştırıldığında yapılan ekimlerde agarlı besiyeri üzerindeki hücreler sayılamayacak kadar çok üreme göstermişlerdir. Bakteri sayısı ikinci günde ve üçüncü günde sayılabilir düzeye inecek kadar

azalmıştır. Bu beklenen bir sonuçtur çünkü besiyerinde her metalden 50 mg/L olacak şekilde toplam 250 mg/L metal bulunmaktadır ve bu bakterilerin canlılıklarınını sürdürebilmeleri açısından yüksek bir konsantrasyondur. Üçüncü günde bakterilerin büyük bir kısmının öldüğü görülmüştür (agarlı besiyerinde yaklaşık 23 koloni sayılmıştır). Akış hızı artırıldığında bakteriler daha hızlı ölmektedirler, örneğin 2 ml/dk akış hızında birinci gün sonunda agar üzerindeki bakterilerin seyreldiği görülmektedir. Dolayısıyla 2. günden sonra ölü hücrelerle giderim yapılmaktadır. Bu durumda reaktör performansını artırmak için reaktörün daha uzun süre çalıştırılmasının mantıklı olmadığı düşünülmüştür.

Kesikli koşullarda yapılan deneylerde olduğu gibi sürekli sistemde yapılan deneylerde de kontrol olarak hücre içermeyen sentetik besiyeri kullanılmıştır. Giderim verimleri hesaplanırken reaktöre giren ve reaktörden çıkan besiyerindeki metal değerleri kullanılmıştır. 50 mg/L karışık metal içeren sentetik besiyeri reaktöre karıştırılmadan verilmiştir. Karıştırılmadan reaktöre gönderilen besiyerinde metallerin bir kısmının birkaç saat sonra çöktüğü görülmüştür.

Besiyeri karıştırıldığında partiküllerin pompa hortumlarını tıkadığı tespit edildiği için besiyeri çalkalanmamış ve büyük partiküllerin dibe çökmesi beklenmiştir. Kontrol olarak kullanılan veriler sentetik besiyeri çöktürüldükten sonra ölçülen metal miktarlarıdır, dolayısıyla çöken tüm metaller hesaplama dışında bırakılmıştır (Tablo 4.6).

Metaller arasında en fazla çökelti oluşturanlar demir, bakır ve kromdur. Bu nedenle özellikle demir için bir biyogiderimden bahsetmek doğru olmayabilir. Aşağıdaki tabloda altı farklı zamanda hazırlanmış karışık metal içeren sentetik besiyerinde ölçülen metal konsantrasyonları görülmektedir. Metaller sentetik besiyerine 50 mg/L olacak şekilde eklenmelerine karşın ICP ölçümlerinde çok farklı sonuçlar alınmıştır (Tablo 4.6). Metaller ortamda bulunan diğer metallerden, oksijen ve pH'dan fazlasıyla etkilendikleri için oksidasyon ve çökme bu parametrelere bağlı olarak değişim göstermektedir. ICP cihazı her kullanımda cihaz için özel olarak kullanılan saf standartlarla kalibre edilmektedir ve doğru ölçüm yaptığı görülmektedir.

Tablo 4.6: Sentetik atık suda ICP ile belirlenen metal iyonu konsantrasyonları.

Metaller	Sentetik atıksuda ICP ile ölçülen metal iyonu konsantrasyoları (mg/L)					
	1	2	3	4	5	6
Cu^{2+}	20.64	4.62	11.02	7.51	10.68	10.27
Cr^{3+}	13.81	1.01	5.00	3.11	7.11	5.14
Fe^{2+}	21.16	0.12	0.24	0.12	0.67	0.13
Ni^{2+}	37.06	18.53	33.34	25.60	39.63	31.46
Zn^{2+}	50.42	19.63	46.56	35.61	49.81	38.47

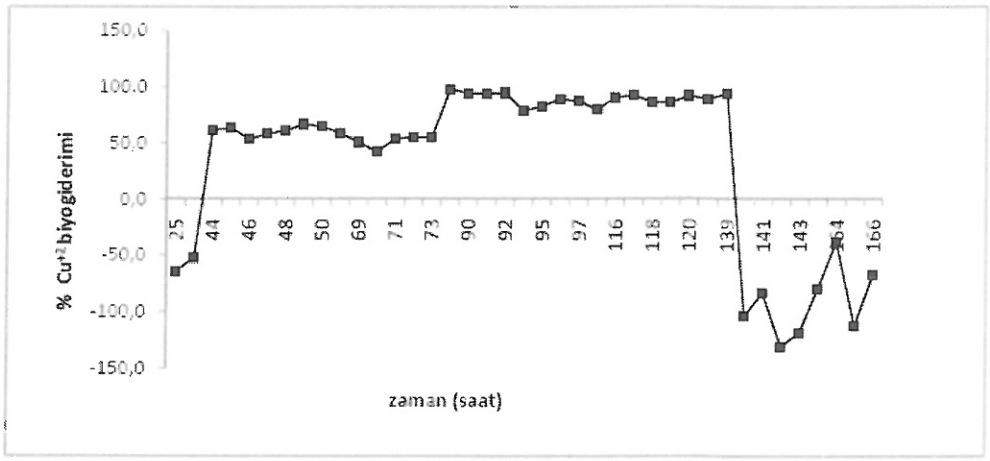
Besiyerinin dibinde görülen tortular ve bazı metallerin (demir, krom ve bakır) beklenen değerlerden çok daha düşük bulunması metallerin bir arada iken çöktüğünü kanıtlamaktadır.

Tablo 4.6'de çinko ve nikel miktarlarının 50 mg/L'e yakın olduğu görülmektedir. Bu sonuç besiyerine eklenen kimyasalaların ICP cihazı için kullanılan standartları kadar saf olmamasından kaynaklanabilir. Kullanılan metal stokları taze hazırlanmakta ve hazırlandıklarında berrak görünmektedirler. Metaller besiyerine ayrı ayrı eklendiklerinde demir dışındaki metallerde çökme problemi ile karşılaşılmamaktadır. pH'nın asidik değerlere düşürülmesi metallerin çökme problemini giderebilir düşüncesi ile pH 4,5-6,5 arasında dört pH'da sentetik besiyeri hazırlanmış ve metaller eklenmiştir. Ancak bu pH'larda da çökelme görülmüştür. Reaktörde immobilize olmuş hücrelerin üremelerinin desteklenmesi amacıyla besiyeri pH'sı çok fazla düşürülmemiştir ve nötr değerde bırakılmıştır. Tüm bu problemlerden dolayı reaktör çıkışından alınan verilerin kontrolleri ile kıyaslanarak bir verim hesabı yapılmasının reaktör performansını daha doğru yansıtacağı düşünülmüştür ve verim hesapları bu şekilde yapılmıştır. Tüm grafikler bu verilerle çizilmiştir.

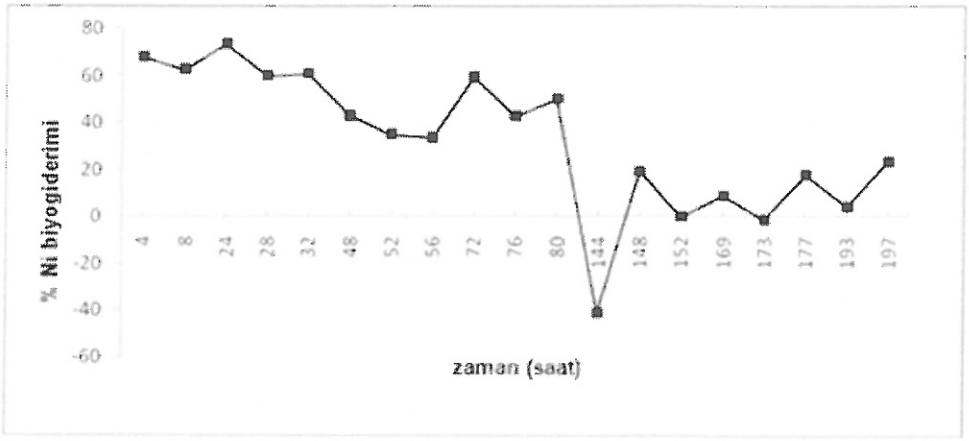
Sürekli sistemde tüm metalleri içeren sentetik atıksu ile yapılan çalışmalarda reaktördeki hücrelerin yavaş yavaş ölmeye başladıkları ve prosesin üçüncü gününde reaktörden canlı hücre çıkmadığı gözlenmiştir. Atıksuda beş farklı ağır metalin aynı anda bulunması hücrelerin daha çabuk ölmesine neden olarak reaktör performansının düşmesine neden olmuş olabilir. Hücreler ölü iken giderim verimi düşmektedir.

Aşağıdaki şekilde N4c'nin sürekli sistemde yalnızca 200 mg/L bakır içeren sentetik atıksudaki giderimi görülmektedir. Reaktörün yaklaşık bir hafta stabil olduğu görülmektedir. Bu reaktörün çıkışında bakılan canlı hücre miktarı bir hafta sonra azalmaya başlamış ve 11. günde sıfıra düşmüştür. Bakterilerin ilk üç gün %50

civarında daha sonraki günlerde ise % 80 üzerinde bakır giderimi yapabildikleri gözlenmiştir. Giderim 74. saatte % 98 olarak ölçülmüştür (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: N4c ile sürekli sistemde bakır giderimi (1 ml/dk akış hızı).

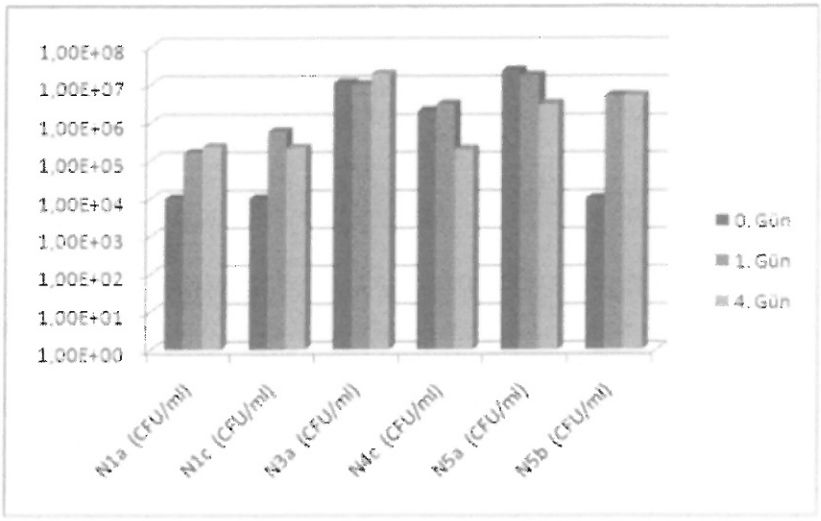


Şekil 4.12: N4c ile sürekli sistemde nikel giderimi (1 ml/dk akış hızı).

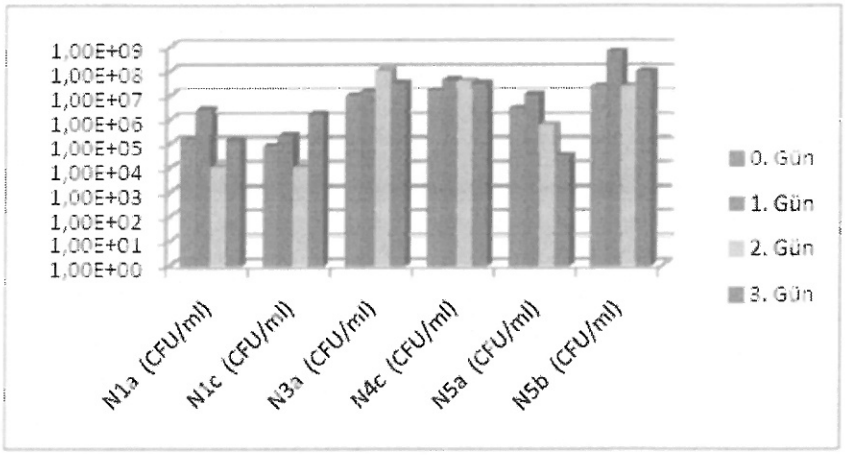
N4c ile nikel giderimi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir prosesin ilk gününde yaklaşık %60 civarında olan giderim verimi sonraki günlerde düşmeye başlamıştır, nikel giderimi için sistemin dört gün boyunca işletilebileceği görülmüştür (Şekil 4.12). Tek bir metal içeren sentetik atıksu ile sürekli sitemde daha verimli giderim sağlanmıştır. Metallerin karıştırılması giderim verimini düşürmüştür. Sürekli sistemde demir gideriminden söz etmek mümkün değildir. Demirin çözünürlüğü ortam koşullarından diğer metallere kıyasla daha fazla etkilenmektedir. Sürekli sistemde besiyeri tutuklu hücrelerin bulunduğu reaktör içinden geçerken demirin çözünürlüğü artmış ve negatif verim değerleri elde edilmiştir.

4.2.3. Atık Çamurda Giderim

Atık çamurda izolatların giderim verimlerine bakılmadan önce çamur ortamında üreyip üreyemedikleri kontrol edilmiştir. Evsel çamurda ve fabrika çamurunda izolatların üreme profilleri Şekil 4.13 ve 4.14'de görülmektedir. N1a, N1c, ve N5b evsel çamur ortamında sağlıklı bir şekilde üreyebilmişlerdir. Fabrika çamurunda ise üreme gösterebilen izolatlar N1c, N3a ve N5b olarak belirlenmiştir. N4c sayıca artış göstermese de fabrika çamurundaki bazı metallerin gideriminde etkin bulunmuştur. Bakterinin çamur ortamında sayıca artışı önemli bir parametredir ancak metali adsorblama veya absorblama kapasitesi çok daha önemlidir.



Şekil 4.13: Evsel çamurda bakterilerin üremeleri.



Şekil 4.14: Metal fabrikası çamurunda bakterilerin üremeleri.

Tablo 4.7: Solübilize edilmiş metal kaplama endüstrisi atığında izolatların metal giderimi.

	Steril edilmiş atık						Steril edilmemiş atık					
	Ni^{2+}		Cu^{2+}		Zn^{2+}		Ni^{2+}		Cu^{2+}		Zn^{2+}	
İzolatlar	1 s	72 s	1 s	72 s	1 s	72 s	1 s	72 s	1 s	72 s	1 s	72 s
N1a	99.5	100	86	100	96.6	100	100	31.6	99.1	93.6	100	95.7
N3a	100	43.3	100	27.1	100	85.6	0	56	14	0	38.9	54.2
N4c	100	0	100	0	100	62.9	100	100	100	98.9	94.9	94.2
N5b	95.1	47.8	100	95.8	99.2	91	86.5	72.5	99	0	99.8	0

- 0.saatte kontroldeki metal konsantrasyonları (mg/L)
- Steril atıkta: Cr^{3+}:0.14, Cu^{2+}:6.5, Fe^{2+}:0.09, Ni^{2+}:19.4, Zn^{2+}:11.5
- Steril edilmemiş atıkta: Cr^{3+}:0.13, Cu^{2+}:8.42, Fe^{2+}:0.16, Ni^{2+}:1.34, Zn^{2+}:36.7

Metal kaplama endüstrisi atığında N1a, N3a, N4c ve N5b izolatlarının 1. saat ve 72. saatte 30 °C'deki steril edilmiş ve steril edilmemiş atıktaki nikel, bakır, çinko giderimleri incelendiğinde 1. saatte giderimin daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Tablo: 4.7). Giderim değerleri kontroldeki inokulüm içermeyen giderimden çıkarılarak hesaplanmıştır.

Metal fabrikasından alınan kurutulmuş çamur sentetik besiyerinde çözülmüştür. Steril edilmiş çamurla yapılan deneylerde kontrol steril çamur içermekte dolayısıyla çamurdan kaynaklı bakteriler ortamda bulunmamaktadır. Herhangi bir mikroorganizmanın ekilmediği kontrol kültüründe 0. saatte ölçülen metal miktarları tablonun altında açıklama olarak verilmiştir Grafikteki verim hesaplamaları her saatte kontrol değerleri baz alınarak hesaplanmıştır. Tüm izolatlar ayrı ayrı veya karışım halinde aşılandıklarında Cr^{3+} ve Fe^{2+} metalleri için giderim stabil ve yüksek bulunmuştur, yüksek dalgalanmalar görülmemiştir. Ancak başlangıç konsantrasyonları yaklaşık 0.1 mg/L olan bu metaller için biyolojik giderimin başarısından söz etmek doğru olmaz. Hücreler karışım halinde ortama eklendiğinde giderim verimlerinde iniş çıkışlar gözlenmiştir.

N1a izolatının Fe^{2+} ve Cr^{3+} metallerinin dışında iyi giderim sağlayan bir izolat olmadığı görülmüştür. Tüm metaller dikkate alındığında ise sırasıyla N5b, N5a ve N3a steril edilmiş atık çamur ortamında en iyi giderim sağlayan izolatlar olarak karşımıza çıkmışlardır.

Sonuçlar incelendiğinde N5a'nın tüm koşullarda iyi giderim yaptığı görülmektedir. Giderim verimi diğer izolatlara kıyasla daha yüksek olan diğer bir izolat ise N5b'dir ancak steril çamurda N5b aktivitesi daha yüksek bulunmuştur. Steril edilmiş ve steril edilmemiş evsel çamur ile yapılan deneylerde metaller eklendiği anda çamura yapışmaları nedeniyle sıvı kısımdaki metal miktarları 0'a yakın bulunmuştur. Hesaplamalar kontroldeki metal miktarları göz önüne alınarak yapılmaktadır. Başlangıç konsantrasyonlarının 0'a yakın olduğu durumlarda ekilen bakterilerden kaynaklanan bir giderimden söz etmek mümkün değildir.

Metal fabrikasından alınan çamurda sıcaklık ve aşı miktarının Cu^{2+} ve Zn^{2+} giderimine etkisi N4c izolatı kullanılarak incelenmiştir (Tablo 4.8). Farklı iki sıcaklıkta (25 ve 30 °C) üç farklı aşı miktarı ile çalışılmıştır. N4c sentetik besiyeri ortamında yüksek giderim verimi sağlamıştır bu nedenle aşı miktarının bu izolatın çamur ortamındaki giderimine bir etki edip etmeyeceği merak edilmiştir. Bakır için N4c ile giderim 30 °C yüksek bulunmuştur. Aşı miktarının bakır giderimini artırdığı gözlenmiştir.

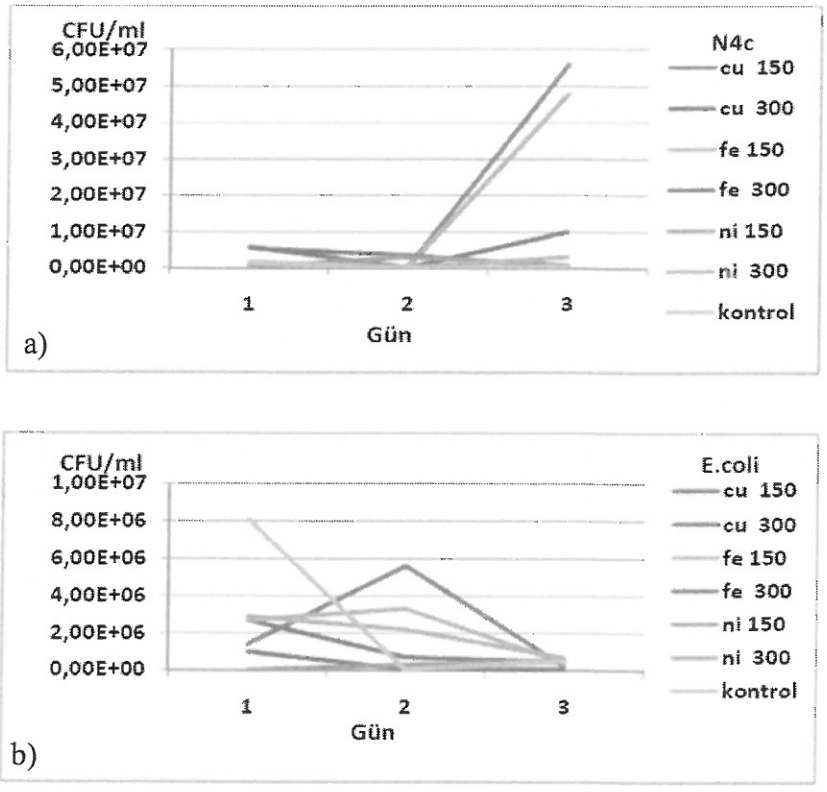
Çinko için ise giderim 24. saatte ancak % 6.5'e çıkabilmiştir, diğer koşullarda metalin çözünürlüğünün artmasından dolayı giderim verimi eksi değerlerde kalmıştır bu nedenle sonuçlar verilmemiştir. Çinko giderimi için daha uzun süreler inkübasyon yapılması durumunda giderim veriminin artacağı düşünülmektedir.

Tablo 4.8: N4c aşı miktarının ve sıcaklığın atık çamurda bakır giderim verimine etkisi.

Saat (h)	Sıcaklık (°C)	Konsantrasyon (mg/L)	Metal ve aşı miktarı	Giderim Verimi (%)
0.	25 °C	100	Cu 1/5	-
0.	25 °C	100	Cu 1*	-
0.	25 °C	100	Cu 5	-
0.	30 °C	100	Cu 1/5	18,6
0.	30 °C	100	Cu 1	3,3
0.	30 °C	100	Cu 5	15,1
24.	25 °C	100	Cu 1/5	21,8
24.	25 °C	100	Cu 1	0,9
24.	25 °C	100	Cu 5	30,8
24.	30 °C	100	Cu 1/5	33,1
24.	30 °C	100	Cu 1	44,4
24.	30 °C	100	Cu 5	46,1

*1= bakterinin 0,09 mg yaş ağırlığına denk gelmektedir.

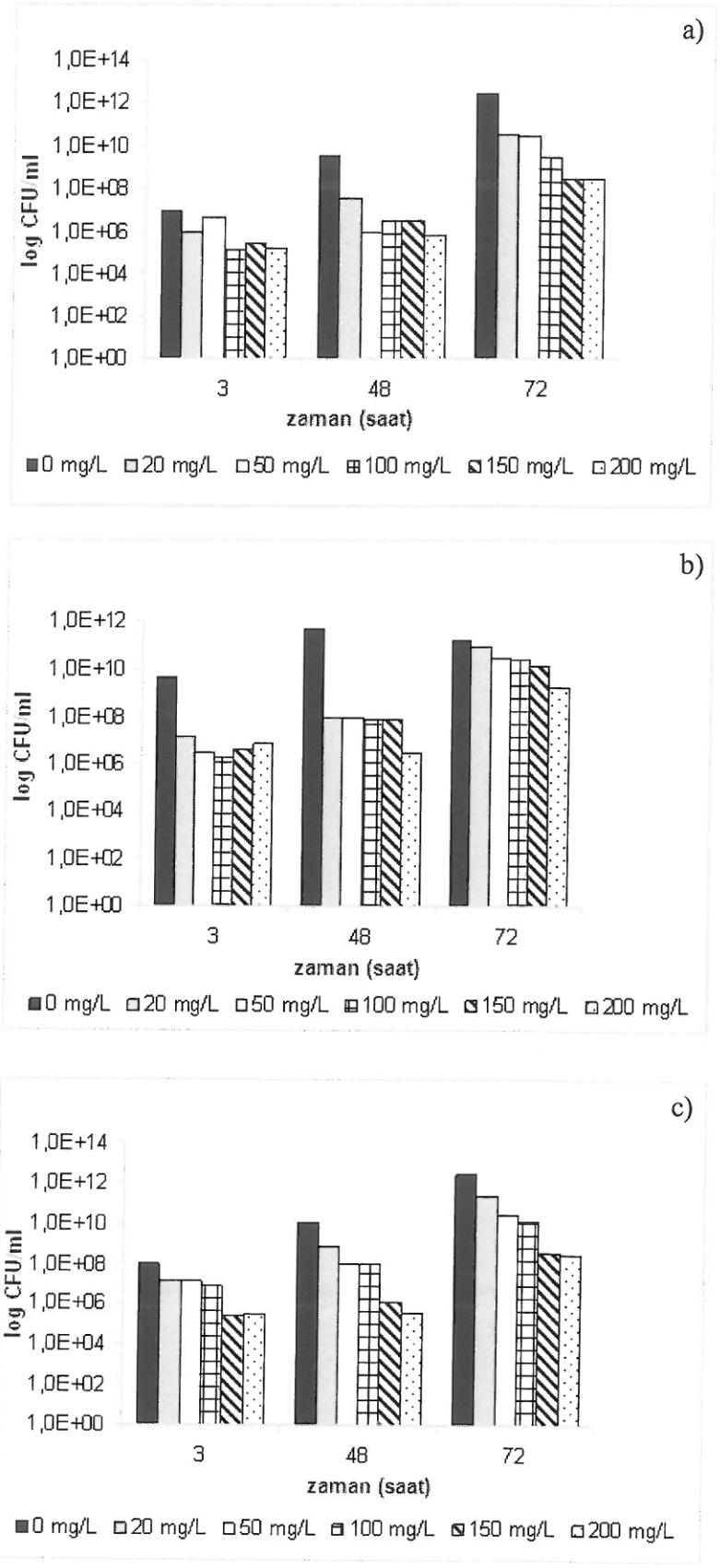
4.2.4. N1c, N5a ve N4c İzolatlarının Metal Dirençliliklerinin *E.coli* ile Kıyaslanması



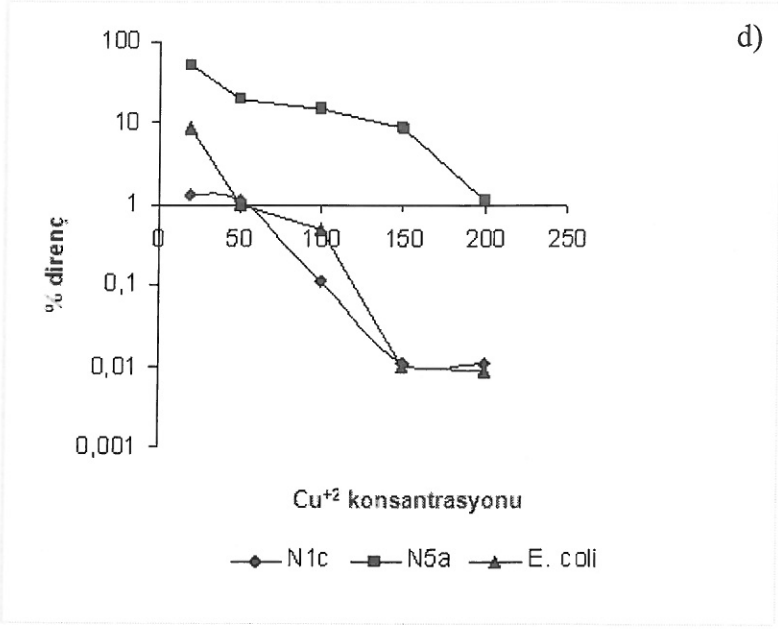
Şekil 4.15: a) N4c ve b) *E. coli*'nin metal dirençliliği.

Deneylerde en çok kullandığımız suş olan N4c'nin metal dirençliliği sentetik besiyeri ortamında ve 30 °C'de *E. coli* ile kıyaslanmıştır. N4c özellikle bakır ve demir varlığında inkübasyonun ilerleyen günlerinde sayıca artarken *E. coli*'nin artış göstermediği görülmektedir (Şekil 4.15). Ortamda bakır ve demir bulunması N4c'nin üremesini desteklediği anlaşılmaktadır. Tartışma ve sonuç kısmında da anlatıldığı gibi *E. coli* metallere oldukça dirençli bir bakteridir ve bakterinin kullandığı mekanizmaların araştırıldığı bir çok bilimsel çalışma vardır. Bu nedenle dirençlilik kıyaslaması amacıyla *E. coli* referans alınmıştır.

N4c izolatının yanısıra N1c ve N5a'nın bakıra olan dirençleri de *E. coli* ile kıyaslanmış ve aşağıdaki grafikteki sonuçlar elde edilmiştir. % direnç farklı bakır konsantrasyonlarında ve bakır içermeyen besiyerinde üretilen hücrelerin agarlı besiyerinde oluşturdukları koloniler sayılarak hesaplanmıştır. Bakır içeren besiyerlerinde üreyen bakterilerin oluşturdukları koloni sayısı düştükçe direnç değerleri de düşmektedir. N5a'nın *E. coli* ve N1c'ye kıyasla daha dirençli olduğu görülmüştür Grafikler belirtilen metal miktarlarında üretilen hücrelerin agar üzerinde oluşturdukları koloniler sayılarak çizilmiştir (Şekil 4.16 d). N1c, N5a ve *E.coli*'nin farklı bakır konsantrasyonlarında üreme ve canlılıkları sırasıyla Şekil 4.16'in a, b ve c grafiklerinde gösterilmiştir.



Şekil 4.16: Farklı Bakır konsantrasyonlarında N1c, N5a ve *E. coli*'nin canlılık ve dirençlerinin kıyaslanması.



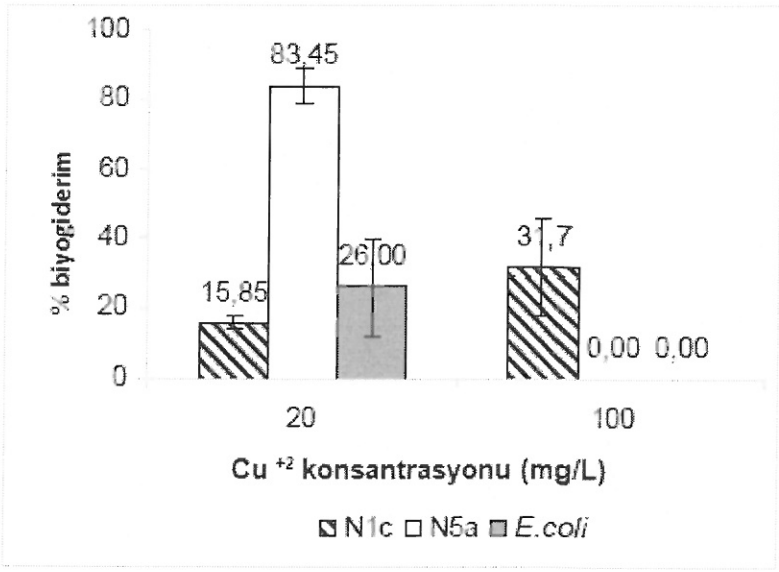
Şekil 4.16: Devam.

N1c ve N5a'nın zamana bağlı bakır dirençliliği ve metal giderim verimi *E. coli* ile LB besiyerinde 37 °C'de, 130rpm'de kıyaslanmıştır. Sonuçlar tablo 4.9'da verilmiştir. Tabloyu incelediğimizde N1c ve N5a hücrelerinin *E. coli*'ye kıyasla bakıra daha dirençli olduklarını görüyoruz. Bu tablo belirtilen miktarda bakır varlığında üretilmiş hücrelerin agarlı besiyeri üzerinde oluşturdukları koloniler sayılarak hazırlanmıştır. N5a 100 mg/L ve 200 mg/L bakıra *E. coli*'den sırasıyla 30 kat ve 125 kat daha dirençlidir.

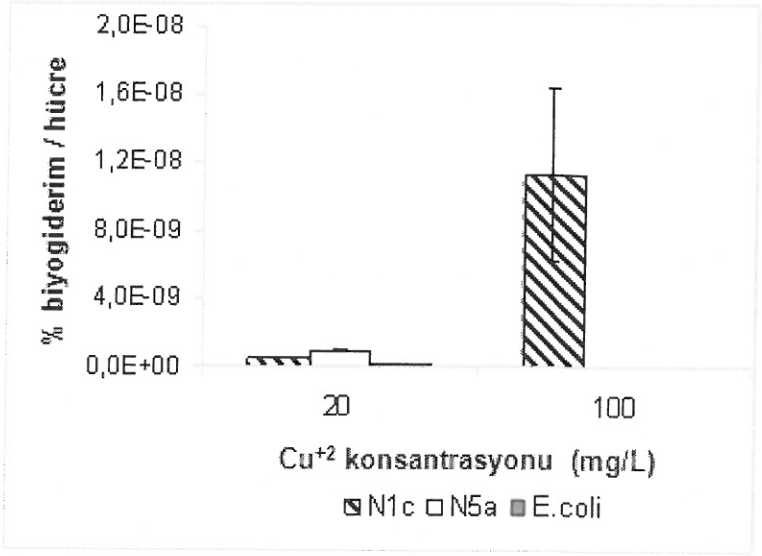
Tablo 4.9: N1c ve N5a izolatlarının bakıra dirençlerinin *E. coli* ile kıyaslanması.

	mg/L	% dirençlilik (3 h)	% dirençlilik (24 h)	% dirençlilik (72 h)
N1c	20	9,1	1,1	1,32
	50	45,8	0,02	1,12
	100	1,1	0,1	0,112
	150	2,6	0,08	0,0112
	200	1,5	0,01	0,0112
N5a	20	0,27	0,2	52,2
	50	0,05	0,18	19,3
	100	0,03	0,14	15
	150	0,08	0,13	8,75
	200	0,13	0,005	1,125
E. coli	20	13	7,2	8,57
	50	12	0,7	1
	100	7,2	0,82	0,5
	150	0,24	0,01	0,01
	200	0,33	0,003	0,009

Bu izolatların bakır için giderim verimleri ölçüldüğünde düşük bakır varlığında N5a'nın N1c ve *E. coli*'den daha yüksek giderim sağladığı, yüksek bakır varlığında ise N1c izolatının daha yüksek giderim yaptığı görülmüştür (Şekil 4.17). Bu deney sonucu bize dirençlilik ve giderim veriminin doğru orantılı seyretmediğini göstermiştir. Şekil 4.18'de ise hücre başına hesaplanan giderim verimleri görülmektedir. Bu sonuç N1c hücrelerinin *E. coli* ve N5a'ya kıyasla daha fazla bakır tutabildiğini göstermektedir.



Şekil 4.17: N1c, N5a ve *E. coli*'nin farklı bakır konsantrasyonlarındaki giderim verimleri.



Şekil 4.18: N1c, N5a ve *E.coli*'nin farklı bakır konsantrasyonlarında hücre başına düşen giderim verimleri.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma kapsamında Darıca ilçesi metal fabrikası yakınından alınan toprak numunelerinden elde edilen altı bakteri izolatının metal işleme fabrikası atık sularında bulunabilecek beş farklı metali giderme kapasiteleri incelenmiştir. Bakteriler yoğunluklarının artırılması amacıyla divinil benzene içerikli polimeri matrikse tutuklanmışlardır. Metaller sentetik atıksu ortamına karışık olarak eklenmişlerdir. Kesikli sistemde yapılan deneylerde bakterilerin metalleri ortama ekildikleri anda bir miktar bağladıkları ve inkübasyonun ilerleyen saatlerinde giderimde artış olduğu görülmüştür. İnkübasyonun üçüncü saatinde alınan verilere göre N5b tarafından Cr^{3+} giderimi % 99.2, N4c tarafından Cr^{3+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Ni^{2+} ve Zn^{2+} giderimi sırasıyla %98.8, % 81.3, %100, %69.9 ve %48 olarak hesaplanmıştır. Ancak atık çamur kullanıldığında N4c izolatı giderimde bu kadar başarılı olamamıştır.

Metal fabrikası atık çamurunda yapılan giderimde N5b en yüksek giderim sağlayan suş olmuştur. Bu suşu, N5a ve N3a izlemiştir. 16SrRNA dizi incelemesi sonucunda N5b'nin *Enterococcus durans*'a %99 oranında benzer olduğu görülmüştür. N5a *Pseudomonas stutzerii* türüne %98, N3a ve N4c ise *E. coli*'ye sırasıyla %98 ve %95 oranında benzerlik göstermektedir. Bir çok değişik ortamda yaşayabilen bir bakteri olan *E. coli* metallere dirençlidir [Ibrahim et al., 2008].

E. coli'nin 50 mg/L bakıra dirençli olduğunu belirtmiştir [Rensing and Grass, 2003]. *E. coli*'nin ise bakır toksisitesini atlatabilecek mekanizmalara sahip olduğunu rapor etmiştir.

N5a ve N1c suşlarının dirençlilikleri *E. coli* ile kıyaslanmış ve N5a'nın bakıra direncinin N1c ve *E. coli*'den 150 mg/L bakır içeren ortamda 875 kat fazla olduğu tespit edilmiştir. Sürekli sistemde N4c ile yapılan giderim çalışmalarında reaktör Cu^{2+}, Ni^{2+} ve Fe^{2+} için çalıştırılmıştır. 200 mg/L Fe^{2+} içeren ortamda demirin oksidasyondan dolayı çöktüğü gözlenmiş, reaktöre giren solüsyonda ise demirin çözünürlüğünün artması nedeniyle giderim verimli olmamıştır. Reaktörde bulunan hücrelerin pH'yı değiştirme olasılığı ve reaktörün içinde hava sirkülasyonunun daha düşük olması nedeniyle demir'in çözünürlüğünün artmış olabileceği düşünülmektedir. Bakır ve nikel sürekli sistemde tutuklu N4c hücreleri tarafından yüksek verimlilikte giderilmiştir. Özellikle bakır için yaklaşık altı gün boyunca % 90'lara varan giderim sağlanmıştır.

Metaller karıştırıldığı zaman reaktör verimli çalışmamıştır. 50 mg/L oranından karışık metal içeren besiyerinde hücrelerin çok daha kısa sürede öldükleri tespit edilmiştir. Bu reaktörün stabilitesinin bozulmasının en olası nedeni gibi görülmektedir.

Mikroorganizmalar tarafından metal giderimi organizmaya has yüzey özellikleri ve solüsyonun fizikokimyasal özelliklerinden (pH, sıcaklık, biyomas ve başlangıç metal konsantrasyonu gibi) etkilenmektedir [Sağ ve Kutsal, 1996], [Silva et al, 2008]. Tek bir metal iyonunun giderimine yönelik bir çok bilimsel çalışma vardır, ancak atıksular kompetisyon fenomenine neden olan bir çok çeşit metal iyonu içerebilirler. Metal çeşitliliğindeki artış metallerin çeşidine ve konsantrasyonuna bağlı olarak interaktif etkilerin ortaya çıkmasına neden olur [Saeed et al., 2005]. Örneğin demir çinkonun presipitasyonunu önemli ölçüde azaltır [Rao and Misra, 2004]. Bu çalışma kapsamında sürekli sistemde test edilen N4c suşunun sürekli sistemde bakır ve nikel giderimi için başarılı bir şekilde kullanılabileceği gösterilmiştir. Ancak yukarıda da bahsedildiği gibi metaller karıştırıldığında değişik interaktif etkiler ortaya çıkmakta ve giderim verimi düşmektedir. Bu nedenle giderim yapılacak atıksuda tek çeşit metal bulunması giderim verimini artıracak önemli bir etmen gibi görünmektedir. Metal işleme fabrikaları atık çamuruna eklenen izolatların giderimi artırması bu izolatların atıkçamurda hayatta kalabildikleri ve giderim sağlayabildiklerini göstemektedir. Dolayısıyla izolatlar (özellikle N5b) atık arıtımında metal giderimini artırmak amacıyla çamuru aşılamak için kullanılabilirler. Çalışma kapsamında N4c izolatının metal dirençliliği bakır, nikel ve demir için, N1c ve N5a izolatlarının metal dirençlilikleri ise sadece bakır metali için *E.coli* ile kıyaslanmıştır. İzolatların özellikle bakıra dirençlerinin *E. coli*'ye kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

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

Akar T., Kaynak Z., Ulusoy S., Yuvaci D., Ozsari G., Akar S. T., (2009), "Enhanced biosorption of nickel(II) ions by silica-gel-immobilized waste biomass: Biosorption characteristics in batch and dynamic flow mode", Journal of Hazardous Material, 163, 1134–1141.

Akay G., Erhan E., Keskinler B., Yer E., Keskinler D., (2004), "Phenol degradation in a fixed-bed bioreaktor using micro-cellular polymer-immobilized *Pseudomonas syringae*", Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 79, 195–206.

Arceivala S. J., (1976), "Wastewater treatment for pollution control", 2nd Edition, Tata McGraw Hill.

Bayhan Y. K., Keskinler B., Cakıcı A., Levent M., Akay G., (2001), "Removal of divalent heavy metal mixtures from waters by *Saccharomycess cerevisiae* using crosflow microfiltration", Water Research, 35, 2191-2200.

Beveridge T. J. and Murray R. G. E., (1980), "Sites for deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*", Journal Bacteriology, 141, 876–887.

Beveridge T. J., (1989), "The role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization", Annual Review of Microbiology, 43, 147–171.

Cabrero A., Fernandez S., Mirada F., Garcia J., (1998), "Effect of copper and zinc on activated sludge bacteria growth kinetics", Water Research, 32(5), 1355-1362.

Chatterjee S.K., Bhattacharjee I., Chandra G., (2010), "Biosorption of heavy metals from industrial waste water by *Geobacillus thermodenitrificans*", Journal of Hazardous Material, 175, 117–125.

Chen Y., Gu G., (2005), "Short-term batch studies on biological removal of chromium from synthetic wastewater using activated sludge biomass", Bioresource Technology, 96, 1722–1729.

Cossich E. S., Tavares C. R. G., Ravagnani T. M. K., (2003), "Biosorption of chromium (III) by *Sargassum sp.* Biomass", Process Biotechnology, 5(2), 133-141.

Çabuk A., Akar T., Koltuk Z., Şaşmaz S., (2007), "*Saccharomyces cerevisiae* Hücreleri ile Ağır Metal Giderimi ve Metal Toleransı", Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 05(3), 1-7.

Çepel N., (1997), "Temel Çevre Sorunları", 7.baskı, Tema yayınları.

Rao G. V., Misra V.N., (2004), "Mineral Processing Technology", 5th Edition, Allied Publishers Private Limited.

Rensing C., Grass G., (2003), "*Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment", Journal of Bacteriology, 27 (2-3), 197-213.

Saeed A., Iqbal M., Akhtar M., (2005), "Removal and recovery of lead(II) from single and multimetal (Cd^{3+}, Cu^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}) solutions by crop milling waste (black gram husk)", Journal of Hazardous Material, 117(1), 65-73.

Sağ Y., Tatar B., Kutsal T., (2003), "Biosorption of Pb(II) and Cu(II) by activated sludge in batch and continuous-flow stirred reactors", Bioresource Technology, 87, 27–33.

Sağ Y., Kutsal T., (1996), "Fully competitive biosorption of chromium(VI) and iron(III) ions from binary metal mixtures by *R. arrhizus* : Use of the competitive Langmuir model", Process Biochemistry, 31, 573-585.

Shin Y. H. Lee H-s., Lee Y-H., Kim J., Kim J.-D., Lee Y-W., (2009), "Synergetic effect of copperplating wastewater as a catalyst for the destruction of acrylonitrile wastewater in supercritical water oxidation", Journal of Hazardous Material, 167, 824-829.

Silva B., Figueiredo H., Quintelas C., Neves I.C., Tavares T., (2008), "Iron and chromium removal from binary solutions of Fe(III)/Cr(III) and Fe(III)/Cr(VI) by biosorbents supported on zeolites", Materials Science Forum, 587, 463-467.

Stoll A., Duncan J. R., (1997), "Implementation of a continuous-flow stirred bioreactor system in the bioremediation of heavy metals from industrial waste water", Environmental Pollution, 97(3), 247-251.

Straub K. L., Benz M., Schink B., (2001), "Iron metabolism in anoxic environments at near neutral pH", Fems Microbial Ecology, 12, 453-462.

Şengül F., (1991), "Endüstriyel Atıksuların Özellikleri ve Arıtılması", 7. baskı, Değişim Yayınları.

Tsezos M., Volesky B., (1981), "Biosorption of uranium and thorium", Biotechnology Bioengineering, 23, 583-604.

Volesky B., (2001), "Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century", Hydrometallurgy, 59, 203–16.

Yılmazer P., (2006), "Sulu Ortamlardan Ağır Metallerin Mikroorganizmalar Yoluyla Giderimi", Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi.

Wang J., Chen C., (2009), "Biosorbents for heavy metals removal and their future", Biotechnology, 27, 195–226.

Web 1, (2007), www.mikrobiyoloji.org/pdf/702070301.pdf, (Erişim tarihi: 09/05/2007).

Zajic J., Chiu V.S., (1972), "Recovery of heavy metals by microbes", Industrial Microbiology, 13, 91-100.

ÖZGEÇMİŞ

Binnur Kıratlı Herand, 1983 yılında Bulgaristan'ın Razgrat şehrinde doğdu. İlk ve orta öğretimini Sabiha Hanım okulunda, lise öğrenimini ise Atatürk Lise'sinde Sakarya'da tamamladıktan sonra, Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden 2007 yılında mezun oldu. 2010 yılında ise Gebze Yüksek Teknonoji Enstitüsü Çevre Mühendisliği Bölüm'ünde Yüksek Lisans öğrenimine başladı.

EKLER

EK 1: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

Ölmezoğlu E., Herand K. B., Öncel M. S., Tunç K., Özkan M., (2012), "Copper biyoremovalv by novel bacterial isolates and their identification by 16S rRNA gene sequence analysis", Turk Journal Biology, 36, 469-476.

Herand K. B., Şimşek K. E., Öncel M. S., Özkan M., (2013), "Continuous metal bioremoval by new bacterial isolates in immobilized cell reaktor", Annals of Microbiology, DOI 10.1007/s13213-013-0705-y.