

**T.C.
NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ATIK SULARDAN İZOLE EDİLEN *Pseudomonas* spp.'lar
İLE KURŞUN(II) VE NİKEL(II) AĞIR METALLERİNİN
GİDERİMİ**

**Tezi Hazırlayan
Berrin KELOĞLU**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Şahlan ÖZTÜRK**

**Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tez Önerisi**

**Ocak 2017
NEVŞEHİR**

**T.C.
NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ATIK SULARDAN İZOLE EDİLEN *Pseudomonas* spp.'lar
İLE KURŞUN(II) VE NİKEL(II) AĞIR METALLERİNİN
GİDERİMİ**

**Tezi Hazırlayan
Berrin KELOĞLU**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Şahlan ÖZTÜRK**

**Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tez Önerisi**

**Ocak 2017
NEVŞEHİR**

Doç.Dr. Şahlan ÖZTÜRK danışmanlığında **Berrin KELOĞLU** tarafından hazırlanan “**Atık Sulardan İzole Edilen *Pseudomonas spp.*'lar ile Kurşun (II) ve Nikel (II) Ağır Metallerin Giderimi** ” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

16/01/2017

JÜRİ

Başkan : Prof.Dr. Serkan YILMAZ

Üye : Doç.Dr. Şahlan ÖZTÜRK

Üye : Doç.Dr. Zeliha LEBLEBİCİ

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ~~23.01.2017~~.....tarih ve ~~06.31~~..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.


23/01/2017
Doç. Dr. Şahlan ÖZTÜRK
Enstitü Müdürü


TEZ BİLDİRİM SAYFASI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada yer alan bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu ve bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Berrin KELOĞLU


TEŞEKKÜR

“Atık sulardan izole edilen *Pseudomoans* spp.’lar ile Kurşun(II) ve Nikel(II) ağır metallerinin giderimi” konulu tez çalışmam boyunca çok kıymetli deneyimlerini benimle paylaşan, desteğinde ve iyi niyetinde sonsuz cömert olan çok değerli danışmanım ve hocam sayın Doç. Dr. Şahlan ÖZTÜRK’e;

Yüksek lisans eğitimimdeki destekleri için sayın hocam Doç. Dr. Zübeyde KUMBIÇAK’a;

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda olan sayın hocam Doç. Dr. Zeliha LEBLEBİCİ’ye;

Yüksek lisans eğitimimle birlikte birçok konuda yardım ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Neda BÖLÜKBAŞI, Süleyman YALÇIN, Sibel YELER, Gülsüm KAHRAMAN, Hilal KUM, Fatma SOLMAZ, Birsal İNCE ve Mehmet ŞARLI’ya;

Laboratuvar çalışmalarında vazgeçilmez yardımları için Uzman Enver Ersoy ANDEDEN ve Araştırma Görevlisi Ezgi KESKİN’e;

Tez çalışmalarım ve hayatıma renk katan sevgili yeğenim Semiha Mervener KALENDER’e;

Hayatımın her anında beni hep seven, destekleyen, kolaylıklar sağlamak için benim yerime de düşünen canım ailem; değerli babam Yemliha HANÇERLİ, sevgili annem Hacer HANÇERLİ; kardeşlerim Hatice ILGÜN; Ünal ILGÜN ve biricğim Berra ILGÜN’e;

Varlığı, desteği ve sevgisiyle bana güven veren, mutlu hissettiren sevgili eşim İlhan KELOĞLU’na, en büyük zenginliğim, sevginin bendeki anlamı olan çocuklarım Zehra Çisem, İsmail Çınar ve Abdullah Çağhan’a;

Kalpten teşekkürlerimi sunarım.

**ATIK SULARDAN İZOLE EDİLEN *Pseudomonas* spp.'lar İLE KURŞUN(II) VE
NİKEL(II) AĞIR METALLERİNİN GİDERİMİ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Berrin KELOĞLU

**NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Ocak 2017

ÖZET

Bu çalışmada atık su arıtma tesisinin çeşitli havuzlarından toplam 40 adet *Pseudomonas* spp. izole edilmiştir. İzolatlar tam otomatik identifikasyon cihazı kullanılarak tanımlanmıştır. İzolatlardan 22 tanesinin *Pseudomonas aeruginosa*, 11 tanesinin *Pseudomonas stutzeri*, 7 tanesinin de *Pseudomonas mendocina* olduğu tespit edilmiştir. Bu izolatlar 24 saat boyunca 50 ppm Kurşun(II), 50 ppm Nikel(II) içeren ve hiç metal içermeyen ayrı besiyerlerinde 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası üreme yoğunluklarına bakılarak her bir metal için en dirençli 5 adet izolat belirlenmiştir. Kurşun(II)'a direnç gösteren izolatlar *Pseudomonas aeruginosa* BK1, *Pseudomonas aeruginosa* BK3, *Pseudomonas aeruginosa* BK4, *Pseudomonas aeruginosa* BK14, *Pseudomonas stutzeri* BK37 iken; Nikel(II)'e direnç gösterenler ise *Pseudomonas stutzeri* BK8, *Pseudomonas aeruginosa* BK21, *Pseudomonas stutzeri* BK23, *Pseudomonas stutzeri* BK32 ve *Pseudomonas aeruginosa* BK40 izolatlarıdır. Bu izolatlar metal toleranslarının tespiti amacıyla tekrar 50ppm, 100 ppm, 200 ppm ve 400 ppm Kurşun(II) ve Nikel(II) içeren ayrı besiyerlerinde 24 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılarak % ölüm ve LC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Bu çalışmanın sonucuna göre metal toleransı en yüksek olan izolatlar Kurşun(II) için *Pseudomonas aeruginosa* BK14; Nikel(II) için *Pseudomonas stutzeri* BK23 olduğu tespit edilmiştir. Dirençli izolatlar LC₅₀ değerlerinde metal içeren besiyerlerinde 37 °C'de inkübasyona bırakılmış ve sırası ile 10., 30. dakikalarda ve 1., 2., 4., 8., 12., 16., 20. ve 24. saatlerde biyobirikim deneyleri yapılmıştır. Metallerin giderimi, hücre yüzeyine adsorbsiyon ve hücre içine alınım şeklinde gerçekleşmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* BK14 izolatı ile 204,30 ppm

Kurşun(II) nun % 56 sı hücre yüzeyinde olmak üzere toplamda % 84 giderim sağlanmıştır. *Pseudomonas stutzeri* BK23 izolatu ile 186,21 ppm Nikel(II)'in % 47 si hücre yüzeyinde olmak üzere toplamda %76 giderim gerçekteşmiştir. Elde edilen sonuçlara göre her iki metal için de giderim daha çok hücre yüzeyine tutunma yolu ile olmuştur. Bu çalışma ile ilk defa Kurşun(II) ve Nikel(II)'e dirençli canlı izolatların ağır metal giderim mekanizması hücre yüzeyine tutunma ve hücre içine alınıml şeklinde mukayeseli olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Kurşun(II), Nikel(II), Ağır Metal, Biyobirikim, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*,
Tez danışmanı: Doç. Dr. Şahlan ÖZTÜRK
Sayfa adedi: 73

**REMOVAL OF THE HEAVY METALS LEAD(II) AND NICKEL(II) WITH
Pseudomonas spp. ISOLATED FROM WASTE WATER**

(M. Sc. Thesis)

Berrin KELOĞLU

**NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ UNIVERSITY GRADUATE SCHOOL OF
NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

January 2017

ABSTRACT

In this study, 40 *Pseudomonas* spp. were isolated from various pools of wastewater treatment plant. Isolates were identified by using fully automatic identification device. 22 of isolates were determined as *Pseudomonas aeruginosa*, 11 of isolates were determined as *Pseudomonas stutzeri*, and 7 of isolates were determined as *Pseudomonas mendocina*. Isolates were incubated at different media containing 50 ppm Lead (II), 50 ppm Nickel (II) and without metal for 24 hours at 37 °C. After incubation according to growth densities, the most resistant five isolates for each metal were determined. Isolates resistant to Lead(II) were *Pseudomonas aeruginosa* BK1, *Pseudomonas aeruginosa* BK3, *Pseudomonas aeruginosa* BK4, *Pseudomonas aeruginosa* BK14, and *Pseudomonas stutzeri* BK37, whereas isolates resistant to Nickel(II) were *Pseudomonas stutzeri* BK8, *Pseudomonas aeruginosa* BK21, *Pseudomonas stutzeri* BK23, *Pseudomonas stutzeri* BK32 ve *Pseudomonas aeruginosa* BK40. For the determination of metal tolerance, isolates were incubated in separate media containing 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm and 400 ppm Lead (II), and Nickel (II), for 24 hours at 37 °C, and the % of death and LC₅₀ values were calculated. According to results of this study, it was determined that isolates highest metal tolerance for Lead (II) and Nickel (II) were *Pseudomonas aeruginosa* BK14 and *Pseudomonas stutzeri* BK23, respectively. Resistant isolates were incubated in metal containing media at LC₅₀ values at 37 °C and bioaccumulation experiments were carried out at 10th, 30th minute and 1st,

2nd, 4th, 8th, 12th, 16th, 20th and 24th hours. Removal of the metals took place as adsorption to the cell surface and accumulation into the cell. *Pseudomonas aeruginosa* BK14 strain removed 84% of 204,30 ppm Lead (II) in total, as which 56 % of on the cell surface. *Pseudomonas stutzeri* BK23 strain removed the 76% of 186,21 ppm Nickel (II) in total, as which 47 % of on the cell surface. According to the results, removal of both metals was mainly due to the adhesion to the cell surface. In this study, the mechanism of heavy metal removal of lead (II) and nickel (II) resistant living isolates has been evaluated comperatively as cell surface adhesion and incorporation into the cell for the first time.

Keywords: Lead(II), Nickel(II), Heavy Metal, Bioaccumulation, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, .

Thesis Supervisor: Assoc. Prof. Şahlan ÖZTÜRK

Page Number: 73

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|-----------|
| 1.BÖLÜM..... | 1 |
| GİRİŞ | 1 |
| 2.BÖLÜM..... | 3 |
| GENEL BİLGİLER..... | 3 |
| 2.1 Atık Su..... | 3 |
| 2.2 Atık Su Arıtma Yöntemleri..... | 5 |
| 2.2.1. Fiziksel temel işlemler | 5 |
| 2.2.2. Kimyasal temel işlemler | 6 |
| 2.2.3 Biyolojik işlemler | 6 |
| 2.3 Ağır Metaller | 6 |
| 2.3.1 Kurşun | 9 |
| 2.3.1.1.Kurşun kirliliği | 10 |
| 2.3.1.2.Kurşun toksisitesi..... | 11 |
| 2.3.2 Nikel..... | 13 |
| 2.3.2.1 Nikel kirliliği | 13 |
| 2.3.2.2 Nikel toksisitesi | 14 |
| 2.4. Atık Sulardan Ağır Metal Giderim Yöntemleri..... | 14 |
| 2.4.1.Hiperfiltrasyon (ters ozmoz) | 15 |
| 2.4.2. Ultrafiltrasyon..... | 15 |
| 2.4.3. Elektrodializ..... | 15 |
| 2.4.4. İyon değişimi | 15 |
| 2.4.5. Kimyasal çöktürme | 16 |
| 2.4.6. Fitoremediasyon | 16 |
| 2.4.7.Adsorbsiyon | 16 |
| 2.4.8. Biyosorpsiyon | 17 |
| 2.4.8.1. Biyosorpsiyon mekanizmaları..... | 18 |
| 2.4.8.2.Biyobirikim | 21 |
| 2.4.8.3. Biyosorpsiyonda kullanılan mikroorganizmalar | 23 |
| 2.5. <i>Pseudomonas spp.</i>..... | 24 |

| | |
|---|-----------|
| 3. BÖLÜM..... | 28 |
| MATERYAL - METOD | 28 |
| 3.1 Materyal | 28 |
| 3.1.1 Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar..... | 28 |
| 3.1.2. <i>Pseudomonas</i> spp. üretimi, muhafazası ve metal deneylerinde kullanılan besiyerleri | 28 |
| 3.1.3 Çalışmada kullanılan metaller | 29 |
| 3.2. Metot..... | 29 |
| 3.2.1. Atık sudan <i>Pseudomonas</i> spp. izolasyonu | 29 |
| 3.2.2. İzolatların muhafazası..... | 30 |
| 3.2.3. Metallerin sulu çözeltilerinin hazırlanması | 30 |
| 3.2.4. İzolatların metal toleranslarının tespiti | 30 |
| 3.2.5. Seçilen izolatların belirlenen metal derişimlerdeki direnç tespiti | 31 |
| 3.2.6. LC50 tayin metodu | 32 |
| 3.2.7. Biyobirikim deneyleri | 32 |
| 3.2.7.1 Besiyerinde kalan metal miktarı | 32 |
| 3.2.7.2. Hücre yüzeyinde emilim-tutunma | 33 |
| 3.2.7.3. Hücre içinde birikim | 33 |
| 3.2.8. İstatistiksel veri | 33 |
| 4.BÖLÜM..... | 34 |
| BULGULAR | 34 |
| 4.1. Atık Sulardan <i>Pseudomonas</i> spp. İzolasyonu | 34 |
| 4.2. İzolatların Tanımlanması | 35 |
| 4.3. İzolatların Metal Toleranslarının Tespiti | 37 |
| 4.4. LC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi | 39 |
| 4.5. Biyobirikim Deneyleri..... | 46 |
| 4.5.1 Kurşun(II) biyobirikimi | 46 |
| 4.5.2. Nikel(II) biyobirikimi | 49 |
| 5. BÖLÜM..... | 52 |
| TARTIŞMA VE SONUÇ..... | 52 |
| KAYNAKLAR | 61 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 73 |

TABLolar LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Tablo 2.1. Atık suların atık su altyapı tesislerine deşarjında öngörölen atık su standartları..... | 4 |
| Tablo 2.2. Tehlikeli Ağır Metallerin İnsan Sağlığına Etkileri | 8 |
| Tablo 2.3. <i>Pseudomonas</i> spp. Tanımlanmasında Kullanılan Temel Kriterler. | 25 |
| Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve çözelti derişimleri..... | 29 |
| Tablo 3.2. Kullanılan metaller, tuz bileşiklerinin kimyasal formöller ve moleköl ağırlıkları. | 29 |
| Tablo 4.1. İzolat numaraları, su numunesinin alındığı havuz, gram boyama ve tanımlama sonuçları. | 35 |
| Tablo 4.2. İzolatların 50 ppm Kurşun(II) ve Nikel(II) derişimindeki % ölümler. | 38 |
| Tablo 4.3. Kullanılan metallere göre izolatlara ait LC ₅₀ değerleri..... | 45 |

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Şekil 2.1. Endüstriyel sistem ve atıklar..... | 7 |
| Şekil 2.2. Kurşuna maruziyet kaynakları | 11 |
| Şekil 2.3. Kurşunun yetişkin ve çocuklar üzerinde etkisi | 12 |
| Şekil 2.4. Biyosorpsiyon mekanizmalarının sınıflandırılması | 19 |
| Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda Kurşun (II) metaline maruz bırakılan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK1 izolatının % ölüm değerlerinin zamana göre değişimi | 40 |
| Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda Kurşun (II) metaline maruz bırakılan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK3 izolatının % ölüm değerlerinin zamana göre değişimi | 40 |
| Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda Kurşun (II) metaline maruz bırakılan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK4 izolatının % ölüm değerlerinin zamana göre değişimi | 41 |
| Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda Kurşun (II) metaline maruz bırakılan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK14 izolatının % ölüm değerlerinin zamana göre değişimi | 41 |
| Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlarda Kurşun (II) metaline maruz bırakılan <i>Pseudomonas stutzeri</i> BK37 izolatının % ölüm değerlerinin zamana göre değişimi | 42 |
| Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda Nikel (II) metaline maruz bırakılan <i>Pseudomonas stutzeri</i> BK8 izolatının % ölüm değerlerinin zamana göre değişimi | 42 |
| Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda Nikel (II) metaline maruz bırakılan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK21 izolatının % ölüm değerlerinin zamana göre değişimi | 43 |
| Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlarda Nikel (II) metaline maruz bırakılan <i>Pseudomonas stutzeri</i> BK23 izolatının % ölüm değerlerinin zamana göre değişimi | 43 |
| Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlarda Nikel (II) metaline maruz bırakılan <i>Pseudomonas stutzeri</i> BK32 izolatının % ölüm değerlerinin zamana göre değişimi | 44 |
| Şekil 4.10. Farklı konsantrasyonlarda Nikel (II) metaline maruz bırakılan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK40 izolatının % ölüm değerlerinin zamana göre değişimi | 44 |
| Şekil 4.11. Besiyerinde kalan Kurşun(II) miktarının % oranının zamana göre değişimi .. | 7 |

| | |
|---|----|
| Şekil 4.12. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK14 izolatının hücre yüzeyine adsorbe olan | |
| Kurşun(II) miktarının % oranının zamana göre değişimi | 48 |
| Şekil 4.13. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK14 izolatının hücre içine aldığı | |
| Kurşun(II) miktarının % oranının zamana göre değişimi | 48 |
| Şekil 4.14. Kurşun(II) biyobirikiminin bölgesel oranları | 49 |
| Şekil 4.15. Besiyerinde kalan Nikel(II) miktarının % oranının zamana göre değişimi .. | 50 |
| Şekil 4.16. <i>Pseudomonas stutzeri</i> BK23 izolatının hücre yüzeyine adsorbe olan | |
| Nikel(II) miktarının % oranının zamana göre değişimi | 50 |
| Şekil 4.17. <i>Pseudomonas stutzeri</i> BK23 izolatının hücre içine aldığı Nikel(II) | |
| miktarının % oranının zamana göre değişimi | 51 |
| Şekil 4.18. Nikel(II) biyobirikiminin bölgesel oranları | 51 |

RESİMLER LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Resim 2.1. Galen..... | 9 |
| Resim 2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bakterisinin mikroskop görüntüsü (x1000)..... | 24 |
| Resim 2.3. Koyun kanlı agarda <i>Pseudomonas aeruginosa</i> koloni morfolojisi..... | 26 |
| Resim 3.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK40 numaralı izolatın gram boyanmış mikroskop görüntüsü..... | 30 |
| Resim 3.2. Mikroplate okuyucu (IVYMAN 2100-C)..... | 31 |
| Resim 4.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK1 izolatının Nutrient agardaki koloni morfolojisi | 34 |
| Resim 4.2 VITEK 2 Compact 30 (Biomerieux) | 35 |
| Resim 4.3. McFarland cihazı, Densicheck plus (Biomerieux) | 37 |
| Resim 4.4. Metal tolerans tespiti çalışmasında <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK14 ve <i>Pseudomonas stutzeri</i> BK23 izolatlarına ait mikroplate görüntüsü..... | 45 |

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

| | |
|--|--|
| °C | Santigrat |
| mg/L | Miligram/Litre |
| BOİ | Biyokimyasal Oksijen İhtiyacı |
| SO ₄ | Sülfat |
| S | Kükürt |
| N | Azot |
| P | Fosfor |
| CN | Siyanür |
| Pb | Kurşun |
| Cd | Kadmiyum |
| Cr | Krom |
| Hg | Civa |
| Cu | Bakır |
| Ni | Nikel |
| Zn | Çinko |
| Sn | Kalay |
| Ag | Gümüş |
| Cl | Klor |
| K | Potasyum |
| MBAS | Metilen mavisi ile reaksiyon veren yüzey aktif maddeleri |
| KOİ | Kimyasal Oksijen İhtiyacı |
| NH ₃ | Amonyak |
| NO ₃ | Nitrat |
| ABD | Amerika Birleşik Devletleri |
| g/cm ³ | Gram/santimetreküp |
| PbS | Kurşunsülfür |
| PbCO ₃ | Kurşunkarbonat |
| PbSO ₄ | Kurşunsülfat |
| [(CH ₃ CH ₂) ₄ Pb] | Kurşun Tetraetil |

| | |
|------------------|--|
| GİS | Gastrointestinal Sistem |
| TRK | Teknik Konsantrasyon Göstergesi |
| DNA | Deoksiribonükleik asit |
| IARC | Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı |
| Ppm | Milyonda bir |
| kJ/mol | Kilojoul/mol |
| LC ₅₀ | Yüzde ellisini öldüren konsantrasyon |
| EPS | Ekzopolisakkarit |
| RNA | Ribonükleik asit |
| rRNA | Ribozomal Ribonükleik asit |
| sp./spp | Taksonomide bir cinse ait tüm türler |
| UV | Ultraviyole |
| G | Gram |
| ml | Mililitre |
| Rpm | Revolutions per minute/dakikadaki devir sayısı |
| mM | Milimolar |
| EDTA | Etilendiamin Tetraasetik Asit |
| µm | Mikrometre |
| M | Molar Nitrik asit |
| HNO ₃ | Nitrik asit |
| SPSS | Statistical Package for Social Sciences |
| ICP-MS | İndüktif Olarak Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrofotometresi |
| Ark. | Arkadaşlar |

1.BÖLÜM

GİRİŞ

Su bütün canlılar için hayati öneme sahiptir. Dünyadaki hızlı nüfus artışı, endüstriyel kuruluşların artması ve tarımsal faaliyetler sonucu temiz su kaynaklarında ciddi bir azalma yaşanmaktadır. Yapılan araştırmalar bugünkü koşulların değişmeden devam etmesi durumunda, dünyadaki temiz ve kullanılabilir su kaynaklarının tükeneceğini; şu anda dahi dünya nüfusunun %40' ını barındıran 80 ülkenin temiz su sıkıntısı çektiğini göstermiştir [1].

Özellikle ağır metal endüstrilerinin atıkları ile toprağın ve suyun kirlenmesi, havaya karışan zararlı maddelerin yağmurlarla suya ve toprağa karışması, evsel atık suların doğaya karışması, denize dökülen petrol ve katı atıkların artması ve buna benzer birçok örnek, su kirliliğinin artık doğanın dengesini bozuyor olduğunun birer kanıtıdır. Gelecekteki su yokluğunun önüne geçmek ve doğanın dengesini korumak için, su arıtımının verimli şekilde yapılması gerekmektedir.

Ağır metal iyonu içeren atık suların arıtımını; işletmenin kapasitesi, atık suyun miktarı ve özellikleri, işletmedeki arıtma tesisi ve kullanılan yöntemler etkilemektedir. Birçok canlı için toksik olan ağır metallerin atık sudan gideriminde farklı yöntemler kullanılmaktadır [2]. Sudan metal gideriminde kullanılan çöktürme, buharlaştırma, iyon değişimi ve membran yardımı ile ayırma gibi yöntemlerin pahalı ve zahmetli olması bu alanda kullanılacak alternatif çözümler arayışına neden olmaktadır [3].

Son yıllardaki endüstriyel ve teknolojik gelişmeler sonucu ortaya çıkan atık maddelerin çevreye olan olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak veya azaltmak için, atık maddelerin gideriminde kullanılan klasik yöntemler yerine biyoteknolojik yöntemler tercih edilmektedir. Bu uygulamalar ile atık maddelerin geri kazanımı, çevre dostu teknolojilerin temel hedefi haline gelmiştir. Bu şekilde; hem endüstriyel atık maddelerin biyoteknolojik yöntemler ile geri kazanılması ve tekrar ham madde olarak kullanılması gerçekleştirilecek; hem de tarım, kozmetik, sağlık, petrol endüstrisi ve çevre teknolojisi gibi alanlarda değerlendirilmesi sağlanmış olacaktır [4].

Yaşayan veya yaşamayan mikroorganizmalar, seçici olarak, atık sulardaki inorganik iyonları biriktirme ve ayırmada yüksek bir potansiyele sahiptirler [5].

Yapılan bilimsel çalışmalarda, mikroorganizmalar kullanılarak ağır metallerin giderimi önemle üzerinde durulan bir mekanizma haline gelmiştir. Toprakta ve atık suda yaygın olarak bulunan *Pseudomonas* cinsi bakteriler toprağın doğal yollardan temizlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Özellikle çevre kirliliği bakımından ciddi risk oluşturan kirletici faktörlerin giderimindeki kabiliyetleri sebebiyle çevre biyoteknolojisine yönelik çalışmalarda *Pseudomonas* spp.'lar tercih edilmektedir. Bu çalışmada da atık sudan izole edilen 40 adet *Pseudomonas* cinsi bakteri kullanılmış ve ağır metal giderimindeki kapasiteleri üzerine deneyler yapılmıştır.

Evsel ve endüstriyel olarak kullanılan suyun arıtılmadan çevreye deşarjının önüne geçecek önlemler alınmalı ve bu konuda bizden sonraki nesillerin refahı için geleceğ yatırım yapılmalıdır. Bu çalışmada atık sudan izole edilen *Pseudomonas* spp.'lar ile insanlar ve diğ er canlılar için toksik etkiye sahip olan Kurşun(II) ve Nikel(II) metallerinin giderim mekanizması incelenerek; ağır metaller ile kirlenen suların arıtımına sunulabilecek alternatif çözümlere katkı sağlamak amaçlanmıştır.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçların, endüstriyel ve evsel atık sulardaki ağır metal giderimi uygulamalarında yaşanan sorunların çözümüne ve atık suların arıtıldıktan sonra çevreye deşarj edilmesi için yeni metotların geliştirilmesine yardımcı olması hedeflenmektedir.

2.BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

2.1 Atık Su

Sanayi ve endüstri kuruluşları, kanalizasyon sistemleri, enerji santralleri, tarım ve hayvancılık gibi faaliyetler sonucu oluşan organik, inorganik ve radyoaktif maddeler ile mikroorganizmalar varlığı sonucu kirlenmiş, kalitesi düşük, kullanımı mümkün olmayan su, atık su olarak tanımlanmaktadır. Atık sular aynı zamanda yer altı sularındaki, akarsulardaki, göllerdeki ve denizlerdeki kirlenmenin en önemli kaynaklarından biridir. Atık sularda kirlenmeyi oluşturan etmenler genel olarak; organik maddeler, ağır metal bileşikler, siyanür, aromatik ve alifatik hidrokarbonlar, deterjanlar, azot, fosfor, inorganik maddeler ve mikroorganizmalar şeklinde sıralanabilir [6].

Atık sularda fiziksel, biyolojik ve kimyasal içerikli bozulmalar görülmektedir. Fiziksel kirliliğin göstergeleri renk, koku, toplam katı madde ve bulanıklık şeklindedir. Biyolojik kirliliği organik atıkların etkisiyle su kaynaklarında üreyen algler, funguslar ve bakteriler oluşturmaktadır. Bu canlılar zamanla ortamdaki oksijen, karbon, azot gibi maddeleri tüketmektedirler. Kimyasal kirlilik ise zamanla suda biriken ağır metallere, biyolojik olarak parçalanmayan veya parçalanamayan organik madde kalıntılarından ve inorganik atıklardan oluşmaktadır. Bu kirlenmeler sadece sularla sınırlı kalmayıp besin zinciri yoluyla gıdalara kadar ulaşmaktadır. Ayrıca alıcı ortamda biriken kirleticiler canlılar üzerinde toksik etkiye neden olabilmektedir [7].

Bu kirleticileri içeren atık suların kullanım amacına göre su kirliliği kontrol yönetmeliğinde belirtilen standartlara uygunluğunun kontrol edilmesi ve kirletici içeriğinin buna bağlı olarak istenilen seviyeye düşürülmesi gerekmektedir. Bu nedenle atık suların kirleticiler ile değişen fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin geri kazandırılabilmesi ve alıcı ortamda zararlı etki oluşturmayacak hale getirilebilmesi için arıtılması gerekmektedir [6].

Tablo 2.1. Atık suların atık su altyapı tesislerine deşarjında öngörülen atık su standartları [8]

| PARAMETRE | KANALİZASYON SİSTEMLERİ TAM ARITMA İLE SONUÇLANAN ATIK SU ALTYAPI TESİSLERİNDE | KANALİZASYON SİSTEMLERİ DERİN DENİZ DEŞARJI İLE SONUÇLANAN ATIK SU ALTYAPI TESİSLERİNDE |
|---|--|---|
| Sıcaklık (°C) | 40 | 40 |
| pH | 6,5-10,0 | 6,0-10,0 |
| Askıda katı madde (mg/L) | 500 | 350 |
| Yağ ve gres (mg/L) | 250 | 50 |
| Katran ve petrol kökenli yağlar (mg/L) | 50 | 10 |
| Kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) (mg/L) | 4000 | 600 |
| Biyokimyasal Oksijen İhtiyacı (BOİ ₅) (mg/L) | - | 400 |
| Sülfat (SO ₄ ⁻) (mg/L) | 1700 | 1700 |
| Toplam sülfür (S) (mg/L) | 2 | 2 |
| Fenol (mg/L) | 20 | 10 |
| Serbest klor (mg/L) | 5 | 5 |
| Toplam azot (N) (mg/L) | - ^(a) | 40 |
| Toplam fosfor (P) (mg/L) | - ^(a) | 10 |
| Arsenik (As) (mg/L) | 3 | 10 |
| Toplam siyanür (Toplam CN ⁻) (mg/L) | 10 | 10 |
| Toplam kurşun (Pb) (mg/L) | 3 | 3 |
| Toplam kadmiyum (Cd) (mg/L) | 2 | 2 |
| Toplam krom (Cr) (mg/L) | 5 | 5 |
| Toplam civa (Hg) (mg/L) | 0,2 | 0,2 |
| Toplam bakır (Cu) (mg/L) | 2 | 2 |
| Toplam nikel (Ni) (mg/L) | 5 | 5 |
| Toplam çinko (Zn) (mg/L) | 10 | 10 |
| Toplam kalay (Sn) (mg/L) | 5 | 5 |
| Toplam gümüş (Ag) (mg/L) | 5 | 5 |
| Cl ⁻ (Klorür) (mg/L) | 10000 | - |
| Metilen mavisi ile reaksiyon veren yüzey aktif maddeleri(MBAS) (mg/L) | Biyolojik olarak parçalanması Türk Standartları Enstitüsü standartlarına uygun olmayan maddelerin boşaltımı prensip olarak yasaktır. | |

a) Bu parametrelere atık su değerlendirilmesinde bakılmayacaktır.

b) Bünyesinde %2'den fazla inert KOİ içeren ve toplam KOİ değeri 5000 mg/L den fazla olan kuvvetli organik atık sular için KOİ yerine BOİ₅ değeri esas alınır.

Atık sular genel olarak evsel ve endüstriyel olmak üzere ikiye ayrılmaktadır [9].

Endüstriyel atık sular: Endüstri tesislerinde, hammaddelerin işlenmesi ve ürüne dönüştürülmesi işlemlerinden kaynaklanan atık sular endüstriyel atık su olarak

tanımlanmaktadır. Bu atık sular yıkama, pişirme, ısıtma, ekstraksiyon, reaksiyon ürünleri ile ayırma, taşıma ve kalite kontrol işlemlerinden kaynaklanabilmektedir. Endüstriyel atık suların özellikleri ve arıtım sonrası ilgili yönetmelikte belirtilen deşarj parametre limitleri, endüstri türüne ve işlenen hammaddeye bağılı olarak değışmektedir [8-10]. Endüstriyel atık sular organik veya inorganik, biyolojik olarak kolayca ayrışabilen ya da zehirleyici özelihte olabilen maddeleri içerebilmektedir [11]. Endüstriyel atık sularda bulunan kirleticiler; askıda katı maddeler, ayrışabilir organik maddeler, hastalık yapıcı (patojen) mikroorganizmalar, azot, fosfor, kalıcı (refrakter) organikler, çözünmüş inorganik katılar, ağır metaller, yağ ve gres, fenol, siyanür, krom (IV), alkaliler ve asitler, renk, koku, NH₃, NO₃ ve ısıl kirlenme olarak bilinmektedir [12].

Evsel atık sular: Evsel faaliyetlerden, okul, hastane, otel gibi hizmet sektörlerinden kaynaklanan; %95-99'u su olup %1-5'lik kısmını organik ve inorganik maddelerden oluşan atık su, evsel atık su olarak tanımlanmaktadır. Evsel atık su sistemlerinden toplanan atık sular; karbon, azot, fosfor ve mikroorganizmalar gibi kirleticiler içermektedir [13].

2.2 Atık Su Arıtma Yöntemleri

İnsan başta olmak üzere diğeri tüm canlıların yaşamını ve doğal dengeyi olumsuz yönde etkileyen atık sular ilk olarak 1870 yılında ABD'de arıtmaya başlanmış olup günümüzde ise başta gelişmiş ülkeler olmak üzere bütün dünya ülkeleri tarafından çeşitli derecelerde arıtıma tabi tutulmakta, konuyla ilgili yaptırım gücü yüksek hukuki düzenlemeler ve denetim mekanizmaları uygulamaya konulmaktadır [14].

Atık suların arıtımında temel amaç; atık suların kirlilik derecelerinin, kullanım yerlerine göre istenilen düzeye indirilmesidir. Bu amaçla kullanılan yöntemler genelde fiziksel temel işlemler, kimyasal temel işlemler ve biyolojik işlemler olmak üzere üç grupta toplanabilir [13].

2.2.1. Fiziksel temel işlemler

Arıtım yöntemleri arasında fiziksel kuvvetlerin kullanıldığı uygulamalar fiziksel temel işlemler olarak adlandırılır. Bu işlemler uygulama sırasına göre ızgara, karıştırma,

flokülasyon, sedimentasyon, flotasyon, filtrasyon ve gaz transferidir. Fiziksel arıtmada atık sular, içerisindeki kaba maddelerden temizlenerek biyokimyasal oksijen gereksinimi (BOİ) düşük olan sular haline getirilir [15].

2.2.2. Kimyasal temel işlemler

Kimyasal maddelerin eklenmesiyle veya diğer kimyasal reaksiyonlarla, kirleticilerin giderilmesini veya dönüştürülmesini sağlayan arıtım metodları kimyasal temel prosesler olarak adlandırılır. Atık suların arıtılmasında, çöktürme, adsorpsiyon ve dezenfeksiyon en çok kullanılan yöntemlerdir [14].

2.2.3 Biyolojik işlemler

Atık su içerisindeki çözünmüş organik maddelerin bakteriyolojik faaliyetlerle ayrıştırılarak giderilmesi işlemidir. Bakterilerin arıtma işlemini gerçekleştirebilmeleri için pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen, toksik maddeler gibi ortam şartlarına ait parametrelerin kontrol altında tutulması gerekmektedir. Biyolojik arıtma işlemleri aerobik ve anaerobik olmak üzere sınıflandırılabilir. Aerobik arıtma havanın bulunduğu ortamlarda gerçekleştirilen arıtma işlemleridir. Bu uygulamalar; aktif çamur, biyofilm, stabilizasyon havuzları, havalandırılmalı lagünlerdir. Anaerobik arıtma ise havasız ortamlarda gerçekleştirilen arıtım işlemleridir. Bu yöntemlerde kullanılan uygulamalar ise sürekli karışımli reaktörler, anaerobik filtreler ve akışkan yataklı sistemlerdir. En yaygın aerobik biyolojik arıtma uygulaması, aktif çamur işlemidir [16].

Belirtilen bu temel operasyon ve işlemler çeşitli arıtım seviyelerini sağlamak için kendi aralarında gruplandırılmaktadır. Örneğin fiziksel işlemler birincil arıtım, kimyasal ve biyolojik işlemler ikincil arıtım, üç işlemin birleştirilmesiyle yapılanlar ise ileri veya üçüncül arıtım olarak adlandırılmaktadır. İleri arıtımda ayrıca aktif karbon adsorpsiyonu, iyon değişimi, ters osmoz, elektrodializ gibi yöntemlerden faydalanılmaktadır [17].

2.3 Ağır Metaller

Yoğunluğu 5 g/cm³'ten büyük olan metaller ağır metal olarak tanımlanmıştır. Ağır metaller (antimon, arsenik, kadmiyum, krom, kobalt, bakır, demir, kurşun, civa, nikel,

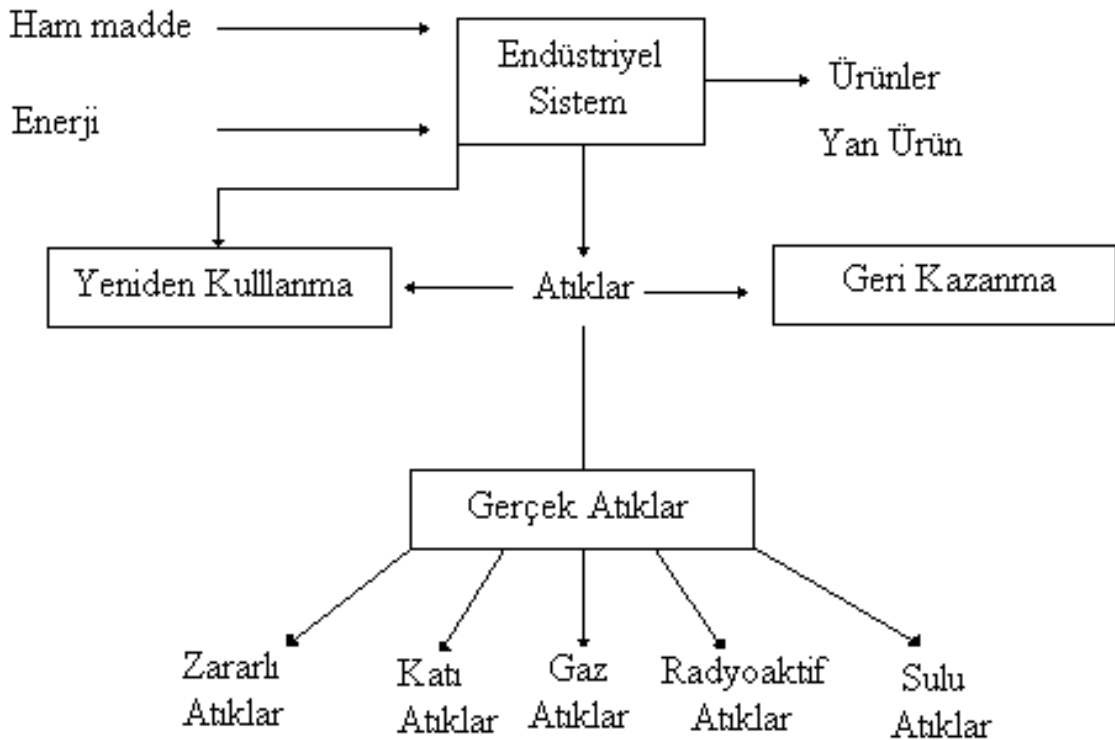
gümüş, talyum, kalay, vanadyum ve çinko gibi) önemli çevre kirliliklerine neden olur. Son yıllarda yapılan sınıflandırmayla elektronegatiflikleri, yükleri, metal iyonlarının iyonik yarıçapı ve ligant/iyon kompleksinin yapısını tanımlayan denge sabitleri bakımından bu metaller üç grupta sınıflandırılabilir [18].

(1) A grubu metaller ligantların oksijen içerme tercihlerini gösterir.

(2) B grubu metaller ligantların nitrojen ve sülfür içerme tercihlerini gösterir.

(3) A ve B grubu arasındaki özelliklere sahip olan metaller onların Lewis asit özelliklerini yansıtır.

Yer kabuğunun doğal bileşenlerinden olan metaller, erozyon, maden yataklarının taşınması, rüzgar, volkanik patlamalar ve orman yangınları gibi doğal olaylar ile endüstriyel deşarjlar ve çöp depo alanlarındaki sızıntılar gibi çeşitli insan aktiviteleri sonucu alıcı ortamlara girebilmektedir [19]. Maden işletmeleri (kurşun, çinko, demir, bakır, gümüş, krom, altın ve uranyum), metal (demir-çelik, bakır, çinko, krom v.b), metal kaplama, kurşun batarya, seramik, matbaacılık, fotoğrafçılık, deri, tekstil, elektrik-elektronik, kimya, boya ve otomotiv endüstrilerinin atıkları ağır metal kaynaklarıdır [20].



Şekil 2.1. Endüstriyel sistem ve atıklar [21]

Bazı metal iyonları, örneğin; bakır, demir, çinko ve krom gibi, yaşamımızın temelini oluşturmasına rağmen, bu metal iyonlarının aşırı alımı yaşayan organizmalarda toksik etki gösterir. Metal iyonları besin zinciri boyunca transfer edilir ve sonunda insan metabolizmasına dahil olur. Diğer yaşayan organizmalar için metal iyonlarının toksik etkileri biyolojik döngüdeki ekolojik süreçlerde problemlere yol açar. Bu metal iyonları doğal dönüşüm süreçlerinin olmadığı bir ortama dağıldıklarında çevredeki metal iyonu derişimi, ekosistem ve insan sağlığını tehdit eden riskleri bir kademe daha arttıracaktır [22].

Toprakta bulunan ağır metaller asit yağmurları sonucu çözünerek ırmak, göl ve yeraltı sularına ulaşırlar. Sulara taşınan ağır metaller fazlaca seyrelir; kısmen karbonat, sülfat, sülfür şeklinde katı bileşik oluşturarak su tabanına çöker ve bu bölgede zenginleşir. Sediment tabakasının adsorpsiyon kapasitesi sınırlı olduğundan suların ağır metal konsantrasyonu sürekli olarak yükselir [21].

Atıklar ile ilgili düzenlemeler insan sağlığını ve çevreyi korumak, zararlı kimyasallara maruziyeti en aza indirmek amacı ile yapılmaktadır. Bu düzenlemelere deşarj edilen atık veya atık su içerisinde olabilecek ağır metal konsantrasyonları ve tipleri de dahildir. Tablo 2.2' de ağır metallerin insan sağlığında meydana getirebilecekleri zararlar verilmiştir [23].

Tablo 2.2. Tehlikeli Ağır Metallerin İnsan Sağlığına Etkileri [23]

| Ağır Metal | Etkileri |
|-------------------|---|
| Arsenik | Deri rahatsızlıkları, iç organ kanserleri, damar hastalıkları |
| Kadmiyum | Böbrek hastalıkları, renal bozukluklar, kanserojen etki |
| Krom | Baş ağrısı, ishal, mide bulantısı, kusma, kanserojen etki |
| Bakır | Karaciğer zararı, Wilson hastalığı, uykusuzluk |
| Nikel | İltihap, mide bulantısı, kronik astım, öksürme, kanserojen etki |
| Çinko | İltihap, mide bulantısı, kronik astım, öksürme, kanserojen etki |
| Kurşun | Böbrek rahatsızlıkları, dolaşım ve sinir sistemi ile cenin beyнинin zarar görmesi |
| Civa | Romatik kireçlenme, böbrek rahatsızlıkları, dolaşım ve sinir sisteminin zarar görmesi |

2.3.1 Kurşun

Kurşun periyodik tabloda IVA grubunda yer almaktadır [24]. Kurşunun atomik ağırlığı 207,19 , yoğunluğu $11,3 \text{ g/cm}^3$, kaynama noktası $1740 \text{ }^\circ\text{C}$ ve erime noktası ise $327,5 \text{ }^\circ\text{C}$ 'dir [25].

Kurşunun en fazla karşılaşılan cevherleri, sülfür minerali galen (PbS) ve oksitlenmiş ürünleri seruzit (PbCO_3) ve anglezit (PbSO_4)'tir. Yoğunluğu, düşük erime sıcaklığı ve korozyon direnci, kurşunun ve kurşun bileşiklerinin kolay şekillendirilebilir olması, özellikle galenin modern endüstride önemli bir yere sahip olmasına neden olur [24].



Resim 2.1. Galen [26]

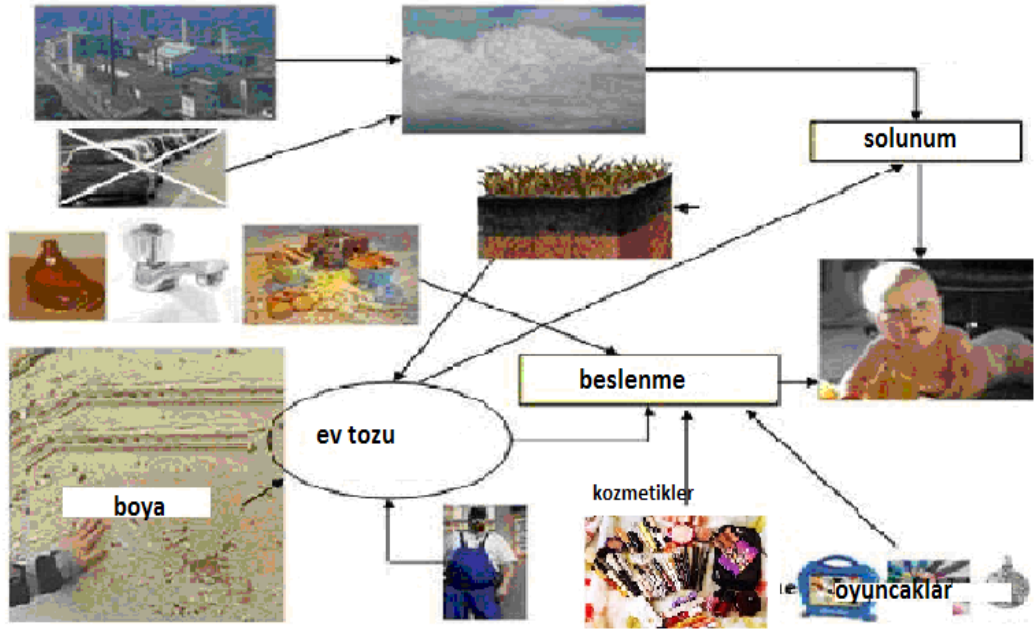
2.3.1.1.Kurşun kirliliği

Kurşun, doğada çok az miktarda fakat yaygın olarak bulunan bir elementtir. Yüz binlerce ton kurşun, kurşunlu petrolden elde edilen ve kurşun tetraetil $[(CH_3CH_2)_4Pb]$ eklenerek oktan sayısı arttırılan yakıtlarla çalışan, içten yanmalı motorlardan çıkan dumanlarla atmosfere verilmektedir. Atmosferdeki kurşun ise (büyük oranda metal oksitleri ve tuzları şeklinde) yağmurlarla tekrar yeryüzüne inerek çevreye yayılmaktadır [27, 28].

Kurşun, maden ocaklarından, sanayi bölgelerinden ve fabrikalardan çevreye yayılabilir. Özellikle işlek otoyollardan, eski evlerden, kurşun arsenatın pestisit olarak kullanıldığı eski meyve bahçelerinden, sanayi bölgelerinden, atıkların bulunduğu alanlardan, çöp fırınlarından ve elektrik santrallerinden yayılarak bu bölgelerde ve yakınlarındaki toprakta varlığını gösterir. Kurşun, toprağa bir kez düşünce, toprak parçalarına sıkıca tutunur ve toprağın üst kısmında kalır. Bundan dolayı geçmişte, benzinde, duvar boyasında ve pestisitlerde kullanılan kurşun, topraktaki kurşun miktarını önemli derecede etkilemiştir [24]. Kapalı ortamdaki hava, yaşanan evin havasında bulunan kurşun seviyesinden, kurşunlu duvar boyalarının kullanılmasından ve sigara içilmesinden etkilenir [29].

İçme suyunun pH'ı asidik ve su tesisatında da kurşun borular kullanılmış ise, içme suyu kurşun içerebilmektedir.

Bazı kozmetik ürünler ve saç boyalarında da kurşun bulunabilmektedir [24]. Kurşunun bulaşmış olduğu yiyecekler, içme ve kullanma suları, atmosfer, bunun yanı sıra kurşunla sırlanmış çanak ve çömlekler, alkol, tütün kurşunla maruziyetin başlıca kaynaklarını oluşturur. Şehir merkezlerine ve karayollarına yakın yerlerde yetiştirilen sebze-meyvelerde kurşun yoğunluğunun daha yüksek olduğu bilinmektedir [30].



Şekil 2.2. Kurşuna maruziyet kaynakları [31]

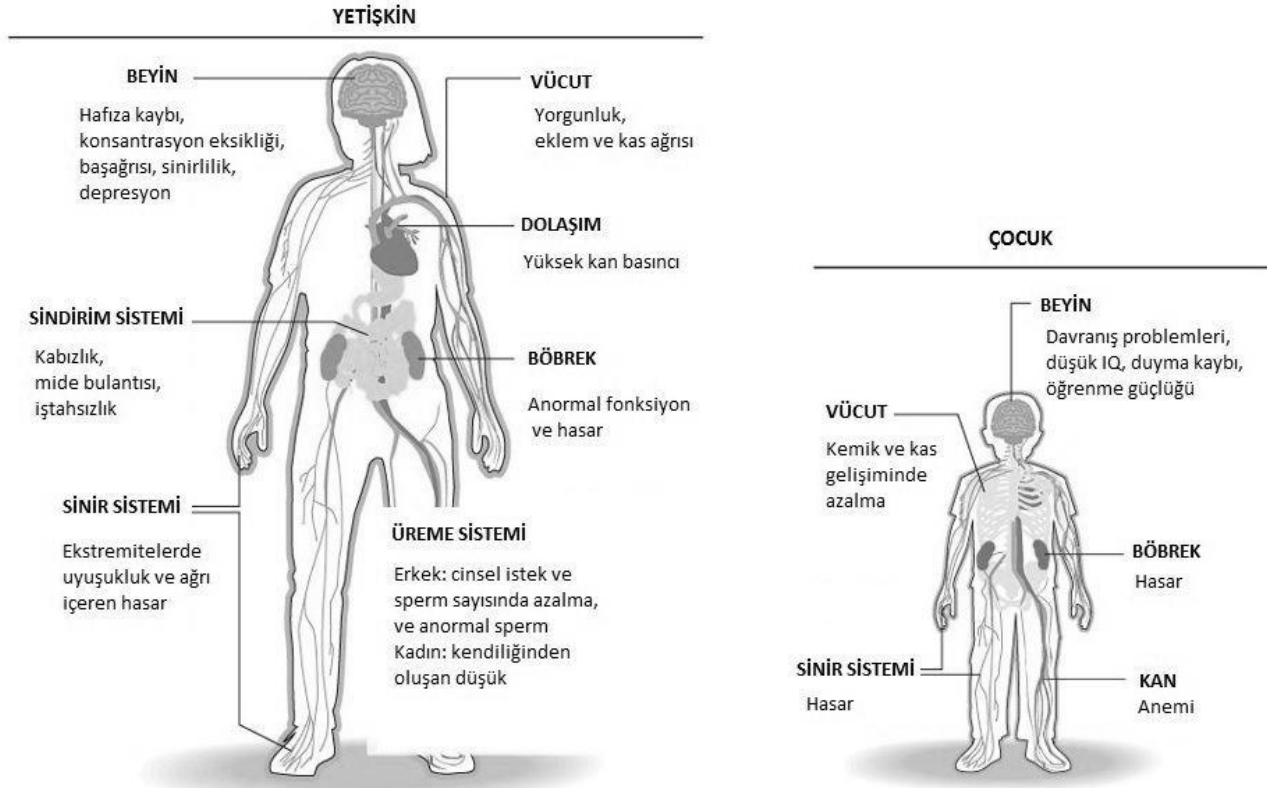
2.3.1.2. Kurşun toksisitesi

Kurşun, yaşamakta olan organizmalar için toksik bir elementtir ve vücuttaki hiçbir fizyolojik fonksiyon için gerekli değildir. Kurşun, kontamine olan gıda, hava ve toz aracılığı ile alınır ve vücutta öncelikle kemiklerde olmak üzere birikir [27, 28]. Kurşuna maruziyet kaynağı, fiziksel ve kimyasal özellikleri, partikül büyüklüğü, spesifik bileşiminin çözünürlüğü, kurşuna maruz kalan bireyin yaşı, cinsiyeti, beslenme şekli ve genetik özellikleri, kurşunun vücuttaki absorpsiyon miktarını etkilemektedir [32].

Kurşun kirliliği; çocuklarda gelişim ve psikomotor gerilik, yetişkinlerde duyma kaybı, hematopoetik rahatsızlıklar, merkezi ve periferel sinir sistemi bozuklukları, üriner, gastroitestinal, kardiovasküler ve endokrin sistemde değişiklikler gibi birçok sağlık problemi ile doğrudan ilişkilidir [33].

Bunun yanı sıra, karsinojenik ve nörolojik hasarlar, zihinsel ve davranışsal değişiklikler kurşun toksisitesi ile bağlantılıdır [34]. Kurşunun bağışıklık sistemi ve üreme sistemi üzerinde de olumsuz etkileri vardır [35, 36]. Mide, akciğer ve safra kesesi kanserlerinin yanı sıra tüm kanserlerin görülme sıklığındaki artış ile kurşun maruziyetinin bağlantılı olduğu değerlendirilmiştir [37].

Yakın zamana kadar zararsız olduğu düşünülen düşük doz kronik kurşun maruziyeti, artık büyüme ve sinirsel gelişimi baskılayıcı ve dejenere edici olarak kabul edilmektedir [38]. Kurşuna en duyarlı kişiler olarak ise süt çocukları, hamile kadınlar ve kurşunla çalışan meslek grupları sayılabilir. Çocuklarda kurşunun etkisi daha fazla görülür. Bunun sebepleri; oyun nedeniyle sokak ve ev tozları ile daha fazla temas etmeleri, ellerini ağızlarına sık götürdükleri için daha fazla kurşunun gastrointestinal sisteme (GIS) geçmesi, GIS'den kurşunun daha fazla emilmesi, vücuttan daha az atılması ve demir eksikliği anemisi varsa emilimin daha da artması olarak sayılabilir [39]. Ayrıca hamile annenin aldığı kurşun, bebekte sinir sistemi bozukluklarına ve gelişme geriliklerine yol açmaktadır [30].



Şekil 2.3. Kurşunun yetişkin ve çocuklar üzerinde etkisi [40]

Kurşunun vücuttan atılması, büyük oranda böbreklerle ve daha az oranda ise dışkı, tükürük, safra, saç ve tırnak ile olur. Böbreklerden genellikle glomerüler filtrat ile atılır. Anne sütü ve diğer vücut sıvılarının da kurşunun vücuttan atılımında rol oynadığı bildirilmiştir [30].

2.3.2 Nikel

Nikel periyodik tablonun VIII B grubunda bulunan bir geçiş metalidir. Atom numarası 28 ve atom ağırlığı 58,71 dir. Bilinen 7 radyoizotopu mevcut olmakla birlikte toprak-bitki çalışmalarında en yaygın kullanılan izotopu ^{63}Ni 'dir (yarılanma ömrü 92 yıl). Çoğunlukla sülfat ve oksitler halinde bulunan ve yeryüzünde bulunma sıklığı 24. sırada olan nikelin ortalama konsantrasyonu % 0,008'dir. Toplam rezerv 130×10^6 ton olarak tahmin edilmektedir [41].

Parlak gümüşümsü sert bir ferromanyetik olan nikel metali, nitrik asitte çözünebilirken seyreltik hidroklorik ve sülfürik asitte az miktarda çözünebilmekte, sıcak-soğuk su veya amonyakta ise hiç çözünürlük göstermemektedir. Nikelin, klor, kükürt ve oksijenle yapmış olduğu bileşiklerin çoğu, suda kolaylıkla çözünür ve karakteristik olarak yeşil renktedir. Nikel, sulu ortamda Ni^{+2} halinde bulunmaktadır. Nikel ve oluşturduğu bileşikler, karakteristik koku ve tada sahip değildir [42]. Nikelin büyük bir çoğunluğu (% 80), korozyon ve ısı direncinin yüksek, sertliğinin ve dayanımının iyi olması sebebiyle alaşım üretiminde kullanılmaktadır. Nikelin ana kullanım alanı paslanmaz çelik, bakır-nikel alaşımları ve diğer korozyona dayanıklı alaşım üretimleridir. Saf nikel kimyasal katalizör olarak elektrolitik kaplamada ve alkali pillerde, pigmentler, madeni para, kaynak ürünleri, mıknatıslar, elektrotlar, elektrik fişleri, makine parçaları ve tıbbi protezlerde kullanılmaktadır [41, 43].

2.3.2.1 Nikel kirliliği

Nikel yer kabuğundaki belli başlı elementlerden olup, yüz yıla yakın bir süredir endüstride kullanılmaktadır. Sahip olduğu üstün nitelikler nedeniyle endüstride en çok kullanılan metallere dendir. Doğal olarak bulunmasının yanı sıra, yaygın kullanımı ve insan aktiviteleri çevreye yayılan nikelin başlıca kaynaklarıdır. Nikel yakıtların yanması, madencilik, rafinasyon işlemleri ve kentsel atıkların küllleştirilmesi ile atmosfere yayılmaktadır. Bunun yanı sıra lağım çamuru karışmış toprakta ve sigarada (0 – 0,51 $\mu\text{g}/\text{sigara}$) bulunmaktadır. Derideki etkileşim nikel içeren takı kullanımında ortaya çıkabilmektedir. Nikel madenciliği ve ergitme endüstrisinde mesleki maruziyet görülmektedir. Solunabilir boyuttaki nikel tozları için TRK değeri $0,5 \text{ mg}/\text{m}^3$ olarak belirlenmiştir [44].

2.3.2.2 Nikel toksisitesi

Nikel organizma içerisinde serbest bir radikal olarak davranır ve DNA'yı oksitleyerek mutasyona sebep olur. Bu özellikleri nedeniyle sulu ortamlardan uzaklaştırılması gereken nikel iyonları, aynı zamanda sahip oldukları teknolojik değeri nedeniyle de geri kazanımı önemli olan bir ağır metaldir [45].

Nikel ve belirli nikel bileşenleri kanserojen olarak kabul edilen maddeler listesinde yer almaktadır. Uluslararası Kansere Araştırmaları Ajansı (IARC) nikelin bileşenlerini grup 1'de (insanlarda kansere yol açtığına dair yeterli kanıt bulunan), nikeli ise grup 2'de (insanlarda kansere yol açma olasılığı bulunan) listelemiştir. Nikel insanlara sulu yiyeceklerden geçer ve zamanla akciğer, bağırsak ve deri gibi dokularda birikerek kronik etkiler ortaya çıkarır. Bunların başında, akciğer fibrozisleri, kardiyovasküler ve böbrek hastalıkları gelir [46]. Nikel rafinasyon işçileri üzerinde yapılan çalışmalar, mide ve akciğer kanserine yakalanma oranının yüksek olduğuna dikkat çekmektedir.

Atık sularındaki ağır metallerin, arıtım sonrası BOI (biyokimyasal oksijen ihtiyacı) ve KOI (kimyasal oksijen ihtiyacı) değerleri üzerinde birçok araştırma yapılmıştır. Yapılan araştırmaların sonuçları metal toksisitesinin, gümüş, civa, bakır, krom, nikel, kurşun ve çinko sırasına göre olduğunu göstermiştir [47].

2.4. Atık Sulardan Ağır Metal Giderim Yöntemleri

Atık sulardan ağır metallerin uzaklaştırılması teknikleri genel olarak ters osmoz, ultrafiltrasyon, elektrodializ, iyon değişimi, kimyasal çöktürme, bitkiler kullanılarak gerçekleştirilen fitoremediasyon, adsorpsiyon ve biyosorpsiyon gibi yöntemlerden oluşmaktadır [48]. Klasik yöntemlerin kullanımı maliyeti artırmakta ve aktif çamurlarda yoğun toksik bileşikler meydana getirerek arıtımı daha da zor hale getirmektedir [49]. Ayrıca, bu yöntemler yüksek metal konsantrasyonlarının gideriminde kullanılırken, maliyetin yüksekliği nedeniyle düşük konsantrasyonlu (1-100 ppm) metal kirliliğinde kullanılamamaktadır [50]. Bu nedenle endüstriyel atık sulardan ağır metal gideriminde biyolojik sistemlerin kullanımına yönelik biyoteknolojik uygulamalar ön plana çıkmaktadır. Son yıllarda ağır metallerin gideriminde birçok mikroorganizmanın ölü,

canlı ve tutuklanmış hücreleri denenerek, alınımın en yüksek olduğu pH ve sıcaklık gibi optimum ortam koşulları araştırılmaktadır.

2.4.1. Hiperfiltrasyon (ters ozmoz)

Atık su içinde çözülmüş olan ağır metallerin yarı geçirgen bir zar ile ortamdan ayrılarak, osmotik basıncın tersi istikamette, daha güçlü bir basınç altında ayrılması işlemidir. Bu yöntemin en büyük caydırıcı yönü pahalı olmasıdır [51].

2.4.2. Ultrafiltrasyon

Basınç altında membranlardan ağır metallerin giderilmesi uygulamasıdır. Bu uygulamanın ters osmoz sisteminden en belirgin farkı daha düşük basınç altında gerçekleştiriliyor olmasıdır. Genellikle yağ ve renkli kolloidal çözeltilerin arıtılması işlemlerinde kullanılmaktadır. Dezavantajları içinde en temeli çamur oluşumu ve membran gözeneklerinin tıkanmasıdır [51].

2.4.3. Elektrodializ

Bu yöntemde, iyonik bileşenler (ağır metaller), yarı geçirgen ve iyon seçici membran kullanarak ayrılır. İki elektrot arasında doğurulan bir elektrik potansiyeli farkı sonucu, çözelti içerisinde bir elektrik akımı meydana gelir ve katyonlar negatif elektroda, anyonlar ise pozitif elektroda yaklaşır. Katyon ve anyonlar ilgili elektrotlara doğru bir çekim altına girerken düzenek içerisindeki anyon ve katyona duyarlı zarlardan geçerler. Düşük çözünürlüğe sahip tuzların membran yüzeyinde çökerek kalması ve kolloidal çözelti içerisindeki organik maddelerin membran gözeneklerini tıkanması elektrodializ yönteminin en önemli dezavantajlarıdır. Membranların tıkanmasını en aza indirmek için elektrodializ öncesi ön filtrasyon, kimyasal çöktürme ve aktif karbon işlemleri faydalı olabilmektedir [51].

2.4.4. İyon değişimi

Bu işlem ağır metal iyonlarının elektrostatik kuvvetlerce fonksiyonel grup olarak katı yüzeyinde immobilize edilerek, ortamda bulunan diğer iyonlarla değiş-tokuş esasına dayanır. İyon değişimi bir kolon boyunca gerçekleşir. Kolon içindeki reçinenin iyon

yakalama kapasitesinin düşmesiyle verim azalır. Bu gibi durumlarda kolonun geri yıkaması ile kolon rejenerasyonu yapılması gerekmektedir. Bu işlem de yüksek maliyet ve bazı iyonların kısmen giderilmesi gibi olumsuz yönler içermektedir [51].

2.4.5. Kimyasal çöktürme

Metallerin kimyasal olarak çöktürülmesi şap, kireç, demir tuzları ve diğer organik polimerler gibi koagülant ilavesi ile gerçekleştirilir. Kimyasal çöktürme esnasında yüksek miktarda üretilen ve toksik bileşikler içeren çamur bu işlemin baş dezavantajıdır. Çöken ağır metallerin toksisitelerinden ötürü çamur stabilizasyonunu sağlamakta aksaklıklar yaşanabilmektedir [51].

2.4.6. Fitoremediasyon

Metaller ile kirletilmiş olan toprak, sediment, ve suların bazı bitkiler kullanılarak metalden arındırılması işlemidir. Dezavantajı; işlem esnasında metallerin uzaklaştırılmasının ve daha sonraki basamaklar için bitkinin rejenerasyonunun uzun zaman alıyor olmasıdır [51].

Ancak, tüm bu metotlarda, yetersiz metal giderimi, yüksek reaktif ve enerji ihtiyacı, özel bertaraf teknikleri ve koşulları gerektiren, dikkatli atılması gereken toksik çamur veya diğer atık ürünlerin oluşması gibi dezavantajlar yer almaktadır [51].

2.4.7. Adsorbsiyon

Gaz veya sıvı fazında ya da herhangi bir çözeltide bulunan çözünmüş maddelere ait molekül, atom veya iyonların bir maddenin yüzeyinde tutunması olayına adsorpsiyon adı verilir [52]. Katının yüzeyine tutunan taneciklerin yüzeyden ayrılmasına da desorpsiyon denir [53]. Adsorpsiyon, fiziksel ve/veya kimyasal bir süreçtir. Adsorplanan maddeye adsorbat, ona destek olan alttaki katıya da adsorban adı verilir [54].

Adsorbsiyon işlemi fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak gerçekleşebilmektedir. Fiziksel adsorbsiyon, zayıf çekim kuvvetleri aracılığıyla gerçekleşirken, kimyasal bir bağlanma söz konusu değildir. Kimyasal adsorbsiyonda kirletici ile adsorblayıcı

arasında kimyasal olarak bağlanma meydana gelmektedir. İyonik adsorpsiyon ise elektrostatik çekim kuvvetlerinin rol aldığı bir adsorpsiyon şeklidir [54].

2.4.8. Biyosorpsiyon

Metal arıtma yeteneğine sahip olan canlılara biyosorbents adı verilmektedir. Canlı hücreler vasıtası ile aktif olarak meydana gelen metal giderimine biyobirikim, genellikle ölü hücre yüzeyine pasif olarak tutunma yolu ile meydana gelen giderime ise biyosorpsiyon ya da adsorpsiyon adı verilmektedir [55].

Biyosorpsiyon; içinde çeşitli bileşenlerin yer aldığı sularda, daha ziyade de atık sulardaki organik ve inorganik kirleticilerin veya metal iyonlarının biyolojik kökenli varlıkların ya da mikroorganizmaların yüzeylerine tutunması işlemidir [56].

Biyosorpsiyon, biyolojik malzeme ile eklendiği ortamdaki metallerin ya da benzer maddelerin uzaklaştırılması işlemidir. Hemen hemen tüm biyolojik malzemeler biyosorpsiyon yapabilme özelliğine sahiptir [57].

Biyosorpsiyon, Shumate ve Stranberg'in 1985'te belirttiği gibi "metal / radyonüklid türler ile mikrobiyal hücrelerin arasında oluşabilecek dolaylı bir fizikokimyasal etkileşim" olarak da tanımlanabilir [58].

Zaten genel olarak biyosorpsiyon terimi iyonları, esas olarak da ağır metal ve radyonükleidleri alıkoyma işleminde biyokütlenin özelliklerini tanımlamak için kullanılmaktadır [59].

Mikrobiyal biyokütle uygulamalarından olan biyosorpsiyon, atık sulardan metal arıtımı için yararlı bir enstrüman olup, aktif karbon ile iyon alışverişi veya adsorpsiyon işlemlerinin kullanıldığı konvansiyonel pek çok uygulama için de iyi bir alternatiftir [60].

Yöntem biyolojik malzemenin bağlama kapasitesi ile doğrudan ilişkilidir. Bakteriler, algler, mantarlar ve mayaların metal sorbe etmek yetileri çok yüksek olup, bu mikroorganizmaların potansiyel metal biyosorbentleri olduğu kanıtlanmıştır [61].

Metallerin metabolizmadan bağımsız, pasif olarak alınımı daha hızlı olmakla birlikte, geri kazanımı mümkün ve ayrıca az enerji gerektirmektedir [62, 63]. Biyosorpsiyon için harcanan enerji 21 kJ/mol iken, biyobirikim için harcanan enerji 63 kJ/mol'dür [64].

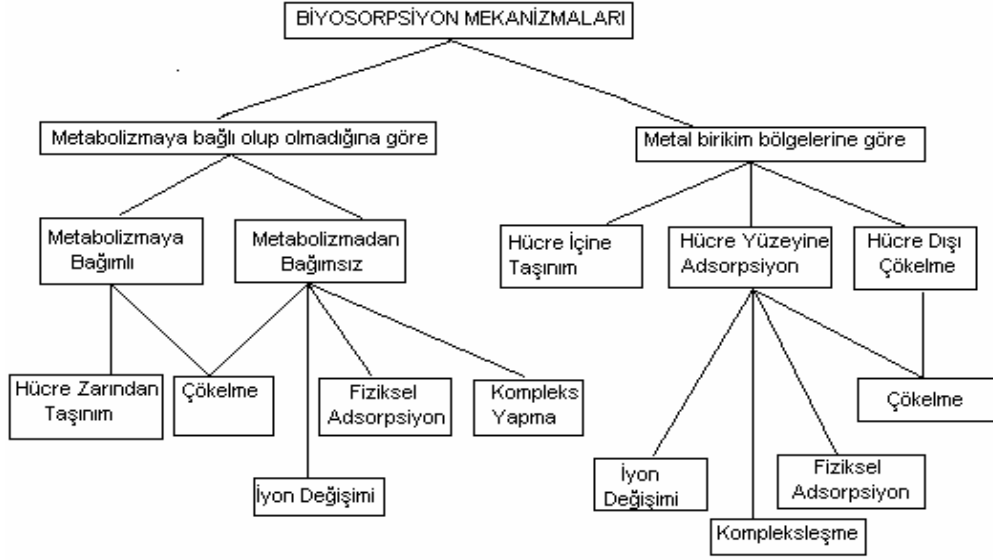
Biyosorpsiyon mekanizması genellikle metal iyonları ve hücre yüzeyinde bulunan fonksiyonel gruplar arasındaki elektrostatik etkileşim, iyon değişimi, metal iyonunun şelatlanması gibi etkileşimlere bağlıdır [2]. Biyosorpsiyon çalışmaları, ölü mikroorganizmanın hücre yapısındaki bazı değişikliklerden dolayı olumlu yönde etkilenecek hücrelerden daha fazla miktarda metali adsorbilabilmektedir [55, 65]. Ölü hücreler iyon değişimi yapabilmeleri ve tekrar tekrar kullanılabilmelerinden dolayı sentetik adsorbantlara benzedikleri için ekonomik açıdan son yıllarda çok ilgi çekmektedir [66-68].

Yirmibirinci yüzyılda sürekli olarak artan çevre bilinci ve dolayısıyla getirilen yeni yasal yönetmelikler ve kısıtlamalar neticesinde, atık suların deşarj koşullarına uyum sağlayabilmek için uygun maliyetli alternatif arıtım teknolojilerine gereksinim duyulmaktadır. Bu bağlamda, mikrobiyal biyokütle uygulamaları çevre dostu ve ekonomik atık su arıtma metodlarının geliştirilmesi için vazgeçilmez bir seçenek olarak ortaya çıkmıştır.

2.4.8.1. Biyosorpsiyon mekanizmaları

Son yıllarda giderek önem kazanan biyosorpsiyon işleminin çalışma prensipleri ve işlem sırasındaki basamakların oluşma silsilesi henüz tam olarak açıklanamamıştır. Mikroorganizma yapılarının genel olarak karmaşık olmasından dolayı, metalin hücre tarafından yakalanması ve tutulmasında farklı mekanizmalar işlemektedir. Mikroorganizmalarla ağır metal giderimi metabolik aktiviteden bağımsız olarak ve/veya metabolik faaliyetlerle gerçekleşmektedir [55, 69].

Biyosorpsiyon işleminin mekanizması farklı açılardan değerlendirilerek aşağıdaki gibi bir sınıflandırma yapılmıştır.



Şekil 2.4. Biyosorpsiyon mekanizmalarının sınıflandırılması [70]

Cansız hücrelerden oluşan bir ortamda metal tutuklama işlemi, metabolizmal faaliyetler söz konusu olmadığında metabolizmadan bağımsız bir yolla gerçekleşir. Bu durumda metal uzaklaştırmada rol oynayan en önemli yer hücre duvarıdır. Çözeltilerdeki metal iyonları hücre duvarı biyopolimerlerinde bulunan kimyasal fonksiyonel gruplarla etkileşerek yüzeye adsorbe olurlar. Hücre yüzeyindeki potansiyel bağlanma bölgeleri; aminler, amidler, imidazoller, hidroksiller, karboksilatlar, fosfatlar, tiyoeterler ve diğer fonksiyonel grupları içerir. Potansiyel ligantların sayısı ve türü çeşitli bölgelerde meydana gelen bağlanmalara ve metal türlerine bağlıdır. Metabolizmadan bağımsız biyosorpsiyon genellikle hızlıdır, pH'dan etkilenir ve ılımlı bir sıcaklık (4-30°C) aralığında verimli olur [71].

Hücre zarından içeri taşınım olayı hücre metabolizması ile ilgilidir. Canlı hücrelerde çalışırken bazı toksik elementlerin yüksek konsantrasyonda olması, biyosorpsiyon araştırmalarına imkân vermemektedir. Bu nedenle, bu çeşit biyosorpsiyonun mekanizması hakkında yeterli bilgi bulunamamaktadır. Mikrobiyal hücre zarlarındaki ağır metal iyonları taşınımı hücre metabolizmasında gerekli olan potasyum, magnezyum ve sodyum gibi iyonların taşınma mekanizmasıyla aynı olabilir. Metal taşınma sistemi, aynı yüklü ve iyonik yarıçaplı ağır metal iyonlarının varlığında, karışık bir durum arz eder. Bu mekanizma genellikle metabolik aktiviteye bağlı olmayan biyosorpsiyon olayıyla eşzamanlı olarak meydana gelmektedir. Literatürdeki birçok örnekte canlı

organizmalar vasıtasıyla yapılan biyosorpsiyon, iki temel basamağı kapsamaktadır. Bunlardan birincisi metabolizmaya bağlı olmadan hücre duvarlarına bağlanma ve ikincisi de metabolizmaya bağlı olarak, metal iyonlarının hücre zarından hücre içine taşınıp biriktirilmesidir [72, 73].

Fiziksel adsorpsiyon olayında biyosorpsiyon, Van der Waals kuvvetlerinin ve diğer zayıf moleküller arası kuvvetlerinin (dipol-dipol gibi) varlığıyla gerçekleşir. Bir fungal biyokütle olan *Rhizopus arrhizus* ile toryum ve uranyumun biyosorpsiyonu üzerine yapılan bir çalışmada; bu metallerin biyosorpsiyonunun hücre duvarında yapı elemanı olarak bulunan kitin tarafından fiziksel bağlanma yoluyla sağlandığı tespit edilmiştir [60]. Ayrıca uranyum, kadmiyum, çinko, bakır ve kobalt gibi metallerin canlı olmayan alg, mantar ve maya biyokütelleri ile biyosorpsiyonunda, çözültideki iyonlar ile hücre duvarları arasında elektrostatik etkileşimin etkili olduğunu ileri sürülmüştür [61]. Elektrostatik etkileşimin, bakteri ve alglerle yapılan bakır biyosorpsiyonunda da etkili olduğu kanıtlanmıştır [74].

İyon değişimi mekanizmasındaki biyosorpsiyonda, mikroorganizmaların hücre duvarında bulunan polisakkarit yapılar önem taşır. Doğal polisakkaritlerin iyon değişimi özellikleri detaylı olarak çalışılmış ve iyice belirlenmiştir ki bivalent metal iyonları polisakkaritlerin karşı iyonları ile yer değiştirmektedir [18]. Örneğin, deniz alglerinin alginatları genellikle potasyum, sodyum, kalsiyum ve magnezyum gibi elementlerin doğal tuzlarından oluşmaktadır. Bu metalik iyonlar; kobalt, bakır, kadmiyum ve çinko gibi karşı iyonlarla yer değiştirebilmekte ve sonuç olarak metallerin bağlanması ve arıtımı sağlanmaktadır [61].

Kompleks oluşturma yoluyla biyosorpsiyon, metal iyonları ile aktif gruplar arasındaki etkileşimden sonra, hücre yüzeyindeki kompleks yapıya bağlı olarak meydana gelebilir. Metal iyonları tek bir liganda ya da şelata bağlanabilir. Özellikle hücre duvarını bir ağ örgü gibi saran kitin tabakasının azotu ile metaller arasındaki uyum, adsorpsiyonu sağlamaktadır. Bu tarz biyosorpsiyon, hem adsorpsiyon yoluyla hem de metallerle polisakkarit yapıdaki hücre duvarında var olan amino ve karboksil grupları arasında uyumlu bağlar oluşturularak meydana gelmektedir [60].

Bir başka adsorpsiyon mekanizması olan çökelme hücre metabolizmasına bağlı olduğu gibi, ondan bağımsız da gerçekleşebilir. Birinci durumda genellikle çözeltideki metalin arıtımı, mikroorganizmaların aktif savunma sistemleri aracılığıyla olmaktadır. Çözeltide bir toksik metalin varlığı halinde, savunma sistemi onunla reaksiyona girerek, çökelme işlemini hızlandıran bazı bileşikler üretir. Bazı *Arthrobacter* ve *Pseudomonas* türleri ile çözeltiden kadmiyumu ayırma işleminin, detoksifikasyon yoluyla gerçekleştiği ve kadmiyumun hücre yüzeyi üzerine çöktüğü belirlenmiştir [60]. Bu çökelme olayı, hücre metabolizmasına bağlı değildir. Belki hücre yüzeyi ile metal arasındaki kimyasal etkileşimin bir sonucu olabilir. Literatürden de anlaşılacağı gibi biyosorpsiyon olayının mekanizması tek tip değildir. Aynı anda birden fazla mekanizmada meydana gelebilmektedir.

Biyosorpsiyon çalışmalarında, ağır metal giderimini; metal iyonu konsantrasyonu, biyosorbent konsantrasyonu, pH, sıcaklık, karıştırma hızı ve kontakt zamanı direkt olarak etkilemektedir [75, 76].

Metalin çözelti içerisinde alınır, hücreye gideriliş konumuna göre ise üç şekilde bir sınıflandırma yapılmaktadır [60, 77]:

1. Hücre dışı birikim (mikroçökelme)
2. Hücre yüzeyinde emilim (fiziksel ya da kimyasal adsorpsiyon, elektrostatik etkileşimler, iyon değişimi, kompleksleşme)
3. Hücre içi birikim → biyobirikim (metal iyonları hücre zarından içeri geçerek hücre stoplazmasında biriktirilir.)

2.4.8.2.Biyobirikim

Biyobirikim, bir ortamda çözülmüş olarak bulunan çeşitli bileşenlerin aynı ortamdaki canlı hücrelerin içinde, hücre zarından geçmek suretiyle birikmesidir [78]. Biyobirikim işlemi, canlı hücrelerde olan ve biyosorpsiyonla karşılaştırıldığında daha yavaş işleyen bir süreçtir [79].

Mikroorganizmalar, ihtiyaç duydukları veya ortamda bulunan elementleri taşıma sistemleriyle hücre içine alabilirler. Çoğu metal taşıma mekanizmasının hücre zarı

üzerinde görülen elektrokimyasal gradientlere bağlı olduğu bilinmektedir. Bunun yanısıra hücre içine transportasyon, toksik maddelerin hücre zarının geçirgenliğinde tahribata yol açmasıyla birlikte difüzyonla da gerçekleşebilir [80, 81].

Biyobirikimde mikroorganizma, metal veya metalleri seçerek kontrollü bir şekilde bünyesine almaktadır. Mikroorganizmalar birden fazla metale maruz kaldıklarında metabolize edebileceği metalleri tercih etmektedir. Metaller biyobirikimde hücre içerisine metabolizmaya bağlı olarak alınmaktadır. Mikrobiyal biyobirikimde metaller ilk aşamada iyon değişimi veya fiziksel adsorpsiyon ile hızlı bir şekilde hücre yüzeyinde toplanmaktadır. Daha sonra hücre zarından metabolizmaya bağlı olarak hücre içersine alınmaktadır. Hücre yüzeyinde bulunan tiyollerin metallerin hücre içersine aktif taşınmasında görev aldığı bilinmektedir. Hücre içine endositoz ile taşınan metaller, yine hücre içinde bulunan metalotiyonein proteinleri ile şelatlanarak detoksifiye olmaktadır [82-85].

Canlı organizmaların bulunduğu bir ortamda kendiliğinden oluşan ve difüzyona olanak sağlayan sürücü güç; mikroorganizma hücrelerinin ürettiği ortamdaki bileşenlerin hücre içine alımı, hücre içi ve dışı derişim farkından dolayı oluşmaktadır. Böylelikle ortamdaki maddeler hücre zarından geçerek, hücre içinde birikebilmektedir. Difüzyona sebep olan sürücü güç kimyasal potansiyel olarak adlandırılır ve bu durum, hücre dışındaki kimyasalı hücre içerisine hareket ettirir [86, 87].

Membranın iki yakasındaki konsantrasyon farkından doğan difüzyonun kendi doğası nedeniyle mikroorganizma hücreleri, ortamdaki maddelerin, toksik etkileri olsun ya da olmasın hücre içerisine girmelerine engel olamamaktadır [88].

Hızla gelişen endüstrinin sebep olduğu bozulmalarda mikroorganizmalar toksik ağır metallere karşı mekanizmalar geliştirir. Mikroorganizmalar kalıtsal dirençliliğinden ziyade bu dirençliliği ya mutasyonla ya da düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona adım adım taşınarak kazanır. Böyle mikroorganizmalar ağır metalle kontamine suların temizlenmesi veya bu sulara müdahale etmek için geliştirilmiş biyotoplayıcı olarak işe hazır hale getirilebilir. Böylece metale dirençli suşların geliştirdiği mekanizma biyoteknolojik kullanımları geliştirmede temel olabilir [89]. Özellikle biyobirikim çalışmalarında metalle kirlenmiş ortamlardan izole edilen

mikroorganizmaların hücre içerisine, metale maruz kalmayan ortamlardan izole edilen mikroorganizmalardan daha çok metal biriktirdiği rapor edilmiştir. Daha önceden edinilmiş olan dirençlilik mekanizması mikroorganizmanın metal alım kapasitesini arttırmaktadır [90].

Metal dirençliliğinin ölçülmesinde LC₅₀ değeri sıkça kullanılmaktadır. Canlı hücrelerin % 50'sini öldüren metal dozu ne kadar yüksek ise canlının o metale karşı dirençliliği de yüksek olmaktadır [91].

2.4.8.3. Biyosorpsiyonda kullanılan mikroorganizmalar

Biyosorpsiyon için seçilecek mikroorganizma, doğada yaygın olarak bulunmalı, endüstri atıklarından izole edilmeli, çevresel streslere karşı dirençli olmalı, kolaylıkla üreyebilmeli ve ucuz maliyetler ile üretilebilmelidir [77].

Mikroorganizmalar ile ağır metal giderimi hakkında birçok araştırma yapılmış, yeşil algler [92, 93], siyanobakteriler [94, 95], bazı bakteriler [96, 97], mantarlar, küfler [98], mayalar [99] gibi mikroorganizmaların ortamda bulunan ağır metalleri bünyelerinde topladığı rapor edilmiştir. Küf ve mayalarda karboksil, fosforil ve polifosfat gruplarının, bakterilerde EPS, teikoik asit ve teikoik asitin karboksil gruplarının, yeşil algler ve siyanobakterilerde üronik asit ve tiyollerin yoğun olarak bulunması son yıllarda bu mikroorganizmaların metal gideriminde kullanılmalarındaki ilgiyi arttırmaktadır.

Mikroorganizmalarda tek çeşit metal iyonuna maruziyette, biyosorpsiyonu etkileyen faktörler olarak organizmanın özgül yüzey özellikleri, pH, sıcaklık, metal iyonu başlangıç derişimi, biyokütle derişimi, biyokütle tipi, biyokütle hazırlanışı, kirleticilerin kimyasal yapısı sayılabilir. Birden çok metal iyonu ile maruziyette ise metal iyonlarının mikroorganizmalara kendiliğinden bağlanması ile metal kombinasyonu, metal derişim düzeyleri, metal eklenme sırası gibi faktörler bu süreci etkiler [87]. Belirli bir mikroorganizma türünün, bir metal iyonunu adsorplama kapasitesi, ortamda başka bir metalin varlığına göre artabilir, azalabilir veya hiçbir derişim göstermeyebilir.

Mikroorganizmaların metal giderim kapasitesini arttırmak için, canlı ve kuru hücreler kimyasal veya doğal bir matriks ile tutuklanmaktadır. Tutuklanmış hücreler olumsuz dış etkenlerden korunarak, uygulanacağı biyoproseslerde tekrar tekrar kullanılabilir.

Bunun yanı sıra, tutuklanma, hücrenin uzun süre canlı kalmasını sağlamaktadır. Bu da teknolojik açıdan avantaj sağlayan bir durumdur [100-102].

Gardea-Torresdey ve ark. (1998), *Synechococcus* sp. PCC 7942 izolatının tutuklanmış hücrelerinde bakır, kurşun, nikel, kadmiyum ve krom biyosorpsiyon oranının kuru hücrelerin biyosorpsiyon oranına göre daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir [103].

2.5. *Pseudomonas* spp.

Pseudomonas cinsi, *Pseudomonadaceae* ailesinde yer alan Gram negatif, basil morfolojisinde bakterilerdir. Doğada, toprakta ve suda yaygın olarak bulunurlar [104]. Azot döngüsünde önemli rol oynarlar. *Pseudomonas*'lar katalaz ve oksidaz pozitif, sekerleri oksidasyon ile parçalayabilen ancak fermentasyon yapmayan bakterilerdir. Bu nedenle nonfermentatif gram negatif basiller grubunda yer alırlar [105].



Resim 2.2. *Pseudomonas aeruginosa* bakterisinin mikroskop görüntüsü (x1000) [106]

Pseudomonas cinsi büyük ve kompleks bir Gram negatif bakteri topluluğu olup klinik ve çevresel açılardan dikkate alınması gereken pek çok tür içerir. İlk kez Midula tarafından 1894'te tanımlanan *Pseudomonas* cinsi, tür düzeyinde tanımlama metodlarındaki gelişmelere bağlı olarak pek çok kez revizyona uğramıştır. *Pseudomonas* cinsinin, 1970'lerin başında gerçekleştirilen ribozomal RNA-DNA hibridizasyon çalışmaları birbirinden bağımsız beş gruptan oluştuğunu göstermiştir. *Pseudomonas* cinsi *Proteobacteria*'ların gama alt sınıfında olup, rRNA homoloji grup I'dir. rRNA homoloji grup II'de *Burkholderia* türleri; grup III'de *Comamonas*, *Acidovorax* ve *Hydrogenophaga* cinsleri; grup IV'de, *Brevindumonas* türleri ve grup

V'de, *Stenotrophomonas* ve *Xanthomonas* cinsleri yer alır. Günümüzde *Pseudomonas* cinsi içinde 160 tür bulunur ve bunların içinden 12' si klinik öneme sahiptir [107]. Bilinen tüm türler içerisinde genetik olarak en büyük farklılık gösteren tür *P. stutzeri* olup en az 18 genomuvara sahiptir. Özellikle bitki, toprak, biyoteknoloji ve deniz bilimleri açısından önem taşıyan *P. stutzeri*, *P. fluorescens* ve *P. putida* türlerinde heterojen bir dağılım izlenmektedir. Klinik tıp açısından kısıtlı öneme sahiptirler. Polifazik sınıflandırmadaki ilerlemelere bağlı olarak yeni değişikliklerin ortaya çıkması kaçınılmazdır ve klinik çalışmalar bu değişiklikleri izleyerek bu türleri klinik değeri daha fazla olan diğer *Pseudomonas* türlerinden ayırabilmelidir [107].

Tablo 2.3. *Pseudomonas* spp. Tanımlanmasında Kullanılan Temel Kriterler [108]

Tanımlama aşağıdaki maddeler esas alınarak yapılır:

1. Gram negatif çomak
2. Oksidaz pozitif
3. Tipik koku (üzüm veya sabun benzeri koku)
4. Ayırt edilebilir koloni morfolojisi
 - a. Kanlı ve çikolatamsı agarda metalik parlaklık veren geniş koloniler, mukoid, girintili çıkıntılı, pigmentli (piyosyanin) ve çoğunlukta beta hemoliz yapan koloniler
 - b. MacConkey agarda yeşil pigmentli yada metalik parlaklık gösteren laktoz negatif koloniler

Dikkat edilecek hususlar:

1. Bazı *Aeromonas* izolatları tipik kokuları dışında *P.aeruginosa*'ya benzer ama indol-pozitif olmaları ayırt edicidir (*P. aeruginosa* indol-negatif).
2. Kistik fibrozis hastalarından izole edilen bazı *Burkholderia cepacia* türlerinin morfolojileri *P.aeruginosa*'ya benzer.

Pseudomonas spp. bakterilerinin fosfor, demir ve azota olan ilgileri farklılık göstermektedir. En iyi gelişme gösterdikleri sıcaklık 28 °C olarak belirlenmiştir. Oksidaz testlerinde farklı reaksiyon verebilirlerken katalaz testleri pozitif olarak belirlenmiştir. Floresan(+) *Pseudomonas* spp.'lar piyoverdin pigmenti üretmeleriyle pigmentli yapıya sahip olurken floresan olmayan türlerde de pigmentsiz yapı gözlenir [109]. *Pseudomonas* spp. türlerinin çoğu glukoz, fruktoz, galaktoz ve L-arabinozu gelişimleri için kullanırlar [110].

Jessen O. en az 5 tip *P. aeruginosa* morfolojisi tanımlamıştır [111]. Bunlar:

- 1-) Yuvarlak düzgün, parlak ve dışbükey olan koloniler yarı saydam, homojen ve beyazımsı-gri renklidirler. Bu tarz koloniler nemli ve gevşektir.

- 2-) Düzensiz, girintili çıkıntılı koloniler,
- 3-) Kuru, yassı ve dairesel olan koloni morfolojisinde ise bakteriler opak ve granüllüdürler.
- 4-) Mukoid koloniler ise genellikle diğer koloni tiplerinden daha büyük ve dış bükeydirler. Düzgün, nemli ve parlak yüzeyleri vardır. Bunlar da hemen her zaman opak, homojen ve beyazımsı veya gri-yeşil renktedirler.
- 5-) Buruşuk koloniler diğer koloni tiplerinden daha küçük, dairesel ve kuru yüzeylidirler. Bu tarz koloniler opak, granüllü gri ve yeşildir.



Resim 2.3. Koyun kanlı agarda *Pseudomonas aeruginosa* koloni morfolojisi [112]

Pseudomonas spp.lar zorunlu aerobdur. Organik üreme faktörlerine ihtiyaçları yoktur. Hafif alkali ortam üremelerini kolaylaştırır. Genellikle kanlı agarda beta hemoliz yaparlar (Resim 2.5), tipik yeşil metalik parlaklık oluştururlar. MacConkey Agar'da mavi-yeşil röfle vererek ürerler. İzolasyon sırasında ekim yapılmış besiyerleri 24-48 saat inkübe edilirler [107].

Birçok *Pseudomonas* türü pigment üretir [111]. Pyoverdin (yeşil-sarı) ve piyosiyanın (mavi) adı verilen floresan pigmentler nötral ve alkali pH'da mavi veya yeşilimsi mavi olarak görülürler. '**Aeruginosa**' adı bu pigmentten ileri gelmektedir. Söz konusu pigmentler uzun dalga boylu UV ışığında (Wood lambası ile) floresan verirler. Bunun yanında piyorubin (koyu kırmızı) veya piyomelanin (kahverengi-siyah) pigmentleri yapan suşlar da vardır. Piyosiyanın varlığı *P. aeruginosa* için özgün, ayırıcı bir özelliktir. Ayrıca kültürdeki tatlı üzüm benzeri koku da *P. aeruginosa*'yı tanımlamada ve doğrulamada aynı derecede özgündür. Bu kokuyu 2-aminoasetofenon vermektedir [111, 113].

Pseudomonas suşlarında da bulunan bakteriosinler, bakteriler tarafından üretilen ve aynı türün diğer suşları üzerinde letal etki gösteren enzimlerdir. *Pseudomonas* türlerinin çoğunda antibakteriyel ajanlara karşı direnç vardır. Antibiyotik ve ilaç duyarlılığı pratikte yeni türlerin tanımlanması için önem arz etmektedir [114].

3. BÖLÜM

MATERYAL - METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar

Atık su arıtma tesisinin giriş havuzu, kum ve yağ tutucu havuz, havalandırma havuzu, çökeltme havuzu ve çıkış havuzu olarak belirlenen beş farklı noktasından alınan su numunelerinden izole edilen ve tanımlanan 22 adet *Pseudomonas aeruginosa*, 11 adet *Pseudomonas stutzeri* ve 7 adet *Pseudomonas mendocina* izolatları çalışmada kullanılmıştır.

3.1.2. *Pseudomonas* spp. üretimi, muhafazası ve metal deneylerinde kullanılan besiyerleri

Atık sudan *Pseudomonas* spp. izolatlarını elde etmek, tanımlamak, elde edilen bakterileri muhafaza etmek, metallere maruz bırakmak için aşağıdaki besiyerleri belirtildiği şekilde hazırlanarak çalışmada kullanılmıştır.

a) *Pseudomonas* Agar F (base) (Merck KGaA)

Ticari olarak temin edilen *Pseudomonas* agar' ın 35 g'ı 1000 ml deiyonize suda çözülmüş; 10 gram gliserol ilave edilmiş; 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril petri kaplarına 4 mm kalınlığında dökülmüştür. Besiyerleri ve karışım oranları Tablo 3.1' de gösterilmiştir.

b) Nutrient broth (Merck KGaA)

Ticari olarak temin edilen nutrient broth'un 8 g'ı 1000 ml distile suda çözülerek 121 °C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Steril olan sıvı besiyeri 10 ml şeklinde steril cam tüplere dökülmüştür. Besiyerleri ve karışım oranları Tablo 3.1' de gösterilmiştir.

c) Nutrient agar (Merck KGaA)

Ticari olarak temin edilen nutrient agar'ın 20 g'ı 1000 ml distile suda çözülerek 121 °C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Steril petri kaplarına ve yatık agar hazırlamak için steril cam tüplere dökülmüştür.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve çözelti derişimleri

| Besiyerleri | Çözelti derişimleri |
|---|---|
| <i>Pseudomonas</i> agar F (base) (Merck KGaA) | 35 g besiyeri/1000 ml deiyonize su + 10 ml gliserol |
| Nutrient broth (Merck KGaA) | 8 g besiyeri/1000 ml deiyonize su |
| Nutrient agar (Merck KGaA) | 20 g besiyeri/1000 ml deiyonize su |

3.1.3 Çalışmada kullanılan metaller

Çalışmada Nikel(II) ve Kurşun(II) metallerinin tuz formları kullanılmıştır. Aşağıda kullanılan metaller ve tuz bileşiklerinin moleköl ağırlıkları verilmiştir.

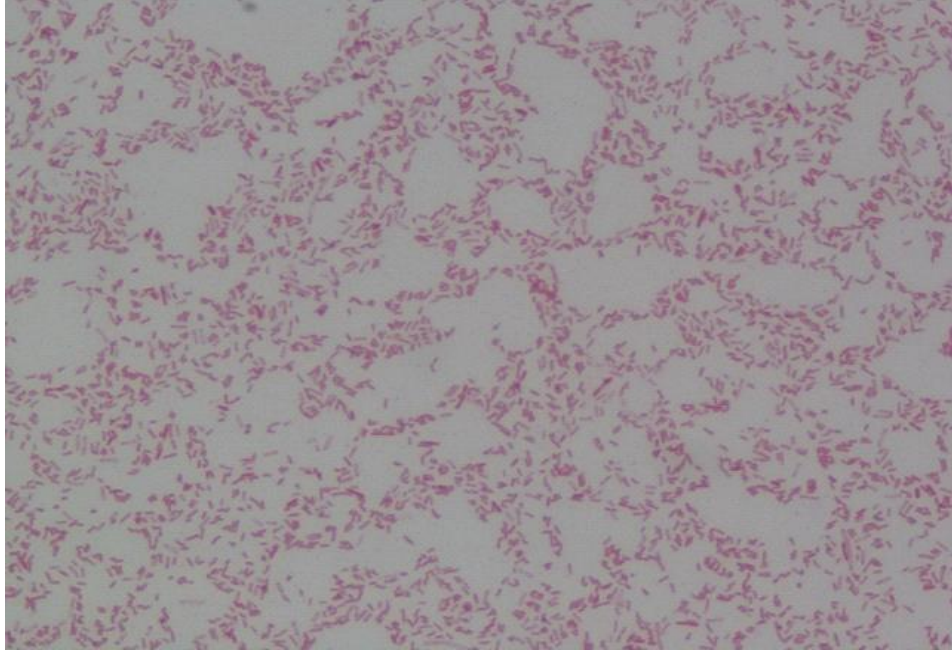
Tablo 3.2. Kullanılan metaller, tuz bileşiklerinin kimyasal formülleri ve moleköl ağırlıkları

| Kullanılan Metaller | Metal moleköl ağırlığı | Tuz bileşğinin Moleköl ağırlığı | Tuz bileşğinin kimyasal formülü |
|---------------------|------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Nikel(II) (Ni) | 58,6934 | 129,5994 | NiCl ₂ |
| Kurşun(II) (Pb) | 207,19 | 278,096 | PbCl ₂ |

3.2. Metot

3.2.1. Atık sudan *Pseudomonas* spp. izolasyonu

Atık su arıtma tesisinde bulunan arıtma işlemlerinin herbir basamağına ait havuzlardan alınan su numuneleri her bir petriye bir ml olacak şekilde dökme plak yöntemiyle *Pseudomonas* agara ekilmiştir. 37 °C’de 24 saat inkübasyon sonrasında uygun koloniler alınarak tekrar Nutrient agara tek koloni yöntemiyle ekim yapılmıştır. 37 °C’de 24 saat inkübasyon sonrasında gram boyama yapılarak saf koloniler görüntülenmiş, sonrasında VITEK 2 Compact 30 (Biomerieux) cihazında otomatik olarak tanımlanmıştır.



Resim 3.1. *Pseudomonas aeruginosa* BK40 numaralı izolatin gram boyanmış mikroskop görüntüsü

3.2.2. İzolatların muhafazası

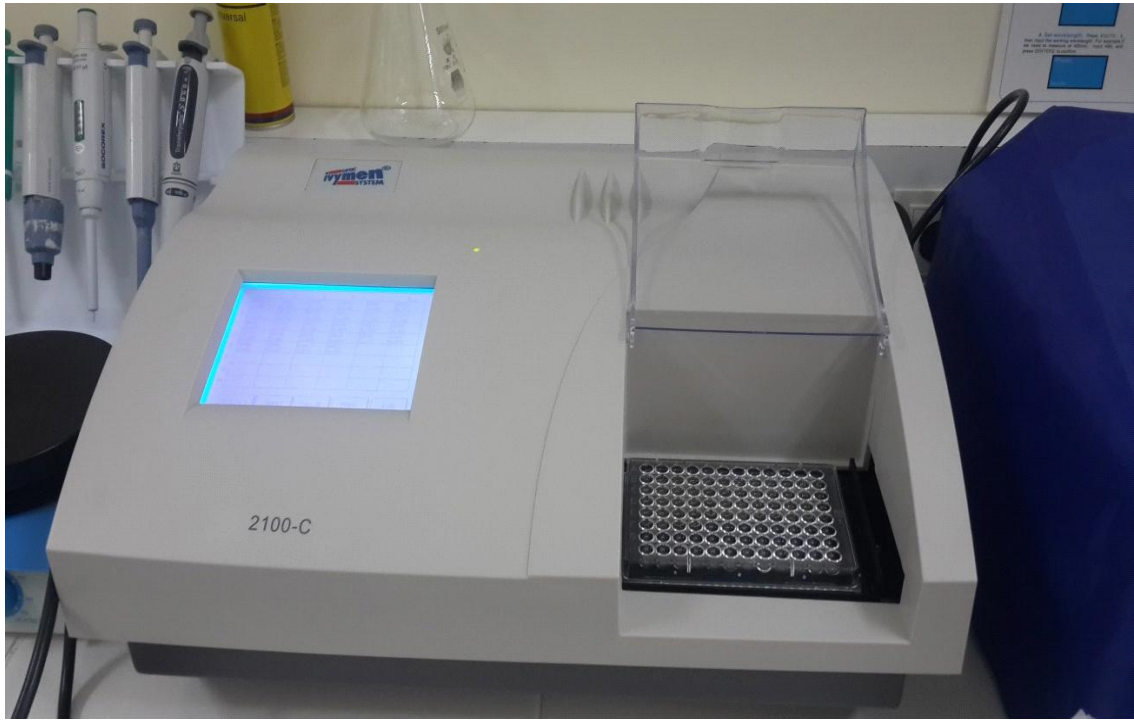
Nutrient agardan steril cam tüplere yatık agar hazırlanmıştır. Tanımlanan bakterilerden Nutrient brotha ekim yapılmıştır. Nutrient brotha yapılan ekimlerin 24 saatlik inkubasyonu sonrasında izolatların yatık agara transferi yapılarak +4 °C de 3 ay süre ile muhafazası sağlanmıştır. Nutrient broth ekimlerinden 1 ml alınarak steril ependorfların içerisinde 1ml gliserol ile karıştırılmış ve -18 °C' de 1 yıl süre ile muhafaza edilebilmiştir.

3.2.3. Metallerin sulu çözeltilerinin hazırlanması

Kurşun(II) ve Nikel(II) metallerinin tuzlarından kurşun için 4000 ppm , nikel için 2000 ppm derişimlerinde ana stoklar hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin hazırlanması sırasında tuz formlarının kimyasal formülleri dikkate alınarak hesaplamalar yapılmış, gerekli miktarlar hassas terazide tartılarak saf su içerisinde çözülmüştür. Çalışma süresince farklı derişimlerde kullanılan ara stoklar bu ana stok çözeltilerden seyreltmeler yapılarak elde edilmiştir.

3.2.4. İzolatların metal toleranslarının tespiti

Yatık agarda +4 °C’ de bulunan izolatlar, 5 ml nutrient broth besiyeri içerisinde 37 °C’ de 24 saat inkübe edilmiştir. Aktifleşen izolatların hücre yoğunlukları McFarland cihazı ile ölçülmüş ve steril besiyeri ilavesi ile biyokütleleri eşitlenmiştir. Metal tolerans tespiti için Kurşun(II) ve Nikel(II) metallere 200 ppm’ lik ara stok çözeltileri kullanılmıştır. İzolatların besiyeri ve metal çözeltilerinin kullanılacak hacimleri hesaplanırken besiyerinde bulunan metal miktarı 50 ppm olacak şekilde hazırlanmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonrasında eşit şartlarda metale maruz bırakılan izolatların biyokütle yoğunlukları 630 nm’de Mikroplate okuyucuda (IVYMAN 2100-C) tespit edilmiştir. Belirlenen değerler ile metalsiz ortamda inkübe edilen izolatların hücre yoğunluk değerleri kullanılarak % ölüm değerleri hesaplanmıştır. Herbir metal için en dirençli beş izolat ile çalışmaya devam edilmiştir.



Resim3.2. Mikroplate okuyucu (IVYMAN 2100-C)

3.2.5. Seçilen izolatların belirlenen metal derişimindeki direnç tespiti

Kurşun(II) metaline olan dirençlerini belirlemek için *Pseudomonas aeruginosa* BK1, *Pseudomonas aeruginosa* BK3, *Pseudomonas aeruginosa* BK4, *Pseudomonas aeruginosa* BK14, *Pseudomonas stutzeri* BK37 izolatları 50-100-200-400 ppm kurşun içeren besiyerlerinde 37 °C’ de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İzolatların Nikel(II) metaline olan dirençlerini tespit etmek için ise *Pseudomonas stutzeri* BK8,

Pseudomonas aeruginosa BK21, *Pseudomonas stutzeri* BK23, *Pseudomonas stutzeri* BK32 ve *Pseudomonas aeruginosa* BK40 izolatları 50-100-200-400 ppm nikel içeren besiyeri ortamlarında 37 °C' de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 1., 2. , 4. , 8. , 12. , 16., 20. ve 24. saatlerinde herbir izolata ait besiyerinden numuneler alınarak 630 nm'de Mikroplate okuyucu ile örneklerin biyokütle yoğunlukları ölçülmüştür. Bu değerler ve metalsiz besiyeri ortamında çoğalan mikroorganizma yoğunluk değerleri kullanılarak, % ölüm değerleri hesaplanmıştır.

3.2.6. LC50 tayin metodu

LC₅₀ tayin metodu ile 24 saatte belirli derişimde metal içeren besiyeri ortamında çoğalan izolatların %50'sini öldüren metal miktarı hesaplanmıştır. Canlı hücrelerin % 50'sini öldüren metal dozları (LC₅₀), metale maruz kalan hücrelerin yirmi dördüncü saate ait % ölüm değerleri kullanılarak çizilen grafiklerin denklemlerinden faydalanılarak hesaplanmıştır. LC₅₀ değeri en yüksek olan izolatlar ile biyobirikim deneyleri yapılmıştır.

3.2.7. Biyobirikim deneyleri

Kurşun (II) metalinde biyobirikim çalışmaları *Pseudomonas aeruginosa* BK14 izolatu ile, Nikel(II) metalinde biyobirikim çalışmaları *Pseudomonas stutzeri* BK23 izolatu ile yapılmıştır. *Pseudomonas aeruginosa* BK14 izolatu 204,3 ppm Kurşun(II) içeren besiyeri ortamında, *Pseudomonas stutzeri* BK23 izolatu 186,2 ppm Nikel(II) içeren besiyeri ortamında 37 °C' de 24 saat inkübe edilmiştir. 10., 30. dakikalarda ve sırası ile 1. , 2., 4., 8., 12., 16., 20. ve 24. saatlerde besiyeri ortamından numuneler alınarak metal birikiminin yeri ve miktarı belirlenmiştir.

3.2.7.1 Besiyerinde kalan metal miktarı

Besiyeri ortamında kalan metal miktarının tespiti için tabloda belirtilen saat dilimlerinde, Kurşun(II) ve Nikel(II) için ayrı hazırlanan inkübasyondaki kültür ortamlarından örnekler alınmıştır. Vortekslenerek homojenizasyonu sağlanan örneklerden steril pipet yardımıyla 1 ml alınmış; steril bir tüpe aktarılarak 10 000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilmiş, üstte kalan sıvı biyokütleden arındırılmak amacı ile 0,45 mikrometre por çapına sahip filtreden süzülerek filtrattaki Kurşun(II) ve Nikel(II) miktarı 1/100 oranında dilüsyon sonrasında ICP-MS cihazında tespit edilmiştir.

3.2.7.2. Hücre yüzeyinde emilim-tutunma

Hücre dışı birikimi belirlemek için; santrifüj işlemi sonrasında çökelen hücrelerin üzerine 1 ml 10 mM EDTA (Merck) çözeltisi eklenerek 2500 devirde 3 dakika vortekslenmiş; hücre yüzeyine tutunan metallerin desorbsiyonu sağlanmıştır. Numuneler 10 000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilmiş, üstte kalan sıvı 0,45 µm por çapına sahip filtreden süzülerek filtrattaki Kurşun(II) ve Nikel(II) miktarı 1/100 oranında dilüsyon sonrasında ICP-MS cihazında ölçülmüştür.

3.2.7.3. Hücre içinde birikim

Hücre içine alınan metal birikiminin belirlenmesinde bir önceki aşamada santrifüj sonrasında dibe çöken hücrelerin üzerine 1 ml 1M HNO₃ ilave edilerek 2 500 devirde 3 dakika vortekslenmiş; 10 000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilmiş, üstte kalan sıvı 0,45 µm por çapına sahip filtreden süzülerek filtrattaki Kurşun(II) ve Nikel(II) miktarı 1/100 oranında dilüsyon sonrasında ICP-MS cihazında ölçülmüştür.

3.2.8. İstatistiksel veri

Çalışmalar sonunda elde edilen veriler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 21,0 programı kullanılarak analiz edilmiştir. Analizler, uygun tanımlayıcı istatistiklerle (sayı, yüzde olarak) sunulmuştur. Tüm deneyler iki paralel olarak çalışılmış ve ortalama sonuçlar verilmiştir.

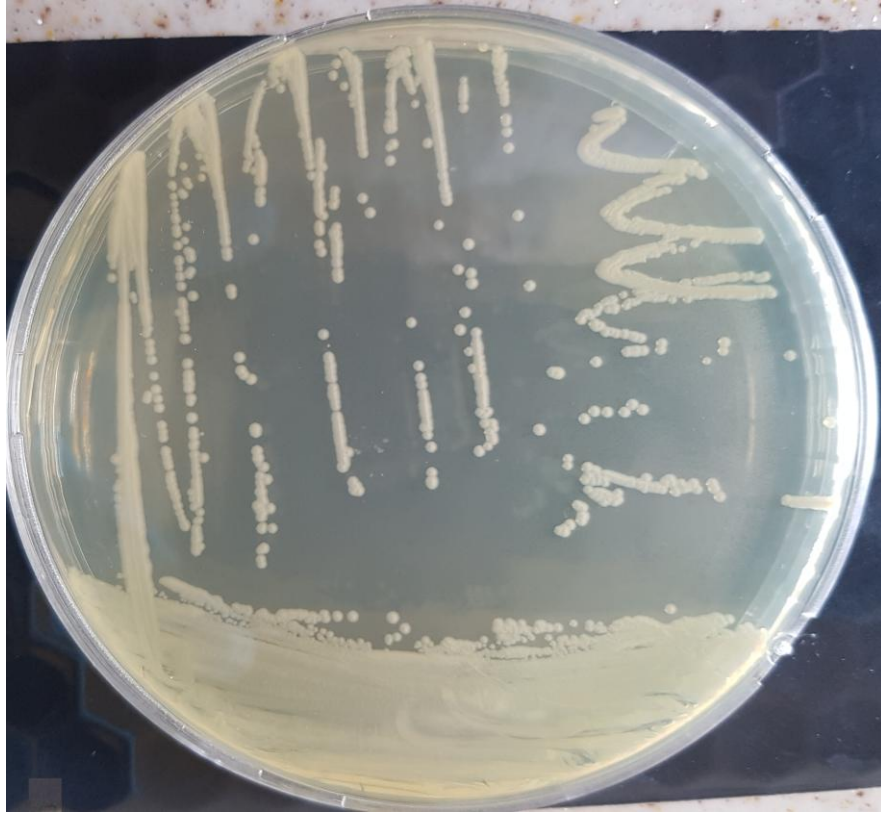
4.BÖLÜM

BULGULAR

Bu çalışmada atık sulardan izole edilen *Pseudomonas* spp. ların Kurşun(II) ve Nikel(II) metallerine olan dirençliliği ve bölgelerine göre metal birikimleri incelenmiştir.

4.1. Atık Sulardan *Pseudomonas* spp. İzolasyonu

Atık su arıtma tesisinde bulunan arıtma işlemlerinin her bir basamağına ait havuzlardan alınan su numuneleri her bir petriye bir ml olacak şekilde, dökme plak yöntemiyle, *Pseudomonas* agara ekilmiştir. 37 °C’ de 24 saat inkübasyon sonrasında kırık beyaz, yeşilimsi renkte, kıvamlı, yuvarlak, karakteristik kokusu olan *Pseudomonas* kolonileri tekrar Nutrient agar dökülmüş petrilere tek koloni yöntemiyle ekilmiştir. Resim 4,1’ de Nutrient agar besiyerindeki koloni morfolojileri gösterilmiştir. 37 °C’de 24 saat inkübasyon sonrasında tek düşen kolonilerden öze yardımı ile örnekler alınarak gram boyama yapılmış; saf, gram negatif *Pseudomonas* kolonileri görüntülenmiştir.



Resim 4.1. *Pseudomonas aeruginosa* BK1 izolatının Nutrient agardaki koloni morfolojisi

4.2. İzolatların Tanımlanması

Nutrient agara ekilmiş tek kolonilerden öze yardımı ile alınarak VITEK 2 Compact 30 (biomerieux) cihazının çalışma prosedürüne uygun solüsyonda çözülmesi sağlanmıştır. Vortekslelendikten sonra bulanıklığı McFarland cihazında çalışma prosedürüne göre ayarlanmış ve VITEK 2 Compact 30 (Biomerieux) cihazına (Resim 4.2) ait GN (gram negatif izolatlar için çalışma kartı) kartlarına yükleme yapılarak tanımlamalar yapılmıştır. Bu çalışmaya ait sonuçlar Tablo 4.1’de verilmiştir. Tanımlanan 40 izolatın 22 tanesinin *Pseudomonas aeruginosa*, 11 tanesinin *Pseudomonas stutzeri*, 7 tanesinin de *Pseudomonas mendocina* olduğu tespit edilmiştir.



Resim 4.2 VITEK 2 Compact 30 (Biomerieux)

Tablo.4.1. İzolat numaraları, su numunesinin alındığı havuz (lokalite), gram boyama ve tanımlama sonuçları

| İZOLAT NO | LOKALİTE | GRAM BOYAMA | TÜR İSİMLERİ |
|-----------|--------------|-------------|-------------------------------|
| BK1 | Giriş Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| BK2 | Giriş Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| BK3 | Giriş Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| BK4 | Giriş Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| BK5 | Giriş Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| BK6 | Giriş Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |

| | | | |
|------|-------------------------|----------|-------------------------------|
| BK7 | Giriş Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| BK8 | Giriş Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas stutzeri</i> |
| BK9 | Çökeltim Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas stutzeri</i> |
| BK10 | Çökeltim Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| BK11 | Çökeltim Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| BK12 | Çökeltim Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| BK13 | Çökeltim Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| BK14 | Çökeltim Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| BK15 | Çökeltim Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| BK16 | Çökeltim Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas mendocina</i> |
| BK17 | Çökeltim Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas stutzeri</i> |
| BK18 | Çökeltim Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas stutzeri</i> |
| BK19 | Kum ve Yağ Tutucu Havuz | Gram (-) | <i>Pseudomonas stutzeri</i> |
| BK20 | Kum ve Yağ Tutucu Havuz | Gram (-) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| BK21 | Kum ve Yağ Tutucu Havuz | Gram (-) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| BK22 | Kum ve Yağ Tutucu Havuz | Gram (-) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| BK23 | Kum ve Yağ Tutucu Havuz | Gram (-) | <i>Pseudomonas stutzeri</i> |
| BK24 | Kum ve Yağ Tutucu Havuz | Gram (-) | <i>Pseudomonas stutzeri</i> |
| BK25 | Havalandırma Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas mendocina</i> |
| BK26 | Havalandırma Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas mendocina</i> |
| BK27 | Havalandırma Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas mendocina</i> |
| BK28 | Havalandırma Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas mendocina</i> |
| BK29 | Havalandırma Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| BK30 | Havalandırma Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| BK31 | Havalandırma Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas stutzeri</i> |
| BK32 | Havalandırma Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas stutzeri</i> |
| BK33 | Çıkış Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas mendocina</i> |
| BK34 | Çıkış Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| BK35 | Çıkış Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| BK36 | Çıkış Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| BK37 | Çıkış Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas stutzeri</i> |
| BK38 | Çıkış Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas stutzeri</i> |
| BK39 | Çıkış Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas mendocina</i> |
| BK40 | Çıkış Havuzu | Gram (-) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |

4.3. İzolatların Metal Toleranslarının Tespiti

Yatık agarda +4 °C' de bulunan izolatların herbiri 5 ml nutrient broth besiyerine ekilmiş; 37 °C' de 24 saat inkübe edilmiştir. Aktifleşen izolatlara ait herbir tüpten numune alınarak hücre yoğunlukları McFarland cihazı (Resim 4.3) ile ölçülmüş ve steril besiyeri ilavesi ile biyokütle yoğunlukları 1 değerine eşitlenmiştir.



Resim 4.3. McFarland cihazı, Densicheck plus (Biomérieux)

İzolatların besiyeri ve metal çözeltilerinin kullanılacak hacimleri hesaplanırken Kurşun(II) ve Nikel(II) metallerinin 200 ppm' lik ara stok çözeltileri kullanılmış; besiyerinde bulunan metal derişimi 50 ppm olacak şekilde çalışma yapılmıştır. 24 saatlik 37 °C' deki inkubasyon sonrasında eşit şartlarda aynı derişimde Kurşun(II) ve Nikel(II)'e ayrı ayrı maruz kalan izolatların biyokütle yoğunlukları 630 nm'de Mikroplate okuyucuda tespit edilmiştir. Belirlenen değerler ve herbir izolatin metalsiz olarak aynı hacimlerdeki inkübasyonu sonrasındaki kontrol ekimlerinin biyokütle yoğunluk değerleri kullanılarak hesaplanan % ölüm değerleri Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2. İzolatların 50 ppm Kurşun(II) ve Nikel(II) derişimindeki % ölüm değerleri

| İzolat numaraları | Kurşun(II) (% ölüm) | Nikel(II) (% ölüm) |
|------------------------------------|------------------------|-----------------------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK1 | 3,01±0,35 | 4,54±0,22 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK2 | 36,6±2,81 | 18,5±2,52 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK3 | 1,07±0,40 | 12,25±2,04 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK4 | 2,56±0,42 | 9,50±1,83 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK5 | 22,09±2,40 | 43,64±3,90 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK6 | 19,54±1,82 | 64,02±4,72 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK7 | 36,42±2,82 | 43,09±4,11 |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> BK8 | 46,98±3,12 | 3,95±0,34 |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> BK9 | 14,32±1,93 | 57,31±5,12 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK10 | 32,65±4,05 | 13,2±1,60 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK11 | 12,3±3,18 | 38,16±4,17 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK12 | 40,8±4,22 | 49,07±5,39 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK13 | 14,67±2,44 | 27,62±2,33 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK14 | 0,31±0,10 | 13,81±1,86 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK15 | 7,16±0,63 | 42,72±2,71 |
| <i>Pseudomonas mendocina</i> BK16 | 40,59±3,92 | 10,99±0,90 |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> BK17 | 35,18±3,06 | 15,61±1,33 |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> BK18 | 15,04±2,87 | 10,91±1,25 |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> BK19 | 41,76±3,44 | 43,9±4,34 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK20 | 10,24±2,14 | 28,06±3,38 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK21 | 19,19±2,26 | 1,71±0,21 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK22 | 27,52±3,50 | 6,85±0,65 |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> BK23 | 3,60±0,33 | 1,06±0,11 |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> BK24 | 9,59±0,71 | 22,14±1,36 |
| <i>Pseudomonas mendocina</i> BK25 | 6,43±1,18 | 31,71±1,73 |
| <i>Pseudomonas mendocina</i> BK26 | 7,13±1,42 | 13,61±1,03 |
| <i>Pseudomonas mendocina</i> BK27 | 3,92±0,21 | 13,45±1,22 |
| <i>Pseudomonas mendocina</i> BK28 | 11,97±2,60 | 36,58±2,90 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK29 | 28,51±2,90 | 48,22±3,52 |

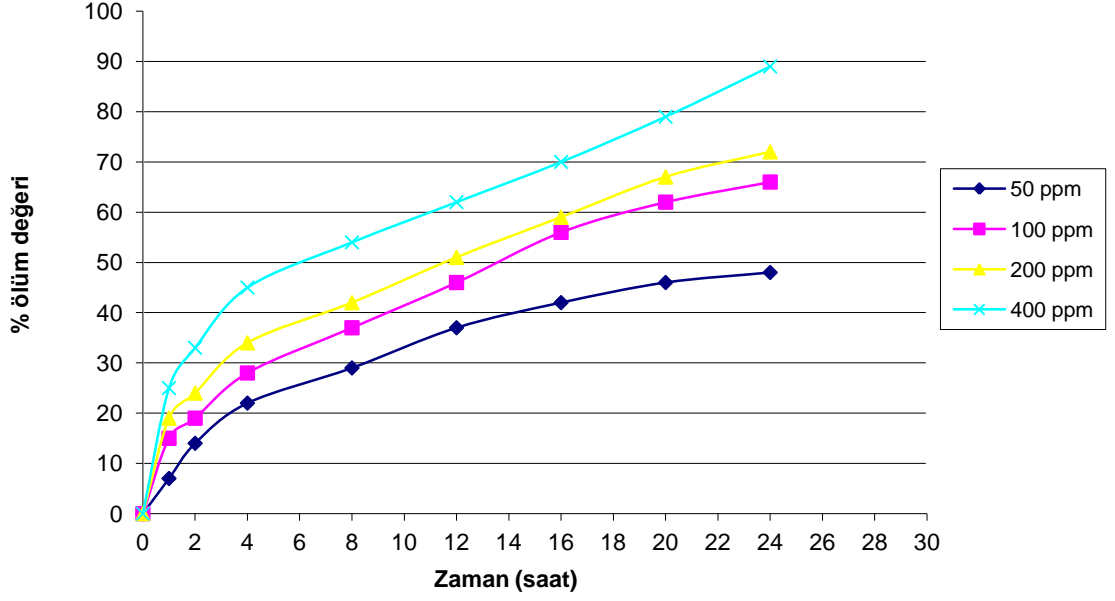
| | | |
|------------------------------------|------------|------------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK30 | 30,16±3,96 | 4,64±0,56 |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> BK31 | 9,52±2,22 | 9,73±1,36 |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> BK32 | 13,19±2,14 | 3,03±0,42 |
| <i>Pseudomonas mendocina</i> BK33 | 18,54±2,34 | 14,14±2,20 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK34 | 42,03±5,06 | 4,72±0,57 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK35 | 58,86±5,30 | 28,74±2,83 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK36 | 21,75±4,44 | 13,87±1,35 |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> BK37 | 2,14±0,33 | 23,08±2,07 |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> BK38 | 17,95±2,41 | 66,08±4,97 |
| <i>Pseudomonas mendocina</i> BK39 | 7,82±1,23 | 15,84±1,56 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK40 | 5,54±1,01 | 2,69±0,30 |

Tablo 4.2’de belirtilen değerler doğrultusunda % ölüm değeri en düşük olan izolatlardan 5 tanesi seçilerek LC₅₀ değeri belirlenmiştir. Bu çalışmada Kurşun(II) için *Pseudomonas aeruginosa* BK1, *Pseudomonas aeruginosa* BK3, *Pseudomonas aeruginosa* BK4, *Pseudomonas aeruginosa* BK14, *Pseudomonas stutzeri* BK37; Nikel(II) için *Pseudomonas stutzeri* BK8, *Pseudomonas aeruginosa* BK21, *Pseudomonas stutzeri* BK23, *Pseudomonas stutzeri* BK32, *Pseudomonas aeruginosa* BK40 en dirençli izolatlar olmuştur. Bu izolatların herbiri önce Nutrient broth içinde 24 saat 37 °C’de aktive edilmiş; sonrasında biyokütle yoğunlukları ölçülmüş; herbir izolatın besiyeri çözeltisine steril besiyeri ilavesi ile biyokütle yoğunluk eşitliği sağlanmıştır. Sonrasında herbir izolat ayrı besiyerlerinde 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 400 ppm derişimlerinde Kurşun(II) ve Nikel(II) metallerine 24 saat boyunca maruz bırakılmıştır.

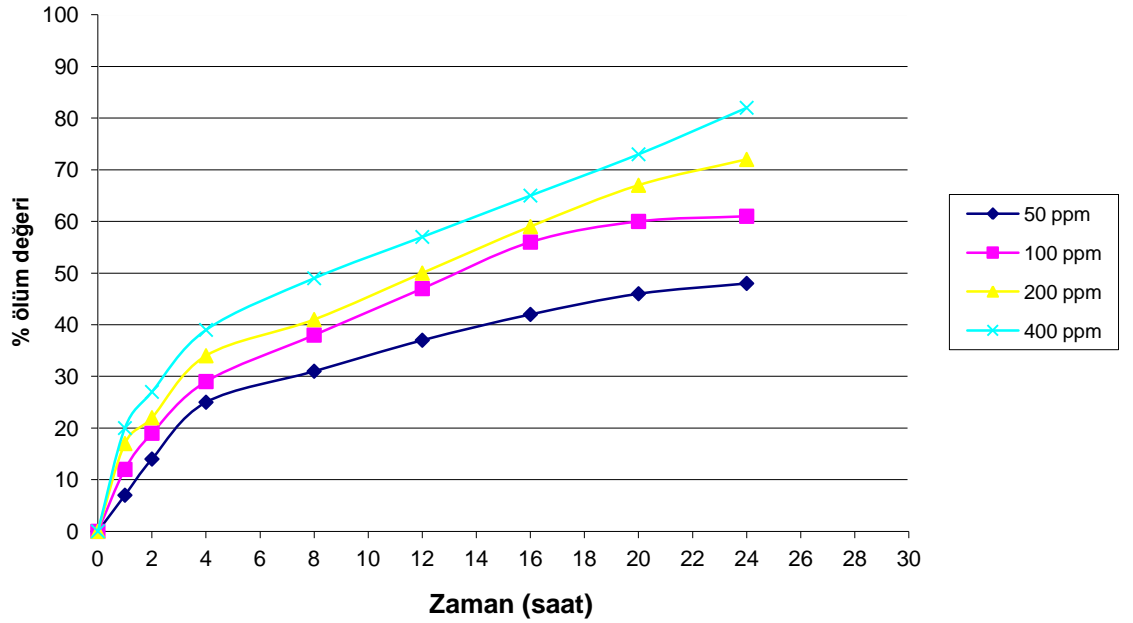
4.4. LC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

Metal konsantrasyonları içeren besiyerlerinde izolatların 24 saatlik inkübasyonu sırasında 1., 2., 4., 8., 12., 16., 20., 24. saatlerdeki biyokütle yoğunlukları ile aynı izolatların metal içermeyen besiyerinde aynı zaman dilimindeki biyokütle yoğunlukları Mikroplate okuyucuda belirlenmiş ve % ölüm değerleri hesaplanmıştır. Bu değerler ve maruz bırakılan derişim miktarları üzerinden doğrusal grafikler ve denklemleri elde edilerek LC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Herbir izolatın 24 saat süresince belirlenen % ölüm değeri ile maruz kaldığı metal konsantrasyonuna ait grafikler aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir.

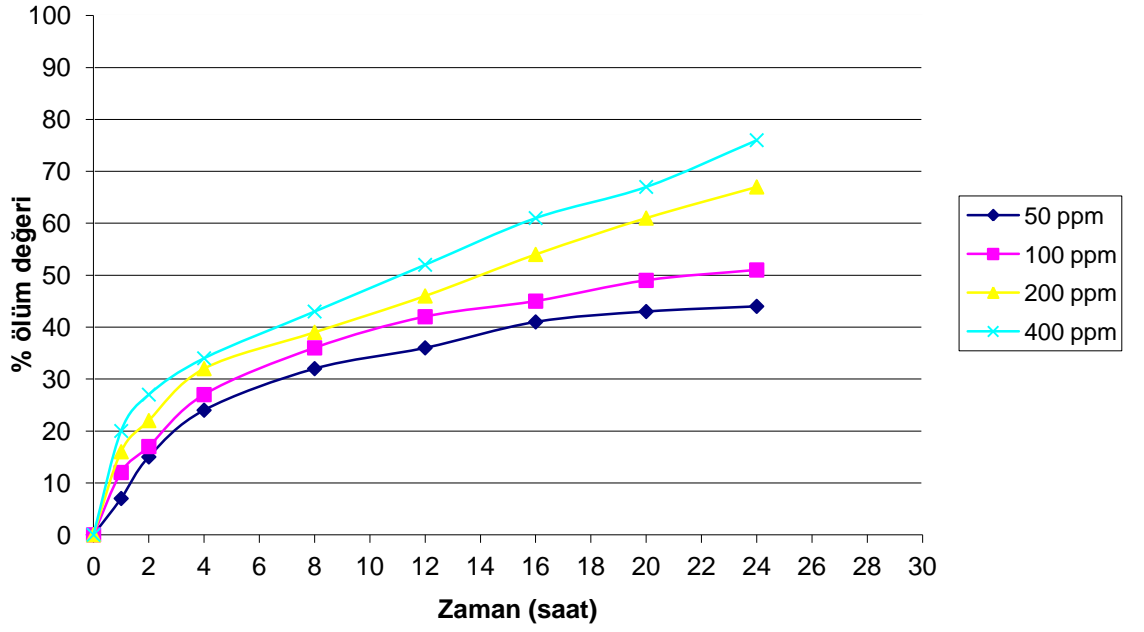
Şekil 4.1-4.5 arasındaki grafikler Kurşun(II) çalışmasına aittir.



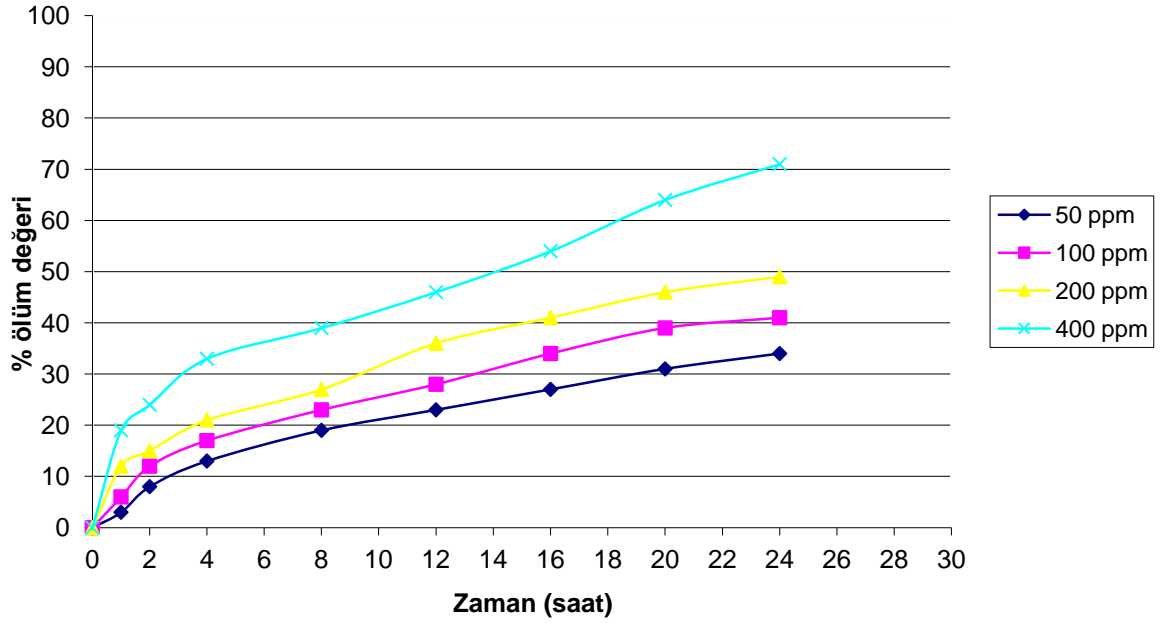
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda Kurşun(II) metaline maruz bırakılan *Pseudomonas aeruginosa* BK1 izolatının % ölüm değerlerinin zamana göre değişimi



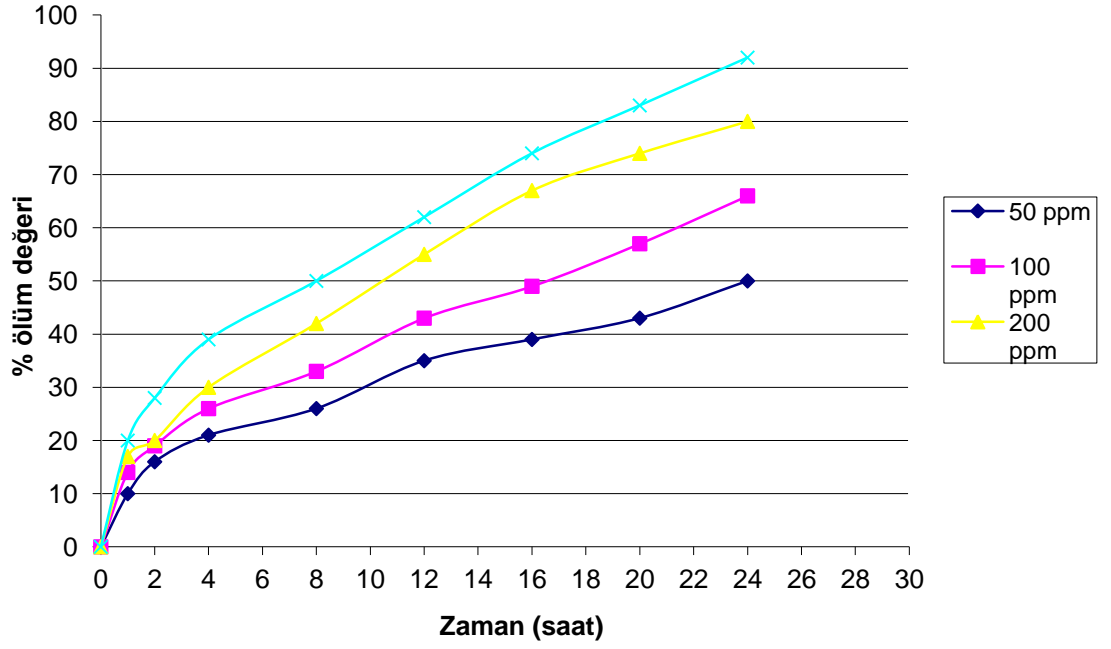
Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda Kurşun (II) metaline maruz bırakılan *Pseudomonas aeruginosa* BK3 izolatının % ölüm değerlerinin zamana göre değişimi



Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda Kurşun (II) metaline maruz bırakılan *Pseudomonas aeruginosa* BK4 izolatının % ölüm değerlerinin zamana göre değişimi

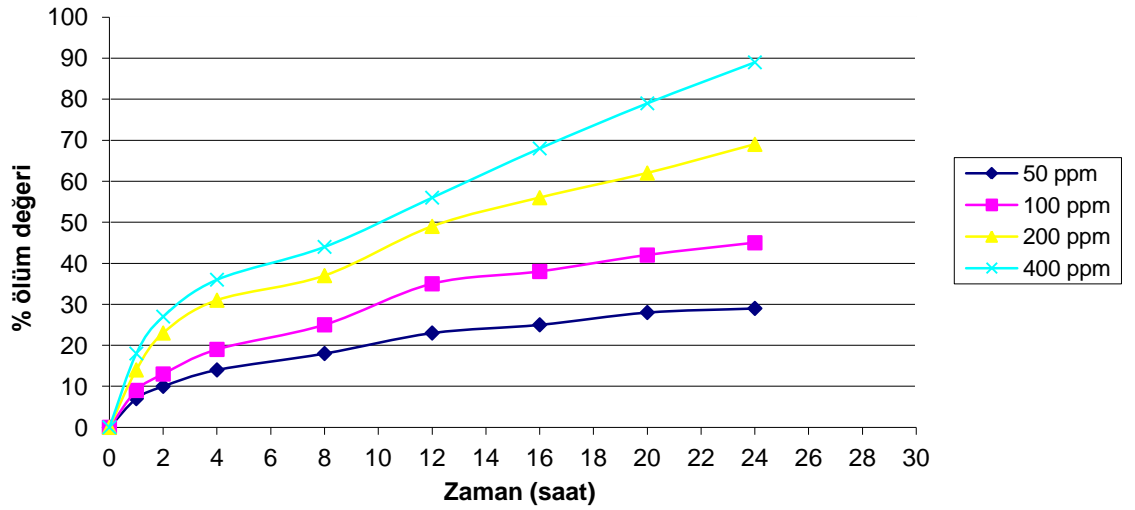


Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda Kurşun (II) metaline maruz bırakılan *Pseudomonas aeruginosa* BK14 izolatının % ölüm değerlerinin zamana göre değişimi

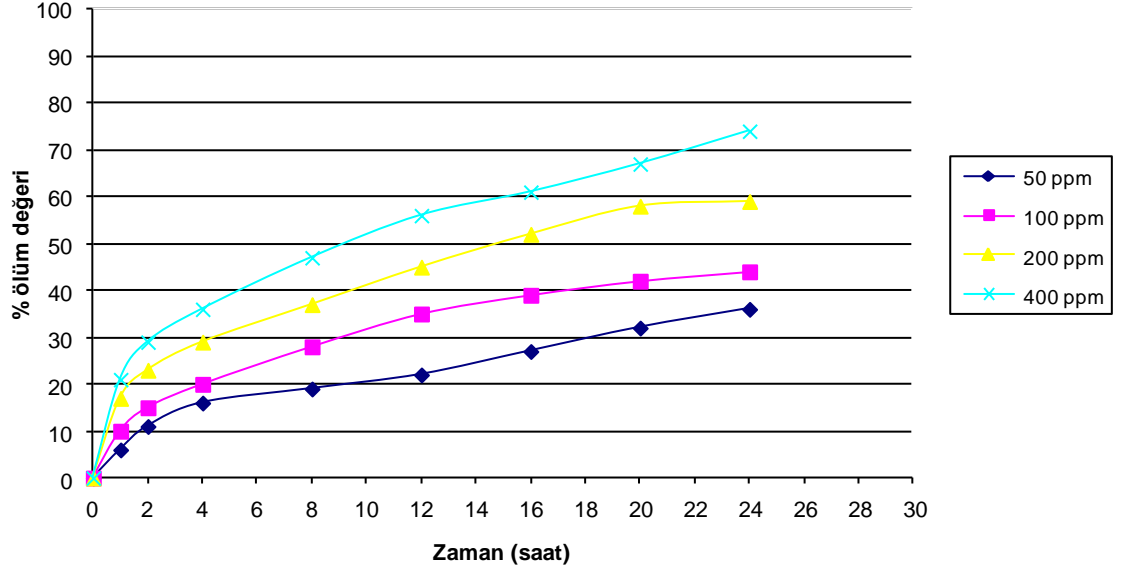


Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlarda Kurşun(II) metaline maruz bırakılan *Pseudomonas stutzeri* BK37 izolatının % ölüm değerlerinin zamana göre değişimi

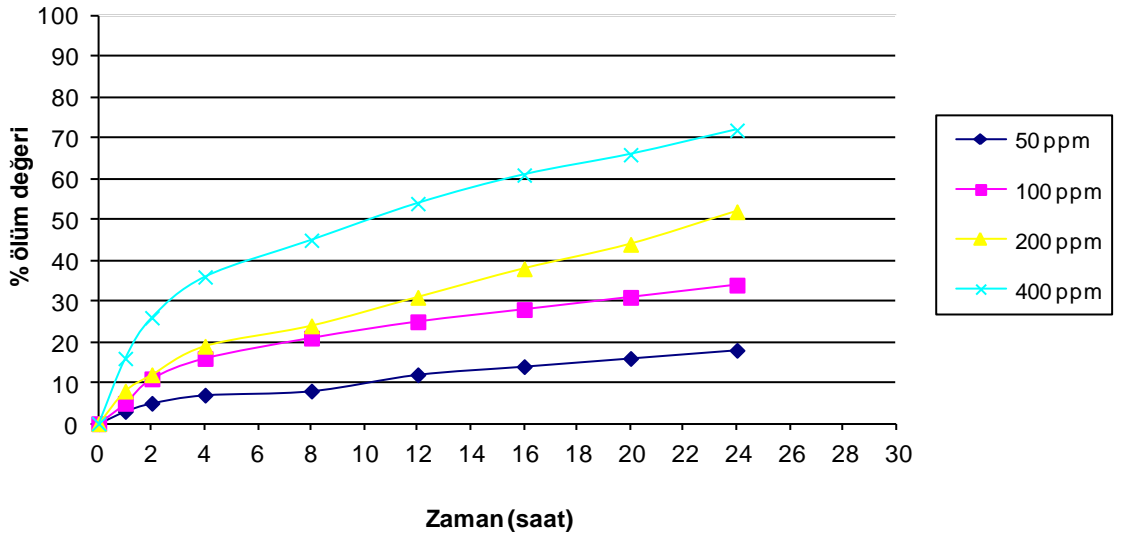
Şekil 4.6-4.10 arasındaki grafikler Nikel(II) çalışmasına aittir.



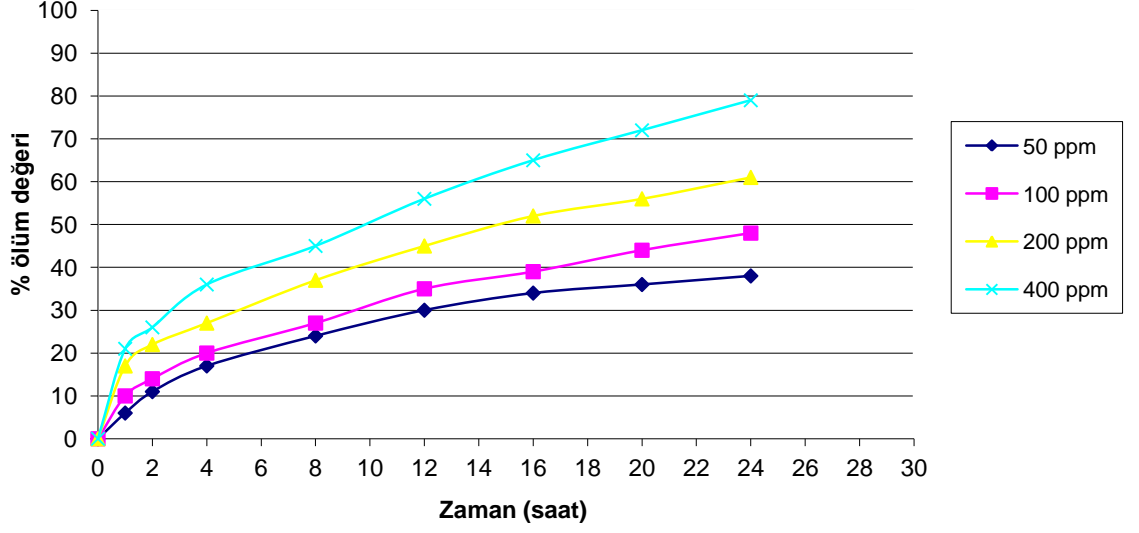
Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda Nikel(II) metaline maruz bırakılan *Pseudomonas stutzeri* BK8 izolatının % ölüm değerlerinin zamana göre değişimi



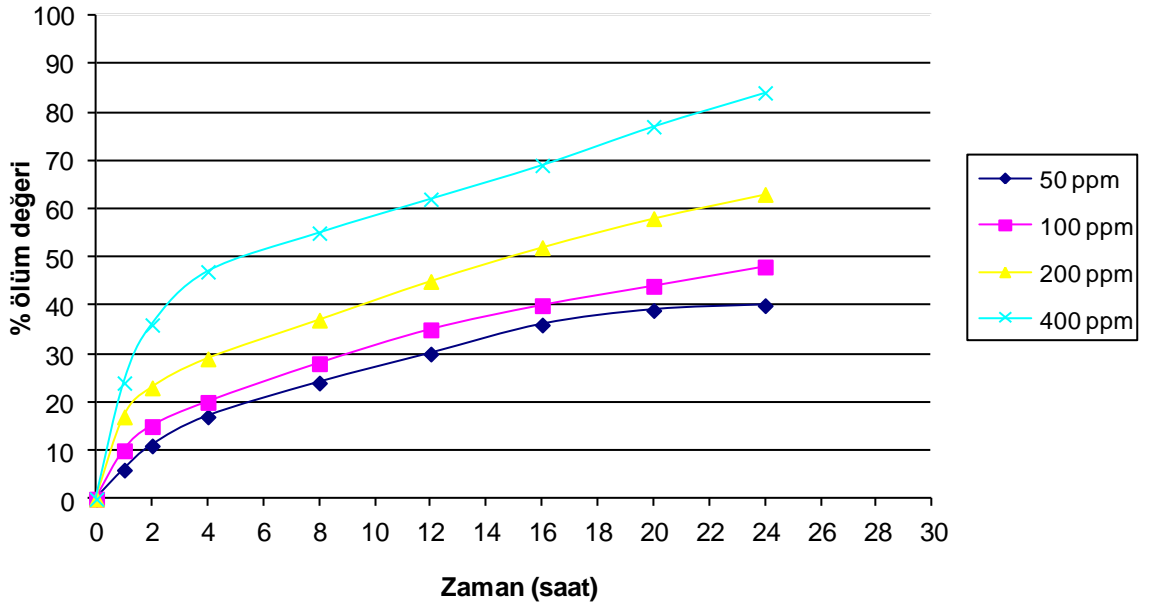
Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda Nikel(II) metaline maruz bırakılan *Pseudomonas aeruginosa* BK21 izolatının % ölüm değerlerinin zamana göre değişimi



Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlarda Nikel(II) metaline maruz bırakılan *Pseudomonas stutzeri* BK23 izolatının % ölüm değerlerinin zamana göre değişimi



Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlarda Nikel(II) metaline maruz bırakılan *Pseudomonas stutzeri* BK32 izolatının % ölüm değerlerinin zamana göre değişimi



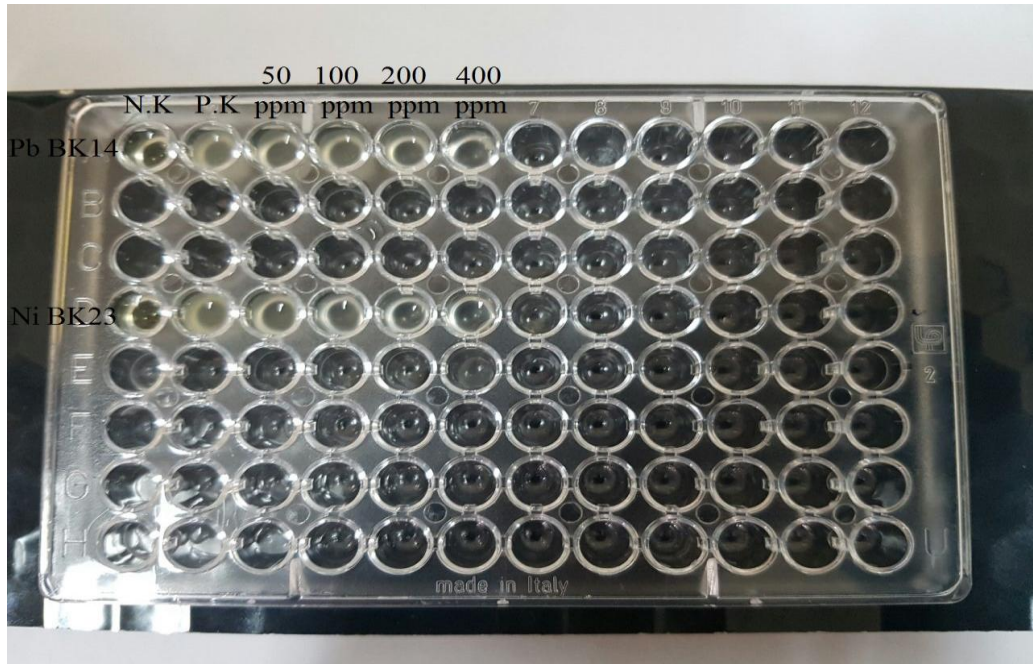
Şekil 4.10. Farklı konsantrasyonlarda Nikel(II) metaline maruz bırakılan *Pseudomonas aeruginosa* BK40 izolatının % ölüm değerlerinin zamana göre değişimi

Herbir izolata ait LC₅₀ değerleri Tablo 4.3'te gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Kullanılan metallere göre izolatlara ait LC₅₀ değerleri

| Kullanılan Metaller | İzolat | LC ₅₀ değeri (ppm) |
|---------------------|------------------------------------|-------------------------------|
| Kurşun(II) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK1 | 154,06±6,93 |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK3 | 147,95±6,11 |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK4 | 181,55±7,93 |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK14 | 204,30±9,20 |
| | <i>Pseudomonas stutzeri</i> BK37 | 174,59±7,74 |
| Nikel(II) | <i>Pseudomonas stutzeri</i> BK8 | 133,64±4,18 |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK21 | 158,9±6,12 |
| | <i>Pseudomonas stutzeri</i> BK23 | 186,21±8,43 |
| | <i>Pseudomonas stutzeri</i> BK32 | 137,96±5,06 |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BK40 | 129,13±3,81 |

Bu sonuçlara göre 24 saat içinde mevcut bakterilerin yarısını öldüren Kurşun(II) konsantrasyon değeri en yüksek izolat *Pseudomonas aeruginosa* BK14 olmuştur. En yüksek Nikel(II) konsantrasyonunda LC₅₀ değerine sahip izolat ise *Pseudomonas stutzeri* BK23 olmuştur. Biyobirikim deneyleri bu iki izolat ile yapılmıştır.



Resim 4.4. Metal tolerans tespiti çalışmasında *Pseudomonas aeruginosa* BK14 ve *Pseudomonas stutzeri* BK23 izolatlarına ait mikroplate görüntüsü

4.5. Biyobirikim Deneyleri

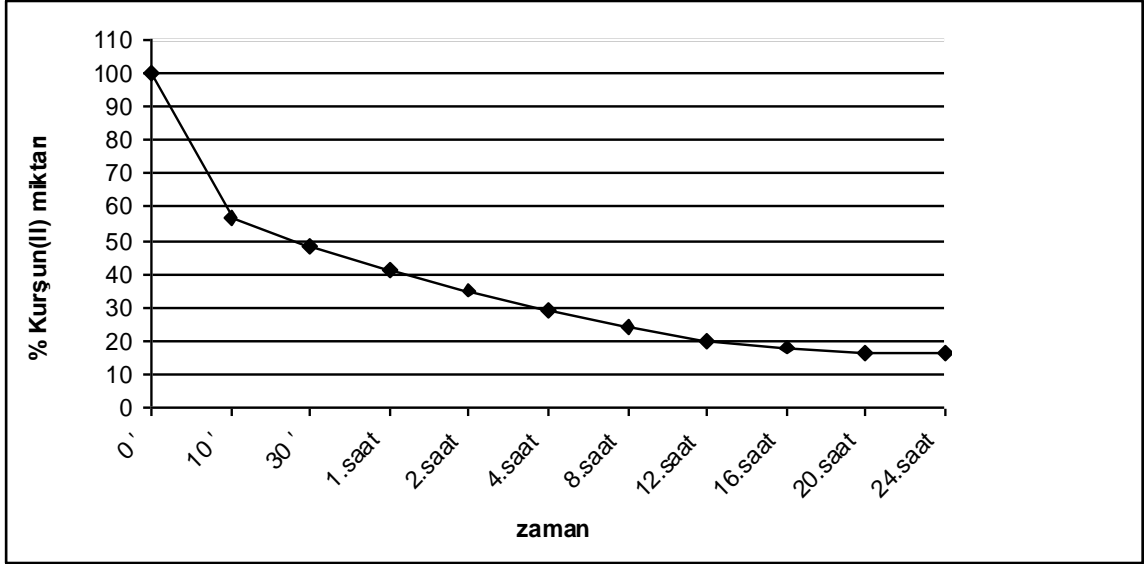
Yatık agarda muhafaza edilen *Pseudomonas aeruginosa* BK14 ve *Pseudomonas stutzeri* BK23 izolatları nutrient broth besiyerinde 37 °C’de 24 saat inkübe edilerek aktive edilmiştir. McFarland değeri 1 olacak şekilde hücre yoğunluğu düzenlenmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* BK14 izolatı 204,30 ppm Kurşun(II) içeren sıvı besiyeri ortamında; *Pseudomonas stutzeri* BK23 izolatı da Nikel(II) konsantrasyonu 186,21 ppm olan sıvı besiyeri ortamında inkübasyona bırakılmıştır. Her iki izolatın 37 °C’deki inkübasyonu sırasında 10., 30., dakikalardaki ve 1., 2., 4., 8., 12., 16., 20., 24. saatlerdeki biyobirikim çalışması yapılmıştır. İki izolatın ayrı kültürlerinden bahsedilen zaman dilimlerinde 1 ml örnek alınarak 10000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilmiş üstte kalan sıvı 0,45 µm por çapına sahip filtreden geçirilerek 0,01 ml (1000 ppm) nitrik asit içeren ependorflara alınmıştır. Daha sonra bu işleme tabi tutulan örneklerin 1/100 oranında seyreltmeleri yapılarak ICP-MS cihazında metal miktarları ölçülmüştür. Santrifüj tüpünün dibinde kalan bakteri kütlelerinin üzerine 10 milimolar 1ml EDTA çözeltisi ilave edilerek vortekslenmiştir. Bu işlem ile bakteri yüzeyine tutunmuş olan metallerin desorbsiyonu sağlanmıştır. Vortekslenen tüp tekrar 10 000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiş, üstte kalan sıvı kısım 0,45 µm por çapına sahip filtreden geçirilerek 0,01 ml (1000 ppm) nitrik asit içeren ependorflara alınmıştır. Tüpün dibinde kalan bakteri kütlelerine bu kez 1 ml 1M HNO₃ ilave edilerek vortekslenmiş; hücrelerin parçalanması ve hücre içine alınan metallerin açığa çıkması sağlanmıştır. Bu sıvı tekrar 10 000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek üstteki sıvı filtrelenmiş; ICP-MS cihazında metal miktarı belirlenmiştir.

4.5.1 Kurşun(II) biyobirikimi

24 saatlik süre ile 204,3 ppm Kurşun(II) içeren besiyerinde 37 °C’de inkübe edilen *Pseudomonas aeruginosa* BK14 kültüründe besiyerinde kalan metal miktarının, hücre yüzeyine adsorplanan metal miktarının ve hücre içine alınan metal miktarının yüzde oranlarının zamanla değişimi Şekil 4.11-4.13’te gösterilmiştir.

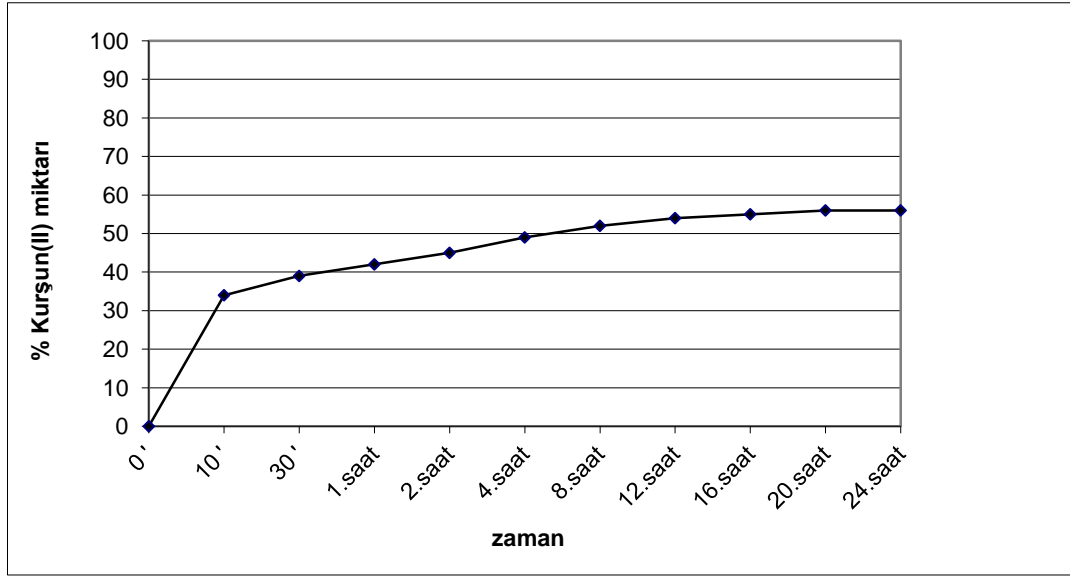
Elde edilen bu sonuçlara göre besiyerinde kalan Kurşun(II) miktarının ilk yirmi saat boyunca azaldığı, sonrasında ise sabit kaldığı görülmüştür. 24 saatin sonunda besiyerine ilave edilen metal miktarının % 16’sı (32,68 ppm Pb⁺²) besiyerinde kalmış, % 84’ü

(171,61 ppm Pb^{+2}) mikroorganizma tarafından giderilmiştir (Şekil 4.11). Besiyerinde bulunan metal miktarı ilk on dakika içinde hızla azalmıştır.



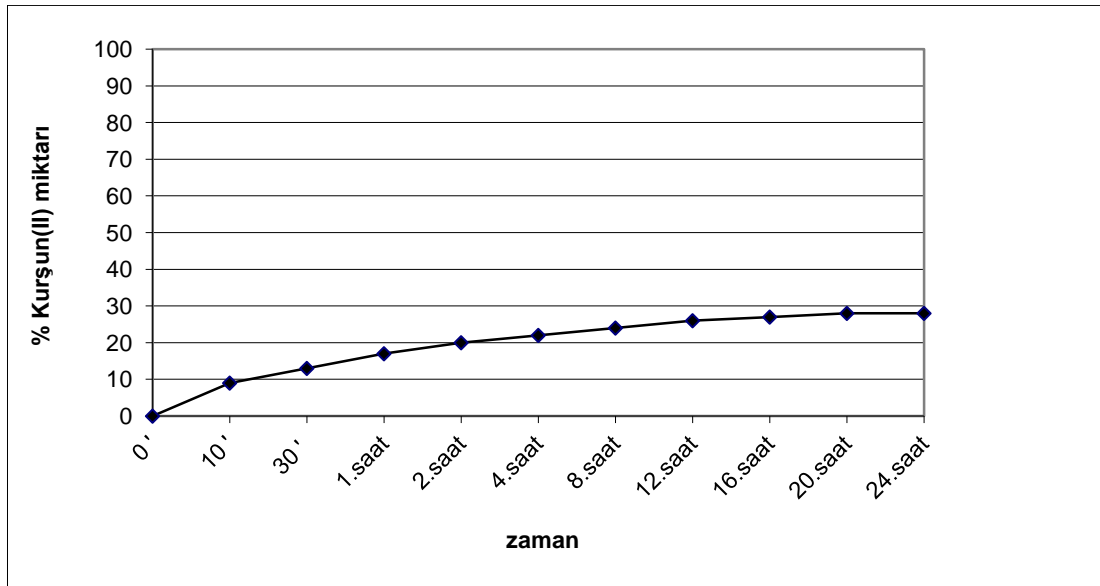
Şekil 4.11. Besiyerinde kalan Kurşun(II) miktarının % oranının zamana göre değişimi

Besiyerine ilave edilen Kurşun (II) giderimi iki şekilde gerçekleşmiştir. İlk mekanizma olan hücre yüzeyine adsorbsiyon sırasında hücre yüzeyindeki metal miktarının yüzde oranının zamana göre değişimi Şekil 4.12' de verilmiştir. Bu sonuçlara göre 24 saatlik $37^{\circ}C$ 'deki inkübasyon sonrasında Kurşun(II) miktarının % 56'sı (114,40 ppm Pb^{+2}) hücre yüzeyine adsorbe olmuştur. İlk 20 saat boyunca hücre yüzeyine tutunan metal miktarında artma olmuş; sonrasında ise sabit kaldığı tespit edilmiştir. Yüzeye tutunan metal miktarının yarısından fazlası ilk 10 dakika içinde adsorbe olmuştur.

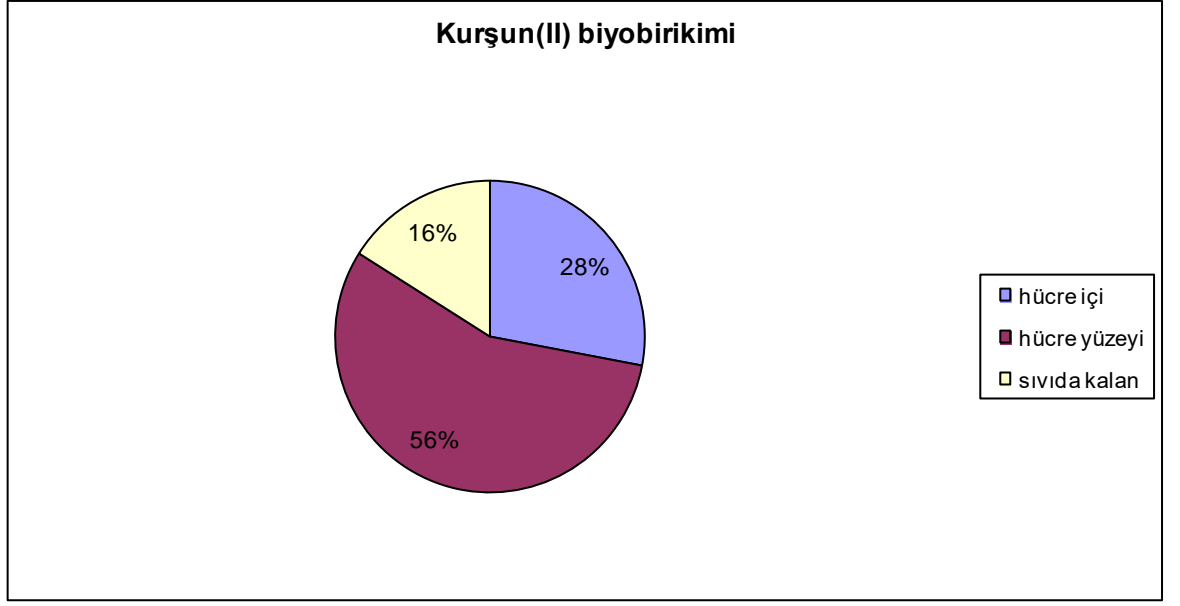


Şekil 4.12. *Pseudomonas aeruginosa* BK14 izolatının hücre yüzeyine adsorbe olan Kurşun(II) miktarının % oranının zamana göre değişimi

Hücre içine alınan Kurşun(II) miktarında ilk 20 saat boyunca artış gözlenmiştir. Sonuçlara göre toplam metal miktarının %28'i hücre içine alınmıştır. Hücre içine alınımın yaklaşık yarısı ilk yarım saat içinde gerçekleşmiştir. Hücre içine alınan metalin % oranının zamana göre değişimi Şekil 4.13'te gösterilmiştir.



Şekil 4.13. *Pseudomonas aeruginosa* BK14 izolatının hücre içine aldığı Kurşun(II) miktarının % oranının zamana göre değişimi

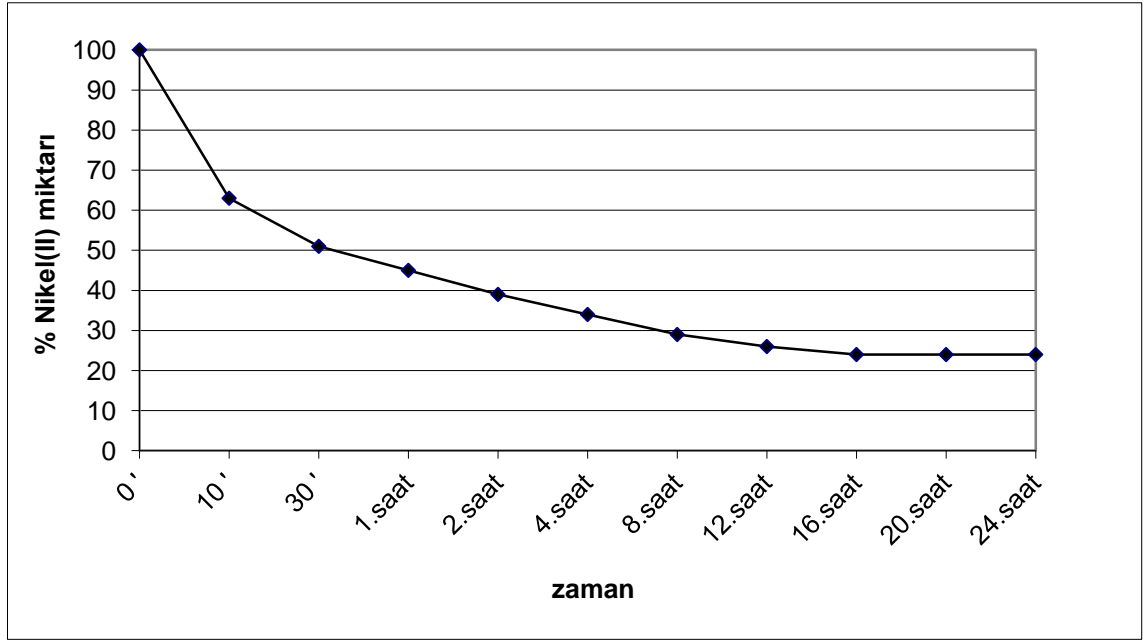


Şekil 4.14. Kurşun(II) biyobirikiminin bölgesel oranları

4.5.2. Nikel(II) biyobirikimi

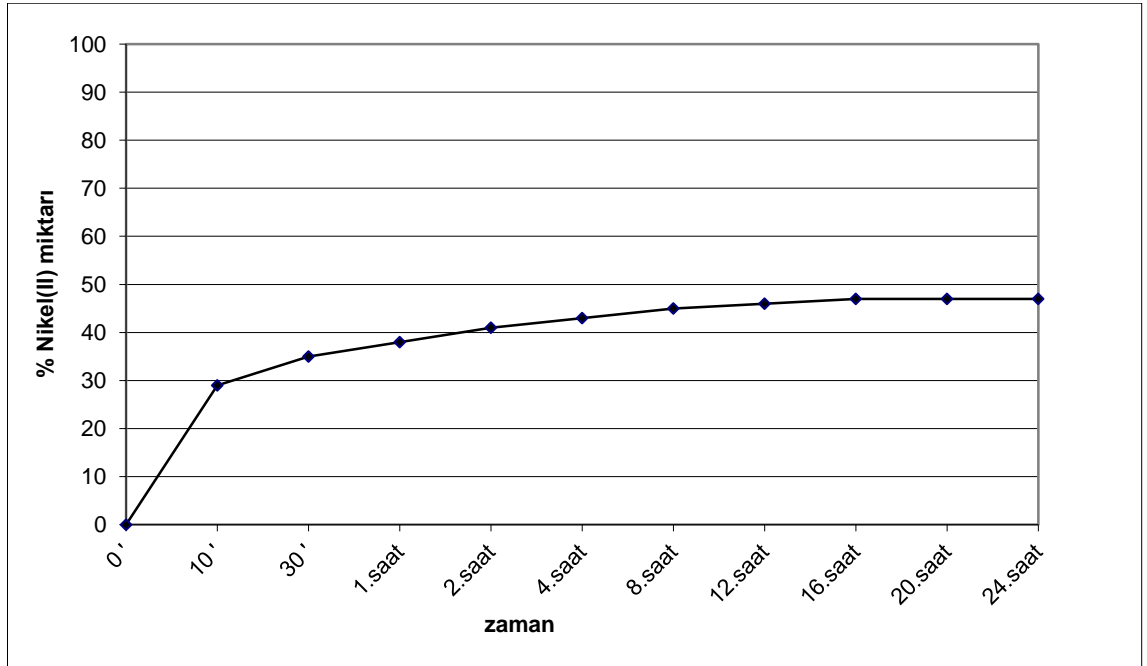
Nikel(II) biyobirikimi çalışması için seçilen BK23 *Pseudomonas stutzeri* izolatu, 186,21 ppm Nikel(II) konsantrasyonu içeren besiyerinde 24 saat 37 °C’de inkübe edilmiştir. Bu çalışma sonunda tespit edilen besiyerinde kalan, hücre yüzeyine tutunan ve hücre içine alınan Nikel(II) miktarlarının % oranlarının zamana göre değişimleri Şekil 4.14-4.16’da gösterilmiştir.

Yapılan çalışmalarda besiyerine eklenen toplam Nikel(II) miktarının % 24’ü (44,69 ppm Ni⁺²) besiyerinde kalmıştır. Besiyerinde kalan metal miktarında ilk 16 saatte azalma gerçekleşmiş sonrasında ise sabit kaldığı izlenmiştir. İlk on dakika içinde azalma hızlı bir şekilde olurken sonrasında daha yavaş seyretmiştir.



Şekil 4.15. Besiyerinde kalan Nikel(II) miktarının % oranının zamana göre değişimi

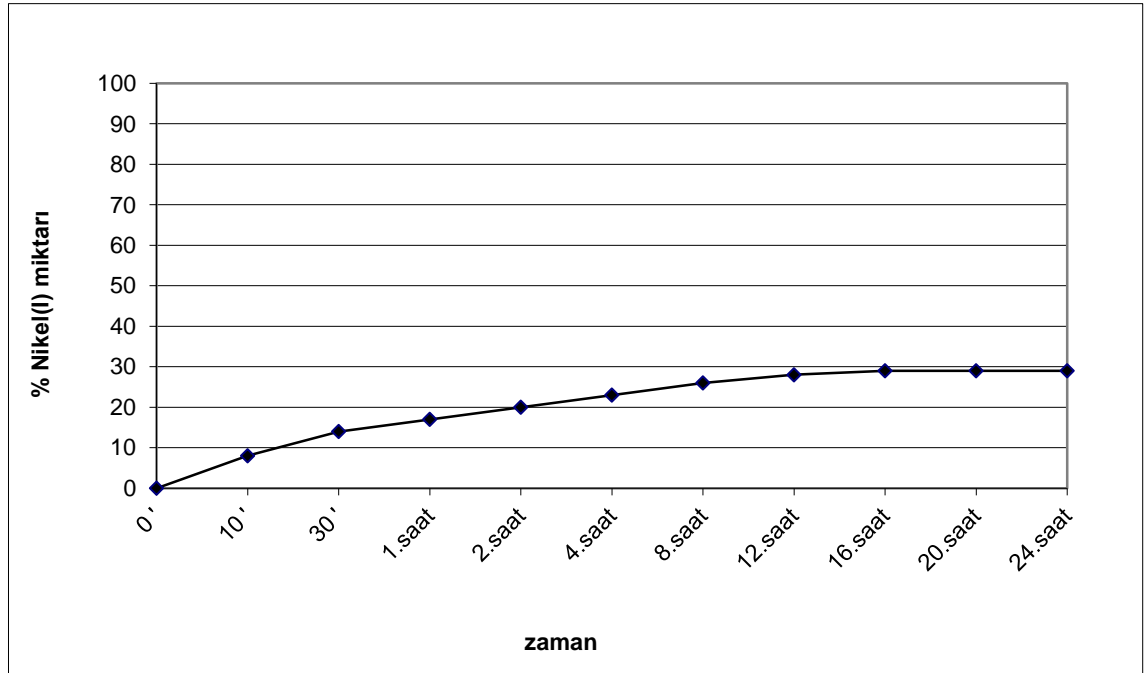
24 saatin sonunda besiyerine ilave edilen Nikel(II)'in % 47'si (87,51 ppm Ni^{+2}) bakteriler tarafından hücre yüzeyine tutunma yoluyla giderilmiştir. Adsorbsiyon ilk 16 saat boyunca artmış; sonra sabit kalmıştır. İnkübasyonun ilk on dakikasında tutunma oldukça hızlıdır.



Şekil 4.16. *Pseudomonas stutzeri* BK23 izolatının hücre yüzeyine adsorbe olan

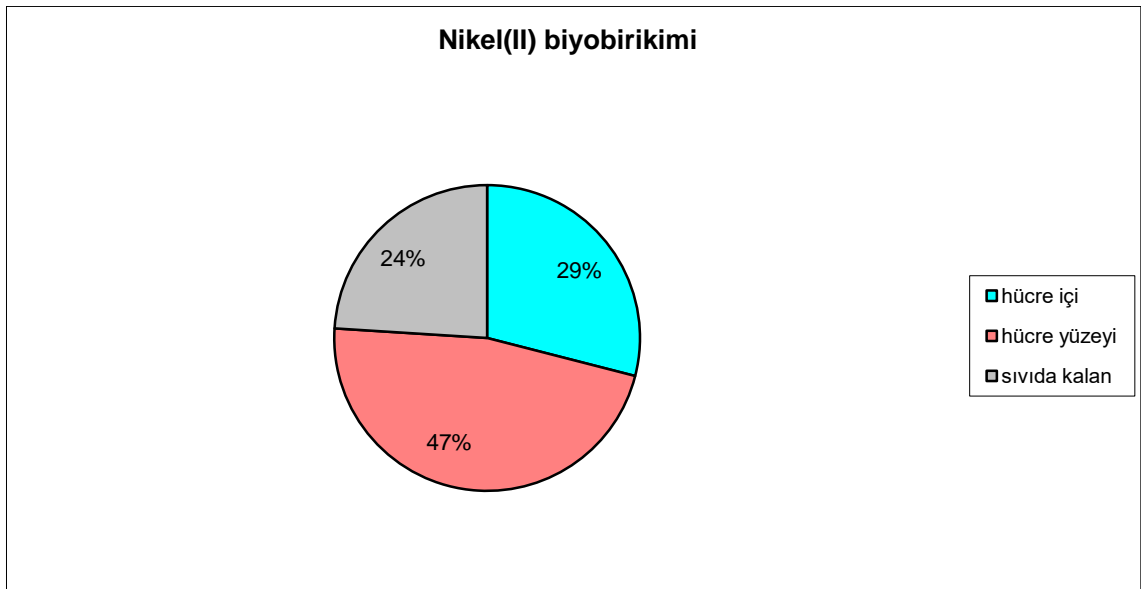
Nikel(II) miktarının % oranının zamana göre değişimi

Nikel(II) ilavesinin ardından inkübasyonun ilk yarım saatinde hücre içine metal alınımı daha hızlı gerçekleşmiştir. 37 °C'de 24 saat inkübasyonun ardından toplam metal miktarının % 29'u (54 ppm Ni⁺²) hücre içine alınmıştır. İlk 16 saat alım devam etmiş; sonra durmuştur.



Şekil 4.17. *Pseudomonas stutzeri* BK23 izolatının hücre içine aldığı Nikel(II)

miktarının % oranının zamana göre değişimi



Şekil 4.18. Nikel(II) biyobirikiminin bölgesel oranları

5. BÖLÜM

TARTIŞMA VE SONUÇ

Su hayatın her alanında temel ihtiyaçtır ve temiz su vazgeçilmez bir kaynaktır. Tüm dünyada olduğu gibi hızla gelişmekte olan ülkemizde de su arıtımına olan gereksinim her geçen gün artmaktadır. Endüstriyel, tarımsal faaliyetler ve petrol kullanımındaki artış gibi etmenlerle ağır metallerin suda ve toprakta daha fazla bulunması söz konusudur. Her tür canlı için besin zinciri yolu ile ağır metallere uzun süre maruziyet toksik etkilere sebep olmaktadır. Canlıların zarar görmesi, ekolojik dengenin bozulması ve doğanın verimliliğini kaybetmesi anlamına gelmektedir. Bu nedenle, ağır metal kaynaklarının çevre ile temas yolları kontrol altına alınmalıdır. Ağır metal içeren atık sular, çevreye verilmeden önce arıtılmalı ve su standartları doğrultusunda izin verilen kirlilik düzeyine eriştikten sonra deşarj edilmelidir [113].

Ünsal ve ark (1998) yaptıkları çalışmada Doğu Karadeniz’ de kurşun kirliliği olduğunu, ayrıca Kızılırmak, Yeşilirmak ve Giresun-Bulancak Pazar suyu üzerinden de önemli miktarda bakır ve kurşunun Doğu Karadeniz’ e ulaştığını tespit etmişlerdir. Bunun yanı sıra başta Tuz Gölü olmak üzere kapalı göllerimizde yeterli çevresel önlem alınmadığı ve su havzalarında kontrolsüz endüstrileşme faaliyetleri sebebiyle ağır metal miktarında artış söz konusudur [43; 116]. Her geçen gün endüstriyel faaliyetlerin ve teknolojik ürün kullanımının arttığı ülkemizde ağır metal arıtımı önem kazanmaktadır.

Ağır metaller endüstriyel atık sularının içme sularına ve tarımsal amaçlı sulara karışması yoluyla veya ağır metallerle kirlenmiş partiküllerin tozlaşması yoluyla hayvan ve insanlara bulaşır. Metaller organizmaya alınmalarını takiben birçok farklı proteinle etkileşime girebilirler. Örneğin kurşun sentez enzimleri ile etkileşime geçerken; arsenik, kadmiyum ve civa enerji metabolizması ile ilgili enzimlerle etkileşir. Birçok metal metabolizma için önemli bir protein olan albümine bağlanır ve membrandan hücre içerisine geçerek hücre faaliyetlerini olumsuz etkiler [117]. Bu çalışmada da canlılar için toksik etkiye sahip Kurşun(II) ve Nikel(II) metalleri ile atık suda giderim ve biyobirikim deneyleri yapılmıştır. Atık sudan ağır metal gideriminin biyobirikim ile gerçekleşmesinde mikroorganizmalar tercih edilmekte; hızlı üremeleri, biyokütle

yoğunluğunun fazla olması ve olumsuz koşullara olan dirençleri sebebi ile de özellikle bakteriler kullanılmaktadır.

Pseudomonas cinsi bakteriler, toprak, su, kanalizasyon, memeli bağırsakları ve bazı bitki yüzeyleri gibi çok geniş bir yayılım alanına sahip olan ve bulunduğu ortamlardan kolayca izole edilebilen gram negatif, basillerdir [118; 119]. Son yıllarda yapılan metal giderim çalışmalarında *Pseudomonas* cinsi bakterilerin kullanımının ön plana çıkmış olması bu mikroorganizmaların kirli ortamlarda canlılığını devam ettirebilme kabiliyetinden kaynaklanmaktadır. Bu özelliklerinin kaynağı olarak da ürettikleri ikincil metabolitler gösterilmektedir [70; 120-122].

Metale maruz kalan mikroorganizmaların metale maruz kalmayanlara oranla daha uzun süre canlılığını korudukları yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir [123]. Srinath ve ark. (2002), Cr(VI) ile kirlenmiş sulardan bakteri izole etmişler ve laboratuvar ortamında bu bakterilerin Cr(VI) giderimini incelemiştir. *Bacillus circulens* ve *Bacillus megatarum* olarak tanımladıkları izolatların diğerlerine nazaran Cr(VI)'ya daha çok direnç gösterdikleri ve bu dirençli izolatların Cr(VI) biyobirikimlerinin de yüksek olduğu rapor etmişlerdir [83].

Sun ve Shao (2007), Pasifik okyanusunun sedimentlerinden izole ettikleri Pb(II)'a yüksek oranda dirençli olan *Penicillium* sp. Psf-2 izolatının laboratuvar ortamında da Pb(II)'u yüksek oranda hücre yüzeyine ve hücre içersine aldığını rapor ederek, ağır metal gideriminde metale toleranslı mikroorganizmaların kullanımının önemli olduğunu vurgulamışlardır [123].

Çalışma için metal kirliliği potansiyeli muhtemel olan atık su arıtma tesisinin arıtma işlemine ait havuzlarından su örnekleri alınmış; bu örneklerden metal gideriminde dirençli olacağı düşünülen *Pseudomonas* cinsi bakteriler izole edilmiştir. Alınan su örneklerinin genel metal yoğunluğunun ölçümleri ICP-MS cihazında yapılarak çalışmada kullanılacak metaller belirlenmiştir. Kurşun(II) ve Nikel(II) metallerinin atık sudaki miktarının fazla olması ve bu ağır metallerin kirliliğinin ekolojik denge ve canlılar açısından kritik öneme sahip olması nedeniyle çalışmada bu metaller yer verilmiştir. İzole edilen mikroorganizmalar tam otomatik identifikasyon sistemi VITEK 30 (Biomerieux) cihazında tanımlanmışlardır. İzolatlardan 22 tanesinin *Pseudomonas*

aeruginosa, 11 tanesinin *Pseudomonas stutzeri*, 7 tanesinin de *Pseudomonas mendocina* olduğu tespit edilmiştir. Çalışılan atık sular da *Pseudomonas aeruginosa* türünün baskın olmasının ürettiği ve ikincil metabolit olarak da kabul edilen piyosiyanın pigmentinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Son yıllarda *Pseudomonas* spp.'lerden piyosiyanın üretimi bir çok araştırmacının ilgisini çekmekte ve bu çalışmalar fluoresens *Pseudomonas* spp. ların temsilcilerinden , besiyeri içerisinde mavi-yeşil piyosiyanın pigmentini üreten *P. aeruginosa* ile yürütülmektedir [124]. Fluoresens *Pseudomonas* spp.'lar tarafından üretilen pigmentlerin antibiyotik aktiviteleri araştırılmış; ilk olarak enzimatik aktivite gösteren Piyosiyanz olarak isimlendirilen bir ilacın varlığı bildirilmiştir. Bu ilaç diftera, influenza ve menenjit tedavisinde kullanılmıştır. Fakat bugün klinik kullanımı bırakılmıştır. *Pseudomonas* spp.'lerden elde edilen antimikrobiyal maddelerin sadece iki tanesi tıbbi olarak faydalı bulunarak (piyosiyanın ve piyrolnitritin) ticari olarak üretilmektedir [125]. Onbaşılı D. 2006'da yaptığı çalışmasında atık su ve topraktan 20 *Pseudomonas* spp. izole etmiş; çoğunluğu *P.aeruginosa* olmak üzere *P.stutzeri*, *P. fluorescens*, *P.putida*, *P.cepacia*, *P.luteola* türlerini tespit etmiştir [126]. Yalçın S. 2016'da yaptığı çalışmasında atık sudan 50 adet *Pseudomonas* spp. izole etmiş, çoğunluğu *P.aeruginosa* olmak üzere *P.stutzeri* türleri tespit etmiştir [127]. Yapılan çalışma sonuçları ile bu çalışmada elde edilen veriler paralellik göstermektedir.

Bu çalışmada izole edilen bakterilerin tamamının Kurşun(II) ve Nikel(II) metallerinin 50 ppm'lik konsantrasyonlarına ayrı ayrı maruz bırakılarak biyokütle yoğunlukları ölçülmüştür. Her bir metal için 5'er adet dirençli izolatın seçilmesini takiben daha yüksek metal konsantrasyonları içeren çözeltilerde inkübe edilen bakterilerin metalsiz ortamdaki hücre yoğunlukları temel alınarak % ölüm ve LC₅₀ değerleri (bakterilerin %50 sini öldüren metal miktarı) hesaplanmıştır. Bu çalışmada % ölüm değerlerine göre Kurşun(II)'a en çok direnç gösteren izolat *Pseudomonas aeruginosa* BK14, Nikel(II)'e en çok direnç gösteren izolat ise *Pseudomonas stutzeri* BK23 olmuştur. *Pseudomonas aeruginosa* BK14 izolatının Kurşun(II) için LC₅₀ değeri 204,30 ppm iken *Pseudomonas stutzeri* BK23 izolatının Nikel(II) için LC₅₀ değeri 186,21 ppm olarak tespit edilmiştir. Yılmaz E.S. 2009'da *Synechocystis* sp. ile yaptığı çalışmada Nikel(II) için LC₅₀ değerini 17,41 ppm, Kurşun(II) için LC₅₀ değeri ise 126,90 ppm olarak tespit etmiştir [128]. Raungsombon ve ark. (2006), *Gleocapsa* sp. ile yaptıkları çalışmada Kurşun(II) için LC₅₀ değerini 1,16 ppm olarak, Banerjee ve ark.(2004), *Aulosira fertilissima* ile

yaptıkları çalışmada Nikel(II) için LC₅₀ değerini 0,1 ppm olarak bulmuşlardır [129; 130]. Diğer çalışmalarda kullanılan organizmalar ile kıyaslandığında *Pseudomonas* cinsinin metale dirençliliğinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Çalışmada kullanılan izolatların atık sudan elde edilmiş olması, daha önceden önemli düzeyde metale maruz kalmış olmaları ve izolatların canlı halde kullanılmaları metal dirençliliğinin artışına neden olarak gösterilebilir.

Ağır metal-çevre etkileşimini en aza indirmek amacı ile atık sudaki ağır metallerin fiziksel ve kimyasal giderimlerine alternatif yeni çözümler aranmaktadır [43]. Yaygın olarak kullanılan iyon değişimi, kimyasal çöktürme ve ters ozmoz gibi geleneksel yöntemler pahalı olmakla birlikte istenilen verimi sağlayamamaktadır. Dolayısı ile ağır metal içeren atık suların arıtımında daha etkili ve ekonomik olan biyoteknolojik yöntemler daha çok tercih edilmektedir.

Arıtım uygulamalarında biyosorpsiyon, biyobirikim, biyopresipitasyon ve bazı mikroorganizmalardan elde edilen saflaştırılmış biyopolimerler, geleneksel fiziksel ve kimyasal metotlara alternatif ve/veya yardımcı bir yol sağlarlar [131]. Ağır metal içeren endüstriyel atıkların biyobirikim ile arıtılmasının bir çok biyoteknoloji firması tarafından yürütüldüğü bildirilmektedir [132-134]. Bu çalışmada *Pseudomonas* spp.'lar ile atık sudan ağır metal gideriminde biyobirikim mekanizması incelenmiştir.

Atık sulardan ağır metal gideriminde kullanılan biyosorpsiyon yönteminin mekanizması, kullanılan mikroorganizmanın canlılığı ve metabolizması göz önüne alındığında ikiye ayrılır: 1- Metabolizmaya bağımlı, 2- Metabolizmadan bağımsız [60]. Metallerin hücre zarından taşınarak hücre içinde birikmesi, mikroorganizmanın metabolizmasına bağlı bir biyosorpsiyon yoludur. Metabolizmadan bağımsız olarak ağır metal katyonları ile hücre duvarı arasındaki etkileşimle bakır, nikel, krom, kurşun, çinko ve kobalt gibi birçok metal toplanmaktadır [61]. Metal iyonları, hücre yüzeyindeki reaksiyon alanları (hücre duvarındaki proteinlerin fonksiyonel gruplarına ve peptid bağları) ile kompleks yaparak adsorbe edilebildikleri gibi bazı mikroorganizmalarca sentezlenen ekzopolisakkarit yapıda polimerlerin de çözeltideki metal iyonlarını bağladığı bildirilmektedir [135].

Araştırmacılar metallere dirençli izolatların metal giderim kapasitelerinin de yüksek olduğunu bildirmişlerdir [83; 123; 136]. Bu sebeple çalışmada metal dirençliliği en yüksek olan Kurşun(II) için *Pseudomonas aeruginosa* BK14, Nikel(II) için *Pseudomonas stutzeri* BK23 izolatları 50, 100, 200, 400 ppm Kurşun(II) ve Nikel(II) konsantrasyonlarında metal içeren besiyeri ortamlarında 24 saat inkübe edilmiş; 10., 30. dakika ve 1., 2., 4., 8., 12., 16., 20., 24. saatlerde metal biyobirikim çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmada yapılan biyobirikim deneylerinde Kurşun(II) metalinde %56 sı (114,40 ppm) hücre yüzeyinde, %28 i (57,20 ppm) hücre içinde olmak üzere toplamda %84 (174,60 ppm) giderim sağlanmıştır. Nikel(II) metalinde ise %47 (87,51 ppm) hücre yüzeyinde %29 (54 ppm) hücre içinde olmak üzere %76 (141,51 ppm) giderim sağlanmıştır. Kurşun(II) metal iyonlarının Nikel(II) iyonlarına oranla daha fazla hücre yüzeyine tutunmuş olması hücre duvarında bulunan fonksiyonel protein gruplarının Pb^{+2} iyonuna bağlanma yeteneğinin daha fazla olduğunu göstermektedir. Yılmaz E.S 2009 da yaptığı çalışmada *Synechocystis* sp. BASO403 izolatı için Ni^{+2} 'in %51 oranında hücre yüzeyine, Pb^{+2} 'un % 68 oranında hücre yüzeyine bağlandığını göstermiştir [128]. Bu sonuçlara bakıldığında organizma farklı olsa da Kurşun(II) 'un hücre yüzeyinde toplanmasının Nikel(II) 'e oranla daha fazla olduğu görülmektedir. Metallerin alınımında ve kullanılan biyomateryallerin metal tercihinde etkili olan faktörlerden biri de metallerin sahip olduğu fizikokimyasal özellikleridir. Bir metalin elektronegativitesi ve iyonik radyanı ne kadar yüksek ise bağlanma gücü de o kadar artmaktadır [137; 138]. Kurşun(II)'un elektronegatifliği 2,31 ;Nikel(II) elektronegatifliği 1,91'dir [139]. Bu çalışmada da Kurşun(II)'un hücre yüzeyine bağlanma oranı daha fazla olmuştur.

Ağır metallerin detoksifikasyonunda, hücre yüzeyine bağlanmasında ve hücre içerisine alınmasında rol oynayan diğer bir faktör de proteinlerdir. Congeevaram ve ark. (2007), ağır metallere dirençli fungus ve bakteri izolatlarının Cr(VI) ve Ni(II) giderimini çalışmışlar, 100 ppm Cr(VI) ve 50 ppm Ni(II)'e maruz kalan hücrelerin SDS-PAGE protein profillerinde kontrole göre farklılıkların olduğunu tespit etmişlerdir [140]. Oztürk 2008'de yaptığı çalışmada metale maruz kalan hücrelerin SDS-PAGE jel görüntüsünde, hücre proteinlerinde azalma tespit etmiştir [91].

Bueno ve ark. (2008), *Rhodococcus opacus*'u Pb(II), Cr(III) ve Co(II) metallerine maruz bırakarak, metallerin hücre üzerine etkisini elektron mikroskobu ile incelemişler ve hücrede bulunan elementlerin analizlerini yapmışlardır. Element analizlerinin sonuçlarına göre, kontrol hücrelerinde tespit edilen K (potasyum) elementine metale maruz kalan hücrelerde rastlanılmamıştır. Hücre yüzeyinde bulunan K'un metallerle yer değiştirmiş olabileceğini rapor etmişlerdir [137]. Bu çalışmada kullanılan metallerin hücre içine alınımı, hücre yüzeyine tutunumu ve besiyerinde kalan miktarları karşılaştırılmıştır. Buna göre kullanılan Kurşun(II) metalinin %56 sı hücre yüzeyine tutunurken Nikel(II) metalinin %47 si hücre yüzeyine tutunmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda *Pseudomonas spp.*' in hücre yüzeyinde bulunan proteinlerin Kurşun(II) metaline afinitesinin Nikel(II)' e oranla daha yüksek olduğu ya da Kurşun(II)' un daha önce yapılan çalışmalarda olduğu gibi hücrede bulunan elementlerle yer değiştirdiği düşünülmektedir. Çalışmada hücre içine alınan Kurşun(II) miktarı da Nikel(II) miktarından fazladır. Buna göre hücre içine alınımın hücre yüzeyine tutunma ile paralellik gösterdiği sonucuna varılmaktadır.

Metal alınımında dikkat edilmesi gereken önemli bir faktör de zamandır. Yapılan çalışmalar başlangıçta metal alınımının hızlı olduğunu; sonrasında biyosorbent yüzeyindeki doygunluk nedeniyle yavaşladığını göstermiştir [141; 142]. Doygunluk, biyokütle artışı ile metal bağlanma bölgelerinin birbirinin üzerine gelmesi veya agregasyon oluşturmamasından kaynaklanmaktadır [143]. Ancak, bu durum metalin ve mikroorganizmanın çeşidine ve mikroorganizma yüzeyinde bulunan metal bağlanma bölgelerinin çeşidine ve sayısına göre farklılık göstermektedir. Bu çalışmada Kurşun(II) metalinin hücre yüzeyine adsorblanan miktarının (%56'sının) yarısından fazlası (%34'ü) ilk 10 dakika içinde hücre yüzeyine tutunmuştur. Nikel(II) metalinin de ilk 10 dakika içinde % 27' si hücre yüzeyine tutunmuştur. Canlı hücrelerde metal alınımının iki aşamada gerçekleştiği, birinci aşamada metallerin hücre yüzeyinde fiziksel yolla tutunduğu (hızlı alınım), ikinci aşamada ise hücre içersine alındığı (yavaş alınım) bildirilmiştir [144]. Hücre yüzeyine tutunmada hücre duvarında bulunan fonksiyonel grupların ve ekzopolisakkaritlerin önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Bazı araştırmacılar toksik maddelere ve kurumlara karşı bakterileri koruyan EPS üretimini topraktan izole ettikleri *Pseudomonas spp.*'larda çalışmışlar ve EPS üreten bu mikroorganizmaların toksik bileşiklere yüksek toleransı ve direncinin seçici avantajlar

sağladığına dikkati çekmişlerdir [145; 146]. Raungsomboon ve ark. (2006), *Gleocapsa gelatinosa*'nın EPS'sini saflaştırarak Pb^{+2} giderimini araştırmışlar ve EPS'nin monomer yapısını aydınlatmışlardır. Buna göre ksiloz, riboz, ramnoz, galaktoz, glukoz, mannoz ve fruktoz şekerlerinden oluşan EPS yapının yüksek oranda Pb^{+2} 'u adsorbladığını bildirmişlerdir [130]. Metalin hücre içerisine alınımında ise düşük moleküler ağırlıklı tiyoller ve aktif transport mekanizmasının da rol oynadığı rapor edilmiştir [147; 148]. Diğer bir hücre içi alımın şeklinin de metalotiyonein gibi şelatlayıcı proteinlere tutunarak endositoz yolu ile alımın olduğu gösterilmiştir [84; 85]. Biyobirikim mekanizmalarının kullanılan mikroorganizma ve metal çeşidine göre değiştiği birçok araştırmacı tarafından ifade edilmiştir [149].

Bu çalışmadaki biyobirikim deneylerinde yüzeye tutunmada doyumluk Kurşun(II) için ilk 12 saatte, Nikel(II) için ise ilk 16 saatte gerçekleşmiştir. Yılmaz E.Ş. 2009'da *Synechocystis* sp. ile yaptığı çalışmada Kurşun(II)' a ait tüm iyonların ilk 5 dakika içinde hücre yüzeyinde toplandığını, hücre içine alımın olmadığını göstermiştir [128].

Bu çalışmada *Pseudomonas* cinsi izolatların hücre içine alımı gerçekleştirmiş olması hücre duvarında bulunan ve endositozdan sorumlu proteinlerin Pb^{+2} ' a olan bağlanma kabiliyetlerini göstermektedir. Hücre içine alımın devam etmiş olması sebebi ile de hücre yüzeyine tutunma ilk 10 dakikada hızlı gerçekleşmiş olsa da 12. saate kadar devam etmektedir. Yılmaz E.Ş. nin 2009'da *Synechocystis* sp.ve Ni^{+2} ile yaptığı çalışmada da hücre içine alım gerçekleşmemiş, hücre yüzeyine tutunmadaki doyumluk 6. günde olmuştur [128]. Bu çalışmada *Pseudomonas* spp. ile yapılan Ni^{+2} çalışmasında tutunmada doyumluk 16 saatte olmuş, hücre içine alım da gerçekleşmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda *Pseudomonas* spp. izolatının endositoz metabolizmasında görevli proteinlerin Ni^{+2} ye bağlandıkları söylenebilir.

Yapılan çalışmada hücre yüzeyine adsorbe olan metal miktarının hücre içine alınan metal miktarına göre daha fazla olduğu ve ilk 10 dakika içerisinde oldukça hızlı şekilde hücre yüzeyine tutulum olduğu tespit edilmiştir. Kurşun(II) metalinin hücre yüzeyine adsorblanan miktarının yarıdan fazlası %34'ü ilk 10 dakika içinde hücre yüzeyine

tutunmuştur. Nikel(II) metalinde de ilk 10 dakika içinde % 27' si hücre yüzeyine tutunmuştur. Bir çok araştırmacı hızlı metal alınımının biyokütlenin atık suların arıtımında kullanılabilmesi için en önemli kriter olduğunu bildirmişlerdir [150].

Çeşitli canlı ve/veya ölü mikroorganizma biyokütlesi ve ürünleri (polisakkaritleri) yüksek derecede biyoakümülatör görevi görürler [131]. Ağır metallerin sudan mikroorganizmalarca giderilmesinde mikroorganizmanın özgün özellikleri, hücre metabolizması ve çevrenin etkisi gibi birçok faktör rol oynamaktadır. Metal alınımında canlı hücrelerin kullanımı, alımın mekanizmasının ortaya çıkmasında avantaj sağlamaktadır [128].

Metal biyobirikimini etkileyen önemli çevresel faktörlerden biri de pH'dır. Çalışmada kullanılan inkübasyon ortamının pH değeri Kurşun (II) içeren çözeltilerde 6,5 , Nikel(II) içeren çözeltilerde 6 olarak tespit edilmiştir. Gabr ve arkadaşlarının (2008) canlı *Pseudomonas aeruginosa* hücreleri ile yaptıkları bir çalışmada en iyi nikel ve kurşun alınımının sırasıyla pH 7 ve pH 6'da olduğu görülmüştür [143]. Ortam pH'ı nötrale yaklaştıkça hücre yüzeylerinin daha çok negatif yüklendiği ve alımın işleminin daha hızlı gerçekleştiği bildirilmiştir [151; 152]. Düşük pH'ların metalin hücre içine alınımında görev yapan taşıyıcı proteinleri veya metal giderim mekanizmasında rol olan enzim aktivitelerini etkileyebileceği düşünülmektedir [91]. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde pH değerinin 6-7 arasında olmasının çalışmadaki metal alınımına yarar sağladığı düşünülmektedir.

Literatürde ağır metal iyonlarının çeşitli mikroorganizmalarca biyobirikimlerine ilişkin çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda mikroorganizma olarak değişik türlerden bakteriler, algler, mantarlar ve mayaların kullanıldığı görülmektedir [82; 153]. *Pseudomonas* spp. ile Nikel(II) ve Kurşun(II) giderimi ve biyobirikim mekanizması ile ilgili çalışma daha önce yapılmamış olup bu çalışma elde edilen sonuçlar açısından özgün ve orjinaldir.

Öztürk (2008) *Synechocystis* sp. ile yaptıkları biyobirikim çalışmalarında kullanılan metallerin büyük bir kısmının hücre yüzeyinde toplandığını, çok az bir kısmının hücre içine alındığını rapor etmişlerdir [91; 128]. Bu çalışmada ise hücre içine alımın diğer

çalışmalarda kullanılan organizmalar ile kıyaslandığında daha fazladır. Hücre içine alınım mekanizmasının, metal giderim kabiliyetinin *Pseudomonas* spp.'da daha gelişmiş olduğu söylenebilir.

Sonuç olarak evsel ve endüstriyel atık suların mikroorganizmalar yardımıyla arıtım işlemi, maliyet ve verimlilik açısından sağladığı avantajlar sebebiyle giderek önem kazanmaktadır. Bu alanda yapılmış biyoteknolojik çalışmalarda kullanılan mikroorganizmalardan *Pseudomonas* spp. 'ların bu işlem için uygun potansiyele sahip oldukları; tutulan metallerin geri eldesinin mümkün olmasının endüstriyel açıdan fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

Çalışmada atık sudan izole edilen *Pseudomonas* spp. 'lar kullanılarak, ekolojik dengenin ve canlıların sağlığının korunması açısından kritik öneme sahip olan ağır metal giderimi ve biyobirikim deneyleri yapılmıştır. Kullanılan mikroorganizmaların atık sudan izole edilmiş ve daha öncesinde metale maruz kalmış olmaları nedeni ile oldukça yüksek metal bağlama kapasitesine sahip oldukları görülmüştür. Bu özelliklere sahip suşların arıtım çalışmalarında tercih edilmesinin ucuz maliyet ve etkin verim sunacağı düşünülmektedir.

Yapılan deneysel ve istatistiksel çalışmalar sonucunda, ağır metallerin mikroorganizmalarca gideriminin mümkün olduğu ve en çok hücre yüzeyine tutunma yolu ile giderimin gerçekleştiği tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *Pseudomonas aeruginosa* BK14 ile *Pseudomonas stutzeri* BK23 izolatu atık sudan ağır metal gideriminde etkin bir şekilde değerlendirilebilir. Bu çalışmada elde edilen tüm sonuçların bu çalışmanın devamına ya da başka araştışıcıların çalışmalarına ışık tutacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Özdemir, K., “Meyvesuyu Fabrikası Atıksularının Elektrokimyasal Olarak Arıtılması, *Fen Bilimleri Enstitüsü*”, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, 81s. Ankara, 2005.
2. Özer, A., Özer, D. “Nikel (II) iyonlarının iki kademeli kesikli kapta *Cladophora crispata* ile giderilmesi”, *Turk. J. Eng. Environ. Sci.*, 22: 305-313, 1998.
3. Wilde, E. W., Beneman, J. R., “Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae”, *Biotechnol. Adv.*, 11: 781-812, 1993.
4. Tefloncu A., “Biyoteknoloji”, *Ege Üniversitesi Yayınlar.*, Bornova, İzmir, 1995.
5. İleri, R., *Çevre Biyoteknolojisi*, 501-503, 2000.
6. Doğan, M., Saylak, M, “Su Kimyası”, *Erciyes Üniversitesi Yayınları* No:120, s. 132-150, Kayseri, 2000.
7. Metcalfe, C., Koenig, B.G., Bennie, D.T., Servos, M., Ternes, T.A., Hirsch, R., “Occurrence of Neutral and Acidic Drugs in the Effluents of Canadian Sewage Treatment Plants”, *Environment Toxicologic Chemical*, 22: s. 2872- 2889, 2003.
8. Su kirliliği Yönetmeliği; Resmi Gazete Sayısı: 25687; Resmi Gazete Tarihi: 31.12.2004.
9. Tünay, O., Endüstriyel Kirlenme Kontrolü, *İ.T.Ü. Yayınları*, İstanbul, 1996.
10. Alp, K., 2009. Endüstriyel Kirlenme Kontrolü Ders Notları, İstanbul Teknik Üniversitesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, İstanbul.
11. Jern, N.W., “Industrial Wastewater Treatment”, *Imperial College Press*, ISBN 978-186-094-580-9, 153s, 2009.
12. Gönüllü T., Endüstriyel Kirlenme Kontrolü, *Birsen Yayınevi*, Cağaloğlu-İstanbul, 2004.
13. Metcalf ve Eddy, Mc Graw-Hill nc., Treatment, Disposal and Reuse, *Wastewater Engineering*, 3rd. Edition, 1991.
14. Ekmekyapar, F., “Bakır ve kurşun iyonlarının *Cladonia rangiformis* Hoffm. ile biyosorpsiyonu, *Fen Bilimleri Ens*”, Yüksek Lisans Tezi, A.Ü., Çevre Müh. Anabilim Dalı, Erzurum, 2004.
15. <http://web.deu.edu.tr/atiksu/ana58/fizik.pdf>, erişim tarihi: 23.05.2016

16. Azman, H.E., “Evsel Atıksuların Arıtılmasında Arıtma Verimi – Enerji İlişkisinin İncelenmesi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*”, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, 87s., Adana, 2005.
17. Pekin, B., Biyokimya Mühendisliği (Biyoteknoloji). Ege Üni., Kimya Fak. Yayınları No:3, 409 s, İzmir, 1983.
18. Kahvecioğlu, Ö., Güven, A., Kartal, G., Timur, S., Metallerin Çevresel Etkileri-I-II-III, *Metalurji Dergisi*, sayı :136,137,138, 1996.
19. Prego, R., Cobelo-Garcia A, “Twentieth century overview of heavy metals in the Galician Rias, (NW Iberian Peninsula)”, *Environ. Pollut.*, 121: 425–452, 2003.
20. Yüce, A., Türkiye kurşun envanteri. İstanbul Maden İhracatçıları Birliği, İstanbul, 28s., 1998.
21. Tünay, O., Endüstriyel Kirlenme Kontrolü, İ.T.Ü. Yayınları, İstanbul. 2007.
22. Baş, L., Demet, Ö., “Çevresel toksikoloji yönünden bazı ağır metaller”, *Ekoloji dergisi*, sayı:5, 1992.
23. Babel S., Kurniawan T.A., “Various treatment Technologies to remove arsenic and mercury from contaminated groundwater: on overview, *in: proceeding of the 1 st International Symposium on Southeast Asian*”, Water Environment, 24-25 October 2003, Bangkok, Thailand, , 433-440, 2003.
24. ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Toxicological Profile for Lead. Atlanta, Georgia, USA: ATSDR, 2007.
25. SKERFVING, S., BERGDAHL, IA., Handbook on the Toxicology of Metals. Ed.: Academic Press, Inc, Chapter 31., 2007.
26. <http://www.mineralminers.com/html/galmins.stm>
27. Vural N., Toksikoloji, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 315-325, Ankara, 1984.
28. PIOMELLI, S. LEAD POISONING. IN: BEHRMAN, RE., KLIEGMAN, RM., JENSON, HB. (eds)., Nelson Textbook of Pediatrics (16th ed). *Philadelphia: W.B. Saunders Company*. 2156-2160., 2000.
29. WHO. *Environmental Health Criteria* 165- Inorganic Lead. Geneva. 1995.
30. GOYER, RA., CLARKSON, TW., Toxic Effects of Metals. In: Klaassen CD, editor. Casarett & Doull’s Toxicology, The Basic Science of Poisons. 6th Edition. *New York: The McGraw-Hill Companies*. p. 827–34., 2001.
31. <http://www.invs.sante.fr/>

32. ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry., Toxicological profile for lead, (Draft for Public Comment), Atlanta, 1999.
33. NEEDLEMAN, HL., “The persistent threat of lead: medical and sociological issues”, *Curr Probl Pediatr.* 18: 697-744., 1998.
34. COREY, G., GALVAO, L. , Lead. Vigilance Series 8. Pan-American Center for Human and Health Ecology. PAHO/WHO. Mexico, 1989.
35. WOZNIAK, K., BLASIAK, J. , “In vitro genotoxicity of lead acetate: induction of single and double strand breaks and DNA–protein cross links. “, *Mutat. Res.* 535: 127–139., 2003.
36. CHIA, SE., ZHOU, HJ., YAP, E., THAM, MT., DONG, NV., HONG TU, NT., CHIA, KS., “Association of renal function and delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphism among Vietnamese and Singapore workers exposed to inorganic lead.”, *Occup. Environ. Med.* 63: 180–186., 2006.
37. FU, H., BOFFETTA, P., “Cancer and occupational exposure to inorganic lead compounds: a meta-analysis of published data.”, *Occup. Environ. Med.* 52: 73–81., 1995.
38. Ahamed M. ve Siddiqui M.K.J., “ Low Level Lead Exposure and Oxidative Stress: Current Opinions.”, *Clinica Chimica Acta*, 383(1-2): 57-64., 2007.
39. Gürer H. ve Ercal N., “Can Antioxidants Be Beneficial in the Treatment of Lead Poisoning?”, *Free Radical Biology and Medicine*, 29(10): 927-945., 2000.
40. <http://projects.seattletimes.com/2014/loaded-with-lead/3/>
41. Habashi, F., “Handbook of Extractive Metallurgy”, Vol. 2, WILEYVCH, Germany, 1997.
42. DEMİRALAY, E., “Nikel baskılanmış monolitik kolonlar, *Fen Bilimleri Enstitüsü*” , Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, s. 5-8., Isparta, 2007.
43. Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S., “Metallerin Çevresel Etkileri I-II”, İTÜ Metalürji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü (Seminer çalışması 24s), 2004.
44. KARTAL, G., GÜVEN, A., KAHVECİOĞLU, Ö. ve TİMUR, S., “Metallerin çevresel etkileri. II.”, TMMOB Metalürji Mühendisleri Odası, Metalürji Dergisi, 136: 46-51., 2004.
45. ÇOKADAR, H., İLERİ R. ve İZGİ B., “Nikel(II) iyonunun sulu ortamdan granül aktif karbon (GAK) ile giderilmesi.”, *Ekoloji Çevre Dergisi*, 46: 38-42., 2003.

46. AKGÖL, S., KUSVURAN, E., KARA, A., ŞENEL, S. ve DENİZLİ, A., Jour. Appl. Polym. Sci. 100: 5056., 2006.
47. ATALAY, N., “Ni(II) iyonlarının Poli(2,5-Dihidro-2,5-Dimetoksifuran) üzerine adsorpsiyonu, *Fen Bilimleri Enstitüsü*”, Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, s.3-5., Kırıkkale, 2007.
48. Rich, G. and K. Cherry, “Hazardous waste treatment Technologies”, *Pudvan Publishers*, New York, 1987.
49. Xia, Y., Liyuan, C., “Study of gelatinous supports for immobilizing inactivated cells of *Rhizopus oligosporus* to prepare biosorbent for lead ions”, *The Int. J. Environ.Stud.*, 5: 1-6, 2002.
50. Cossich, E. S., Tavares, C. R. G., Ravagnani, T. M. K., “Biosorption of chromium(III) by *Sargassum* sp. biomass”, *Electron. J. Biotechn.*, 5(2): 133-140, 2002.
51. Ahalya, N., T. Ramachandra, et al., "Biosorption of heavy metals." Res. J. Chem. Environ7(4): 71-79., 2003.
52. YILDIZ, S., Fizikokimya. 1. Baskı, Bizim Büro Basımevi, Konya, 1995.
53. SARIKAYA, Y., Fizikokimya. 5. Baskı, Baran Ofset, Ankara, 940s., 2004.
54. ATKINS, P. W., Physical chemistry. 1. Baskı, Bilim Yayıncılık, Ankara, 578s., 2001.
55. Rangsayatorn, N., Upatham, E. S., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Lanza, G. R., “Phytoremediation potential of *Spirulina* (Arthrospira) *platensis*: biosorption and toxicity studies of cadmium”, *Environ. Pollut.*, 119: 45-53, 2002.
56. Zhou, J. L. and R. J. Kiff, "The uptake of copper from aqueous solution by immobilized fungal biomass." Journal of Chemical Technology & Biotechnology52(3): 317-330., 1991.
57. Tobin, J., C. White, et al., "Metal accumulation by fungi: applications in environmental biotechnology." Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology13(2): 126-130., 1994.
58. Shumate, S. and S. G. II, "Accumulation of metals by microbial cells." *Comprehensive biotechnology* 4: 235-253., 1985.
59. Bahadır, T., “Endüstriyel Atıksulardan Biyosorpsiyonla Kursorun Gideriminin İncelenmesi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*”, Yüksek Lisans, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, On Dokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, 2005.

60. Veglio, F. and F. Beolchini, "Removal of metals by biosorption: a review." *Hydrometallurgy*44(3): 301-316., 1997.
61. Kuyucak, N. and B. Volesky, "Biosorbents for recovery of metals from industrial solutions." *Biotechnology letters* , 10(2): 137-142., 1988.
62. Klimmek, S., Stan, H. J., Wilke, A., Bunke, G., Buchholz, R., "Comparative analysis of the biosorption of cadmium, lead, nickel, and zinc by algae", *Environ. Sci.Technol.*, 35: 4283-4288, 2001.
63. Mack, C., Wilhelmi, B., Duncan, J.R., Burgess, J. E., "Biosorption of precious metals", *Biotechnol. Adv.*, 25: 264–271, 2007.
64. Kaduková, J., Virčíková, E., "Comparison of differences between copper bioaccumulation and biosorption", *Environ. Int.*, 31: 227–232, 2005.
65. Kuyucak, N., Volesky, B., "Biosorbents for recovery of metals from industrial solutions", 37th Canadian Chemical Engineering Conference Proceedings, 283-286, 1987.
66. Winter, C., Winter, M., Pohl, P., "Cadmium adsorption by non-living biomass of the semi-macroscopic brown alga, *Ectocarpus siliculosus*, grown in axenic mass culture and localisation of the adsorbed Cd by transmission electron microscopy", *J. Appl. Phycol.*, 6: 479-487, 1994.
67. Bakkaloğlu, I., Butter, T. J., Evison, L. M., Holland, F. S., Hancock, I. C., "The kinetics of metal uptake by microbial biomass: implications for the design of a biosorption reactor", *Water Sci. Technol.*, 38: 269-277, 1998.
68. Matheickal, J. T., Yu, Q. M., "Biosorption of lead(II) and copper(II) from aqueous solutions by pre-treated biomass of Australian marine algae", *Bioresource Technol.*, 69: 223-229, 1999.
69. Davis, T. A., Volesky, B., Mucci, A., "A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae", *Water Res.*, 37: 4311-4330, 2003.
70. King, E. O., Ward, M. K., and Raney, D. E. "Two Simple Media for The Demonstration of Pyocyanin and Fluorescin", *J. Lab. Clin. Med.*, 44: 301-307, 1954.
71. Bahadır, T., "Endüstriyel Atık sulardan Biyosorpsiyonla Kurşun Gideriminin İncelenmesi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*", Yüksek Lisans, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, On Dokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, 2005.

72. Gourdon, R., Bhende, S., Rus, E., Sofer, S.S., "Comparision cadmium biosorption by gram-positive ve gram-negative bacteria from activated sludge", *Biotechnol. Lett.*, 12(11): 839-842., 1990.
73. Huang, C.P., Huang, C.P., Morehart,A.L., "The Removal of Cu(II) from dilute aqueous solution by *Saccharomyces cerevisi*", *Wat. Res.*, 24: 433-439., 1990.
74. Aksu, Z., Sağ, Y., Kutsal, T., "The biosorption of Copper(II) by *C. vulgaris* and *Z. Ramigera*", *Environ. Technol.* 13: 579–586., 1992.
75. Tsezos, M., "The selective extraction of metal from solution by microorganism", A brief overwiev. *Canadian Metallurgical Quarterly*, 24(2): 141-144., 1985.
76. Yu, Q., Matheickal, J.T., Yin, P., Kaewsarn, P., "Heavy metal uptake capacities of common marine macro algal biomass", *Wat. Res.*, 33(6): 1534-1537., 1999.
77. Vieira R.H.S.F., Volesky B. "Biosorption: a solution to pollution", *Internatl. Microbiol.* 3, 17-24., 2000.
78. Acikel, U., "Melas katılan ve agir metal kirliligi iceren atık sularda cesitli turdeki maya hucrelerinin buyume kinetiginin ve hucrelerdeki metal biyobirikiminin incelenmesi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*", Doktora, Kimya Muhendisligi Anabilim Dalı. Ankara, Hacettepe Universitesi, 202., 2003.
79. Tobin, J., C. White, et al. "Metal accumulation by fungi: applications in environmental biotechnology." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 13(2): 126-130., 1994.
80. Garnham, G. W., G. A. Codd, et al. "Kinetics of uptake and intracellular location of cobalt, manganese and zinc in the estuarine green alga *Chlorella salina*." *Applied microbiology and biotechnology* , 37(2): 270-276., 1992.
81. Gadd, G. M., *Metal transformations.*, 2001.
82. Mejare, M., Bulow, L., "Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals", *Trends Biotechnol.*, 19: 67–73, 2001.
83. Srinath, T., Verma, T., Ramteke, P. W., Garg, S. K., "Chromium(VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria", *Chemosphere*, 48 (4): 427-435, 2002.
84. Van Ho, A., Ward, D. M., Kaplan, J., "Transition metal transport in yeast", *Ann. Rev. Microbiol.*, 56: 237-261, 2002.
85. Zalups, R. K., Ahmad, S., "Molecular handling of cadmium in transporting epithelia", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 186: 163-188, 2003.

86. Gadd, G. M., "Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms.", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 46(8): 834-840., 1990.
87. Ting, Y., F. Lawson, et al., "Uptake of cadmium and zinc by the alga *Chlorella vulgaris*: Part 1. Individual ion species.", *Biotechnology and Bioengineering*, 34(7): 990-999., 1989.
88. Beveridge, T. J., "Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization.", *Annual Reviews in Microbiology*, 43(1): 147-171., 1989.
89. Roane, T. M., Josephson, L., Pepper, I. L., "Dual-bioaugmentation strategy to enhance remediation of co-contaminated soil", *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 3208–3215, 2001.
90. Sprocati, A. R., Alisi, C., Lia Segre, L., Tasso, F., Galletti M., Cremisini, C., "Investigating heavy metal resistance, bioaccumulation and metabolic profile of a metallophile microbial consortium native to an abandoned mine", *Sci. Total Environ.*, 366 (2-3): 649-658, 2006.
91. Öztürk Ş., "Çeşitli tatlı sulardan izole edilen bazı *Synechocystis sp.* izolatlarına Cr(VI) ve Cd(II) ağır metallerinin etkisi ve giderimi: metal gideriminin protein ve tiyoller açısından değerlendirilmesi, *FBE*", Doktora Tezi, Gazi Üniv., Ankara, 2008.
92. Donmez, G., Aksu, Z., "Removal of chromium(VI) from saline wastewaters by *Dunaliella* species", *Process Biochem.*, 38: 751–762, 2002.
93. El-Sikaily, A., El Nemr, A., Khaled, A., Abdelwehab, O., "Removal of toxic chromium from wastewater using green alga *Ulva lactuca* and its activated carbon", *J. Hazard. Mater.*, 148: 216-228, 2007.
94. Anjana, K., Anubha, K., Kiran, B., Nisha, R., "Biosorption of Cr(VI) by immobilized biomass of two indigenous strains of cyanobacteria isolated from metal contaminated soil", *J. Hazard. Mater.*, 148: 383-386, 2007.
95. Kiran, B., Kaushik, A., Kaushik, C. P., "Biosorption of Cr(VI) by native isolate of *Lyngbya putealis* (HH-15) in the presence of salts", *J. Hazard. Mater.*, 141: 662–667, 2007.
96. Mabbett, A. N., Lloyd, J. R., "Macaskie, L. E., Effect of complexing agents on reduction of Cr(VI) by *Desulfovibrio vulgaris* ATCC 29579", *Biotechnol. Bioeng.*, 79: 389–397, 2002.
97. Şahin, Y., Öztürk, A., "Biosorption of chromium(VI) ions from aqueous solution by the bacterium *Bacillus thuringiensis*" *Process Biochem.*, 40: 1895-1901, 2005.

98. Yan, G., Viraraghavan, T., “Heavy metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*”, *Water Res.*, 37: 4486–4496, 2003.
99. Krheminska, H., Fedorovych, D., Babyak, L., Yanovych, D., Kaszycki, P., Koloczek, H., “Chromium(III) and (VI) tolerance and bioaccumulation in yeast: a survey of cellular chromium content in selected strains of representative genera”, *Process Biochem.*, 40: 1565–1572, 2005.
100. Shin, M., Nguyen, T., Ramsay, J., “Evaluation of support materials for the surface immobilization and decoloration of amaranth by *Trametes versicolor*”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60: 218–223, 2002.
101. Suhail, A., Amjad A. K., Qayyum, H., “Potential of immobilized bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidases in the decolorization and removal of textile dyes from polluted wastewater and dyeing effluent”, *Chemosphere*, 60: 291–301, 2005.
102. Wu, J., Yu, H.-Q., “Biosorption of 2,4-dichlorophenol by immobilized white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* from aqueous solutions”, *Bioresource Technol.*, 98: 253–259, 2007.
103. Gardea-Torresdey, J. L., Arenas, J. L., Francisco, N. M. C., Tiemann, K. J., Webb, R., “Ability of immobilised cyanobacteria to remove metal ions from solution and demonstration of the presence of metallothionein genes in various strains”, *J. Hazard. Sub. Res.*, 1: 1-18., 1998.
104. Murray RP, Rosenthal KS, Faller MA. *Pseudomonas* and related bacteria. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology Lange Basic Science*. Mosby Elsevier. McGraw- Hill, 333-341., 2010.
105. Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *CID*, 43: 49-56, 2006.
106. www.textbookofbacteriology.net, 2012.
107. *Pseudomonas*. In Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry and M.A. Pfaller. Editörler, *Manual of clinical microbiology*. 9th ed. Washington, D.C: ASM press, 734-748., 2007.
108. Winn WC, Koneman EW, Allen S, Janda W, Procop G, Woods G. ve ark. *The Nonfermentative Gram-Negative Bacilli*. 5th edition Baltimore, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 303-353., 2006.

109. HOLT, G. J., KRIEG, N. R., SNEATH, P. H., STALEY, J. T., WILLIAMS, S. T., "In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.", ninth ed. , *The Williams and Wilkins Pub.*, M. D., USA., 1994.
110. GUO, Y., ZHENG H., YANG, Y., WANG, H., Characterization of *Pseudomonas corrugata* strain P34 Isolated from Soil in Beijing as a Potential *Biocontrol Agent*. 55: 247-253., 2007.
111. Borriello SP, Murray PR, Funke G. *Pseudomonas*. *Topley & Wilson's Microbiology & Microbial infections*. 10 th ed. ASM press; 1591-1606., 2005.
112. <http://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/pseudomonas-aeruginosa-photos/beta-and-gamma-hemolysis.html>
113. Bilgehan H., "Pseudomonas aeruginosa. Klinik Mikrobiyolojik Tanı", İzmir: Barış Yayınevi, 466-470., 2004.
114. Murray, R.G.E., Holt, J. G., "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., vol. 5", Springer-Verlag, New York , 2001.
115. Saeed, A., Iqbal, M., "Bioremoval of cadmium from aqueous solution by black gram husk (*Cicer arietinum*)", *Water Res.*, 37: 3472–3480, 2003.
116. Unsal, M., Çağatay, N., Bekiroğlu, Y., Kıratlı, N., Alemdağ, N., Aktaş, M., Sarı, E., "Karadeniz'de Ağır Metal Kirliliği", T.C. Tarım ve Köy işleri Bakanlığı, Deniz Bilimleri Enstitüsü – Erdemli, 1998.
117. Goyer R.A., Clarkson T.W., Toxic effects of metals, *In Toxicology*, The Basic Science of Poisons, Klaassen CD (ed.), McGraw-Hill Co., New York, pp.811-867., 2001.
118. Sneath, P. H. A., "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Edited by P. H. A. Sneath, N. S., Mair, M. E., Sharpe, J. G. Holt, *Williams and Wilkins*, 1 Baltimore, 2: 141-199, 1986.
119. Collier, L., Balow, A., Sussman, M., "Topley & Wilson's Microbiology and Microbiol Infections", *Systematic Bacteriology*, 9th edition, 2: 1091-1118, 1998.
120. Asthana, S., Rusin, P., and Gerba, C. P., "Influence of hydrocarbons on the virulence and antibiotic sensitivity associated with *Pseudomonas aeruginosa*", *Int. J. Environ. Health Research*, 7: 277-287, 1997.
121. Norman, R. S., Moeller, P., McDonald, T. J. and Morris, P. J., "Effect of pyocyanin on a crude-oil-degrading microbial community", *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 4004-4011, 2004.

122. Schlegel, H. 'Produktion Sekundärer Metabolite', *Allgemeine Mikrobiologie, Georg-Thieme Verlags*. 362-371, 1992.
123. Sun, F., Shao, Z., "Biosorption and bioaccumulation of lead by *Penicillium* sp. Psf-2 isolated from the deep sea sediment of the Pacific Ocean", *Extremophiles*, 11: 853–858, 2007
124. Leisinger, T., and Margraff, R., "Secondary Metabolites of The Fluorescent Pseudomonads", *Microbiol. Rev.*, 43: 422-442, 1979.
125. Sudhakar T., Karpagam S., Premkumar J., "Biosynthesis, antibacterial activity of pyocyanin pigment produced by *Pseudomonas aeruginosa* SU1", *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, , 7(3):921-924, 2015.
126. ONBAŞILI, D. , "Çevredeki organik kirleticilerden biyoteknolojik olarak bazı ikincil metabolitlerin üretimi, *Fen Bilimleri Enstitüsü* ", *Gazi Üniversitesi*, Ankara, 2006.
127. YALÇIN, S., "Atık sulardan izole edilen *Pseudomonas* spp.'ların ekzopolisakkarit üretimine bazı ağır metallerin etkisi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*", *Nevşehir Hacıbektaş Veli Üniversitesi* , Nevşehir, 2016.
128. YILMAZ , E.Ş., "Siyanobakterilerle ağır metallerin giderimi ve bunu etkileyen faktörlerin araştırılması, *Fen Bilimleri Enstitüsü*", *Hacettepe Üniversitesi*, Ankara, 2009.
129. Raungsomboon, S., Chidthaisong, A., Bunnag, B., Inthorn, D., Harvey, N.W., "Production, composition and Pb²⁺ adsorption characteristics of capsular polysaccharides extracted from a cyanobacterium *Gloeocapsa gelatinosa*", *Water Res.*, 40, 3759–3766., 2006.
130. Banerjee, M., Mishra, S., Chatterjee, J., "Scavenging of nickel and chromium toxicity in *Aulosira fertilissima* by immobilization: Effect on nitrogen assimilating enzymes", *Electron. J. Biotechnol.*, 7, 3- 15., 2004.
131. Silver, S., Ji, G., "Newer systems for bacterial resistance to toxic heavy metals", *Environ. Health Perspective*, 102, 107-113., 1994.
132. Macaskie, L.E., Dean, A.C., "Cadmium accumulation by a *Citrobacter* sp. ", *J. of Gen. Microbiol.*, 130, 53-62., 1984.
- 133 .Bayındır, Ü., "Zoogloea ramigera'nın ağır metalde üreme karakteristiği ve ağır metali toplama kapasitesinin araştırılması, *Fen Bilimleri Enstitüsü*", Y.Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, 2003.

134. Lovely, D.R., Phillips, E.J., Gorby, Y., Landa, E.R., “Microbial reduction of uranium”, *Nature*, 350, 413-416., 1991.
135. Liv, Y., Lam, M. C., Fong, H.H.P., “Adsorption of heavy metal by *Saccharomyces cerevisiae*: areview”, *Biotechnol Adv.*, 24(5):427, 451, 2006.
136. Ahuja, P., Mohapatra, H., Saxena, R. K., Gupta, R., “Reduced uptake as a mechanism of Zinc tolerance in *Oscillatoria angustissima*”, *Curr. Microbiol.*, 43: 305-310, 2001.
137. Bueno, B. Y. M., Torem, M. L., Molina, F., de Mesquita, L. M. S., “Biosorption of lead(II), chromium(III) and copper(II) by *R. opacus*: Equilibrium and kinetic studies”, *Miner. Eng.*, 21: 65–75, 2008.
138. Sağ, Y., Akçael, B., Kutsal, T., “Ternary biosorption equilibria of Cr(VI), Cu(II) and Cd(II) on *Rhizopus arrhizus*”, *Sep. Sci. Technol.*, 37 (2): 279–309, 2002.
139. <https://tr.wikipedia.org>
140. Congeevaram, S., Dhanarani, S., Park, J., Dexilin, M., Thamaraiselvi, K., “Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates”, *J. Hazard. Mater.*, 146: 270–277, 2007.
141. Saravanane, R., Sundararajan, T., Sivamurthyreddy, S., “Efficiency of chemically modified low cost adsorbents for the removal of heavy metals from wastewater”, *Indian J. Environ. Health*, 44: 78–81, 2002.
142. Bishnoi, N. R., Garima, A. P., “Biosorption of copper from aqueous solution using algal biomass”, *J. Sci. Ind. Res.*, 63: 813–816, 2004.
143. Gabr, R.M., Hassan, S.H.A., Shoreit A.A.M., “Biosorption of lead and nickel by living and non-living cells of *Pseudomonas aeruginosa* ASU 6a”, *Int.Biodeteri. And Biodeg.*, 62, 195-203., 2008.
144. Matsunaga, T., Takeyama, H., Nakao, T., Yamazawa, A., “Screening of marine microalgae for bioremediation of cadmium-polluted seawater”, *J. Biotechnol.*, 70: 33-38, 1999.
145. Fusconi, R., and Godinho, M. J. L., “Screening Exopolysaccharide-Producing Bacteria From Sub-Tropical Polluted Groundwater”, *Braz. J. Biol.*, 62: 363-369, 2002.
146. Robertson, E. B., and Firestone, M. K. “Relationship Between Desiccation and Exopolysaccharide Production in soil *Pseudomonas* spp.”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 1284-1291, 1992.

147. Bajguz, A., "Blockade of heavy metals accumulation in *Chlorella vulgaris* cells by 24-epibrassinolide", *Plant Physiol. Biochem.*, 38: 797-801, 2000.
148. Wang, J. L., Chen, C., "Biosorption of heavy metal by *Saccharomyces cerevisiae*: a review", *Biotechnol. Adv.*, 24 (5): 427–451, 2006.
149. Arunakumara, K. K. I. U., Xuecheng, Z., "Heavy metal bioaccumulation and toxicity with special reference to microalgae", *J. Ocean Univ. Chin.*, 7: 60-64, 2008.
150. Kumar, Y. P., King, P., Prasad, V. S. R. K., "Adsorption of zinc from aqueous solution using marine green algae-*Ulva fasciata* sp.", *Chem. Eng. J.*, 129: 161–166, 2007.
151. Volesky, B., Holan, Z.R., "Biosorption of heavy metals", *Biotech. Progress*, 11, 235–250., 1995.
152. Pardo, R., Herguedas, M., Barrado, E., Vega, M., "Biosorption of cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass of *Pseudomonas putida*.", *Anal. and Bioanal. Chem.*, 376, 26–32., 2003.
153. Basnakova, G. and L. E. Macaskie, "Microbially enhanced chemisorption of nickel into biologically synthesized hydrogen uranyl phosphate: A novel system for the removal and recovery of metals from aqueous solutions.", *Biotechnology and Bioengineering* 54(4): 319-328., 1997.

ÖZGEÇMİŞ

Berrin Keloğlu 1980 yılında Nevşehir’de doğdu. İlkokul ve ortaokulu Nevşehir’de; liseyi Adana Laboratuvar Sağlık meslek Lisesi’nde tamamladı. 2000 yılında Hacettepe Üniversitesi Hastanesinde Laboratuvar Teknisyeni olarak göreve başladı.2001 yılında Hacettepe Üniversitesi S.H.M.Y.O Tıbbi Laboratuvar bölümünü kazandı; 2003 yılında bu bölümden mezun oldu. 2006 yılında Dikey Geçiş Sınavı ile Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde öğrenime başladı. 2008 yılında Biyoloji bölümü birincisi olarak mezun oldu. 2011 yılında Nevşehir Hacıbektaş Veli Üniversitesinde Yüksek Lisans Eğitime başladı. Halen Nevşehir Halk Sağlığı Laboratuvarında Biyolog olarak görev yapmaktadır. Evli ve 3 çocuk annesidir.

Adres: Nevşehir Halk Sağlığı Laboratuvarı 15 Temmuz Mahallesi Devlet Hastanesi
yanı Merkez/NEVŞEHİR
Telefon: 0 384 2152429
e-posta : berrinkeloglu@gmail.com

