

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

**ATIK SULARDAN İZOLE EDİLEN *Pseudomonas* spp.' ların
EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİNE BAZI AĞIR
METALLERİN ETKİSİ**

**Tezi Hazırlayan
Süleyman YALÇIN**

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

**Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Kasım 2016
NEVŞEHİR**

Doç. Dr. Şahlan ÖZTÜRK danışmanlığında Süleyman YALÇIN tarafından hazırlanan "Atık Sulardan İzole Edilen *Pseudomonas spp*' ların Ekzopolisakkarit Üretimine Bazı Ağır Metallerin Etkisi" başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

04/11/2016

JÜRİ

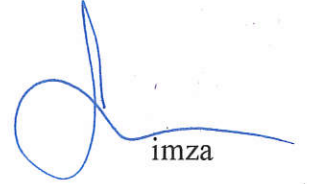
Başkan : Prof. Dr. Serkan YILMAZ


imza

Üye : Doç. Dr. Zeliha LEBLEBİCİ


imza

Üye : Doç. Dr. Şahlan ÖZTÜRK


imza

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 10.11.2016... tarih ve 41-387... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

10/11/2016
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.

Süleyman YALÇIN



TEŞEKKÜR

“Atık sulardan izole edilen *Pseudomonas* spp.’ların ekzopolisakkarit üretimine bazı ağır metallerin etkisi” konulu tez çalışmamın seçiminde, yürütülmesinde ve sonuçlandırılmasında, Yüksek Lisans eğitimim boyunca fikirlerini, emeğini ve desteğini her zaman üstümde hissettiren çok değerli danışmanım ve hocam sayın Doç. Dr. Şahlan ÖZTÜRK’ e

Çalışmalarım sırasında metal tayinlerine yardımcı olan Prof. Dr. Fatma KARİPCİN ve Doç. Dr. Zeliha LEBLEBİCİ’ ye

Yüksek lisansım süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Berrin KELOĞLU, Mehmet ŞARLI, Nursel KANAT ve Sebahattin ÇAYIR’ a

Çalışmalarıma destek olan Uzman Enver Ersoy ANDEDEN ve Araştırma Görevlisi Ezgi KESKİN’ e

Tez yazımında ve literatür taramamda bana yardımcı olan değerli arkadaşlarım Cihan İNAN, Esra AKÇABAĞ ÇIRA, Semra COŞKUN ve Emre ÇELİK’ e

Hayatım boyunca maddi manevi desteklerini benden esirgemeyen beni yetiştirip bu günlere gelmemi sağlayan çok değerli babam Metin YALÇIN, annem Nebahat YALÇIN, ablalarım Arzu YALÇIN AYNACIOĞLU ve Emel YALÇIN, eniştem Volkan AYNACIOĞLU ve hayatımın neşe kaynağı biricik yeğenim Ece Naz AYNACIOĞLU’ na

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**ATIK SULARDAN İZOLE EDİLEN *Pseudomonas* spp' ların
EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİNE BAZI AĞIR MATALLERİN ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Süleyman YALÇIN

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

Kasım 2016

ÖZET

Bu çalışmada atık su arıtma havuzlarından alınan örneklerden 50 adet *Pseudomonas* spp. izole edilmiştir. İzolatların; koloni morfolojileri, gram boyama sonuçları ve VITEK 2 Compact 30 (biomerieux) cihazında yapılan tür tanımlamaları sonucunda 27 adet *Pseudomonas aeruginosa* ve 23 adet *Pseudomonas stutzeri* oldukları tespit edilmiştir. Tanımlanan izolatlar 10 ppm Cr(VI), Cd(II), Cu(II) ve Mn(II) konsantrasyonlarına maruz bırakılarak bu metallere karşı canlılıkları tespit edilmiş ve her metal için canlılığını en çok koruyan izolatlar seçilmiştir. Aynı zamanda izolatların canlılık değerlerine göre uygulanacak metallerin 4 farklı derişimi belirlenmiştir. Buna göre Cr(VI) için S9, S17, S18, S24 ve S46 izolatlarının canlılıklarını en çok korudukları tespit edilmiş ve bu izolatlara uygulanacak Cr(VI) konsantrasyonları 5, 7,5, 10, 15 ppm olarak belirlenmiştir. S10, S23, S32, S44 ve S50 izolatları Cd(II) için en dirençli olup uygulanacak konsantrasyonlar 10, 20, 30, 40 ppm olarak belirlenmiştir. Cu(II) için S7, S8, S25, S32 ve S45 dirençli izolatlar seçilerek uygulanacak konsantrasyonlar 10, 20, 40, 80 ppm belirlenmiştir. Mn(II) metali için ise S10, S29, S32, S44 ve S50 dirençli izolatlara uygulanacak Mn(II) konsantrasyonları 100, 200, 300, 400 ppm olarak belirlenmiştir. Seçilen izolatlara belirlenen metal konsantrasyonları verilerek yüzde ölüm değerleri tespit edilmiş ve LC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Buna göre en dirençli izolatlar Cr(VI) metalinde S24, Cd(II) metainde S32, Cu(II) metalinde S8 ve Mn(II) metalinde S37 olduğu tespit edilmiştir. 50 adet izolatın metale maruz bırakılmadan ekzopolisakkarit (EPS)' leri elde edilmiştir. Buna göre en yüksek EPS miktarı

Pseudomonas aeruginosa S20 (52,03 mg/L) ve *Pseudomonas stutzeri* S39 (52,03 mg/L) izolatlarında, en düşük EPS miktarı ise *Pseudomonas stutzeri* S25 (17,81 mg/L) ve *Pseudomonas stutzeri* S45 (17,18 mg/L) izolatlarında olduğu görülmüştür. Her metal için seçilen izolatlar, belirlenen konsantrasyonlarda metale maruz bırakılarak EPS izolasyonu gerçekleştirilmiştir. 15 ppm Cr(VI) konsantrasyonunda en yüksek EPS üretiminin *Pseudomonas stutzeri* S46 izolatında (74,68 mg/L), en düşük EPS üretiminin ise *Pseudomonas stutzeri* S18 izolatında olduğu (39,37 mg/L) tespit edilmiştir. 40 ppm Cd(II) konsantrasyonunda en yüksek EPS üretiminin *Pseudomonas stutzeri* S23 izolatında (60,93 mg/L), en düşük EPS üretiminin ise *Pseudomonas aeruginosa* S10 izolatında olduğu (40,93 mg/L) belirlenmiştir. 80 ppm Cu(II) konsantrasyonunda en yüksek EPS üretiminin *Pseudomonas stutzeri* S45 izolatında (74,06 mg/L), en düşük EPS üretiminin ise *Pseudomonas aeruginosa* S8 izolatında olduğu (28,28 mg/L) görülmüştür. 400 ppm Mn(II) konsantrasyonunda en yüksek EPS üretiminin *Pseudomonas stutzeri* S44 izolatında (46,40 mg/L), en düşük EPS üretiminin ise *Pseudomonas stutzeri* S50 izolatında olduğu (26,56 mg/L) tespit edilmiştir. Sonuç olarak artan metal dozlarına maruz kalan *Pseudomonas* spp. izolatlarının ürettikleri EPS miktarlarında da artış olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma ile atık sulardan izole edilen *Pseudomonas* spp. izolatlarının bazı ağır metallerin EPS üretimine etkisi biyoteknolojik açıdan vurgulanmıştır.

Anahtar kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, Ağır metal, Ekzopolisakkarit.

Tez danışmanı: Doç. Dr. Şahlan ÖZTÜRK

Sayfa adedi: 82

**EFFECT OF SOME HEAVY METALS ON EXOPOLYSACCHARIDE
PRODUCTION OF *Pseudomonas* spp. ISOLATED FROM WASTE WATER**

(M. Sc. Thesis)

Süleyman YALÇIN

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

November 2016

ABSTRACT

In this study, 50 *Pseudomonas* spp. have been isolated from the instances of waste water purification pool. 27 *Pseudomonas aeruginosa* and 23 *Pseudomonas stutzeri* strains were detected according to colony morphologies, gram staining and type definitions that have been made in the vitek 2 compact 30 (biomerieux) device. Identified isolates were exposed by 10 ppm Cr(VI), Cd(II), Cu(II) and Mn(II) concentrations and detected their viabilities against these metals and by this way determined the most resistant isolates for each metal. Also, four different concentrations of these metals were determined according to viability of isolates. It was determined S9, S17, S18, S24 and S46 isolates protect their viability and concentrations of Cr(VI) were as 5, 7, 5, 10, 15 ppm. S10, S23, S32, S44 and S50 isolates were the most resistant isolates to 10, 20, 30, 40 ppm concentrations of Cd(II). S7, S8, S25, S32 and S45 isolates were selected based on resistance to 10, 20, 40, 80 ppm concentrations of Cu(II). Mn(II) concentrations were determined as 100, 200, 300, 400 ppm for S10, S29, S32, S44 and S50 resistant isolates. % death values of isolates were determined by treated with metal concentrations and LC₅₀ values of metals were calculated. Accordingly, the most resistive isolate in Cr(VI) metal is S24, in Cd(II) is S32, in Cu(II) is S8 and in Mn(II) metal is S37. It has been obtained exopolisaccharides (EPS) of the 50 isolates without exposing them to the metal. Accordingly, it has been found that the

highest amount of EPS is in *Pseudomonas aeruginosa* S20 (52,03 mg/L) and in *Pseudomonas stutzeri* S39 (52,03 mg/L) isolates, the lowest amount of EPS is in *Pseudomonas stutzeri* S25 (17,81 mg/L) and in *Pseudomonas stutzeri* S45 (17,18 mg/L) isolates. Isolates selected for each metal by exposing them to the specified concentrations, EPS isolation has been carried out. In 15 ppm Cr(VI) concentration it has been found that the *Pseudomonas stutzeri* of the highest EPS production is in S46 isolates (74,68 mg/L) while the lowest *Pseudomonas stutzeri* is in S18 (39,37 mg/L). In 40 ppm Cd(II) concentration; the *Pseudomonas stutzeri* of the highest EPS production is in S23 (60,93 mg/L), while the lowest EPS production is in *Pseudomonas aeruginosa* S10 isolates (40,93 mg/L). In 80 ppm Cu(II) concentration, the *Pseudomonas stutzeri* of the highest EPS production is in S45 isolate (76,06 mg/L) while the lowest EPS production is in *Pseudomonas aeruginosa* S8 isolates (28,28 mg/L). In 400 ppm Mn (II) concentration, the *Pseudomonas stutzeri* of the highest EPS production is in S44 isolates (46,40 mg/L), while the *Pseudomonas stutzeri* of the lowest EPS production is in S50 isolates (26,56 mg/L). As a result, exposed to increasing metal dose of *Pseudomonas* spp., the amount of EPS produced by the isolates has been found to be increased. By this study it has been expressed the effect of some heavy metals of *Pseudomonas* spp isolates, which have been isolated from wastewater, to the EPS production in terms of biotechnology.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, Heavy metal, Exopolysaccharide.

Thesis Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK

Page Number: 82

İÇİNDEKİLER

1.BÖLÜM	1
GİRİŞ	1
2.BÖLÜM	3
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Atık Sular	3
2.2. Ağır Metaller	8
2.2.1. Krom, kadmiyum, bakır ve mangan kirlenmesi ve etkileri.....	8
2.2.2. Atık sulardan ağır metallerin giderimi.....	11
2.3. Mikroorganizma-Metal İlişkisi.....	11
2.4. Mikroorganizmalarla Ağır Metal Giderimi	12
2.5. Mikrobiyal Ekzopolisakkaritler	15
2.5.1. Genel özellikler.....	15
2.5.2. EPS biyosentezi.....	17
2.5.3. EPS' nin endüstriyel önemi ve kullanım alanları	19
2.5.4. EPS üreten mikroorganizmalar	20
2.6. Pseudomonas Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri	22
3. BÖLÜM	24
MATERYAL VE METOT	24
3.1. Materyal	24
3.1.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar	24
3.1.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri.....	24
3.1.3. Çalışmada kullanılan metaller	25

3.2. Metot.....	25
3.2.1. Atık sudan <i>Pseudomonas</i> izolatlarının elde edilmesi.....	25
3.2.2. İzolatların muhafazası	26
3.2.3. Gram boyama yöntemi	26
3.2.4. Metallerin sulu çözeltilerinin hazırlanması	27
3.2.5. İzolatların metal toleranslarının tespiti.....	28
3.2.6. Seçilen izolatların belirlenen metal derişimlerinde büyüme eğrileri.....	28
3.2.7. LC ₅₀ tayin metodu	29
3.2.8. EPS izolasyon metodu	29
3.2.9. Fenol – sülfürik asit metodu.....	30
3.2.10 İstatistiksel veri	30
4. BÖLÜM	31
BULGULAR	31
4.1. Atık sudan <i>Pseudomonas</i> izolasyonu	31
4.2. İzolatların tanımlamaları	32
4.3. İzolatların metal toleranslarının tespiti.....	33
4.4. Dirençli İzolatların belirli konsantrasyonlardaki metallerde % ölüm ve LC ₅₀ değerleri	36
4.5. İzolatların metalli ve metalsiz ortamlarda EPS miktarları	49
5. BÖLÜM	61
TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER	61
KAYNAKLAR	68
ÖZGEÇMİŞ	82

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Türkiye’ de ve dünyada kabul edilen içme suyu standartları (2014’ te revize edilmiştir)	4
Tablo 2.2. Atık suların atık su altyapı tesislerine deşarjında öngörülen atık su standartları.....	7
Tablo 2.3. Prokaryotlarda metal düzenleyici protein grupları [37].....	14
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve karışım miktarları	25
Tablo 3.2. Metal isimleri ve MA’ sı, tuz formlarının kimyasal formülü ve MA’ sı.....	25
Tablo 3.3. Gram boyama ve süreleri.....	27
Tablo 4.1. İzolatların numaraları, tür adları, kaynağı ve gram boyama sonuçları.	32
Tablo 4.2. İzolatların 10 ppm’lik 4 farklı metalde % ölüm değerleri.	34
Tablo 4.3. Bakterilere uygulanacak metal derişimleri.	35
Tablo 4. 5 Metallere göre seçilen izolatların LC ₅₀ değerleri.....	38
Tablo 4.6. 50 izolatın EPS miktarları.....	49

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Metal alınımların mekanizmaları. (A) Hücre metabolizmasına göre sınıflandırma. (B) Metal gideriminin meydana geldiği yere göre sınıflandırma [30].	12
Şekil 4.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> S9 izolatına krom(VI) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi	39
Şekil 4.2. <i>Pseudomonas stutzeri</i> S17 izolatına krom(VI) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi	39
Şekil 4.3. <i>Pseudomonas stutzeri</i> S18 izolatına krom(VI) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi	40
Şekil 4.4. <i>Pseudomonas stutzeri</i> S24 izolatına krom(VI) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi	40
Şekil 4.5. <i>Pseudomonas stutzeri</i> S46 izolatına krom(VI) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi	41
Şekil 4.6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> S10 izolatına kadmiyum(II) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi	41
Şekil 4.7. <i>Pseudomonas stutzeri</i> S23 izolatına kadmiyum(II) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi	42
Şekil 4.8. <i>Pseudomonas stutzeri</i> S32 izolatına kadmiyum(II) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi	42
Şekil 4.9. <i>Pseudomonas stutzeri</i> S44 izolatına kadmiyum(II) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi	43
Şekil 4.10. <i>Pseudomonas stutzeri</i> S50 izolatına kadmiyum(II) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi	43
Şekil 4.11. <i>Pseudomonas stutzeri</i> S7 izolatına bakır(II) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi	44
Şekil 4.12. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> S8 izolatına bakır(II) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi	44
Şekil 4.13. <i>Pseudomonas stutzeri</i> S25 izolatına bakır(II) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi	45
Şekil 4.14. <i>Pseudomonas stutzeri</i> S32 izolatına bakır(II) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi	45

Şekil 4.15. <i>Pseudomonas stutzeri</i> S45 izolatına bakır(II) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi	46
Şekil 4.16. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> S10 izolatına mangan(II) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi.....	46
Şekil 4.17. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> S29 izolatına mangan(II) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi.....	47
Şekil 4.18. <i>Pseudomonas stutzeri</i> S32 izolatına mangan(II) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi.....	47
Şekil 4.19. <i>Pseudomonas stutzeri</i> S44 izolatına mangan(II) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi.....	48
Şekil 4.20. <i>Pseudomonas stutzeri</i> S50 izolatına mangan(II) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi.....	48
Şekil 4.21. Krom(VI) konsantrasyonlarına maruz kalan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> S9 izolatının EPS miktarları	51
Şekil 4.22. Krom(VI) konsantrasyonlarına maruz kalan <i>Pseudomonas stutzeri</i> S17 izolatının EPS miktarları	51
Şekil 4.23. Krom(VI) konsantrasyonlarına maruz kalan <i>Pseudomonas stutzeri</i> S18 izolatının EPS miktarları	52
Şekil 4.24. Krom(VI) konsantrasyonlarına maruz kalan <i>Pseudomonas stutzeri</i> S24 izolatının EPS miktarları	52
Şekil 4.25. Krom(VI) konsantrasyonlarına maruz kalan <i>Pseudomonas stutzeri</i> S46 izolatının EPS miktarları	53
Şekil 4.26. Kadmiyum(II) konsantrasyonlarına maruz kalan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> S10 izolatının EPS miktarları	53
Şekil 4.27. Kadmiyum(II) konsantrasyonlarına maruz kalan <i>Pseudomonas stutzeri</i> S23 izolatının EPS miktarları	54
Şekil 4.28. Kadmiyum(II) konsantrasyonlarına maruz kalan <i>Pseudomonas stutzeri</i> S32 izolatının EPS miktarları	54
Şekil 4.29. Kadmiyum(II) konsantrasyonlarına maruz kalan <i>Pseudomonas stutzeri</i> S44 izolatının EPS miktarları	55
Şekil 4.30. Kadmiyum(II) konsantrasyonlarına maruz kalan <i>Pseudomonas stutzeri</i> S50 izolatının EPS miktarları	55

Şekil 4.31. Bakır(II) konsantrasyonlarına maruz kalan <i>Pseudomonas stutzeri</i> S7 izolatının EPS miktarları	56
Şekil 4.32. Bakır(II) konsantrasyonlarına maruz kalan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> S8 izolatının EPS miktarları	56
Şekil 4.33. Bakır(II) konsantrasyonlarına maruz kalan <i>Pseudomonas stutzeri</i> S25 izolatının EPS miktarları	57
Şekil 4.34. Bakır(II) konsantrasyonlarına maruz kalan <i>Pseudomonas stutzeri</i> S32 izolatının EPS miktarları	57
Şekil 4.35. Bakır(II) konsantrasyonlarına maruz kalan <i>Pseudomonas stutzeri</i> S45 izolatının EPS miktarları	58
Şekil 4.36. Mangan(II) konsantrasyonlarına maruz kalan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> S10 izolatının EPS miktarları	58
Şekil 4.37. Mangan(II) konsantrasyonlarına maruz kalan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> S29 izolatının EPS miktarları	59
Şekil 4.38. Mangan(II) konsantrasyonlarına maruz kalan <i>Pseudomonas stutzeri</i> S32 izolatının EPS miktarları	59
Şekil 4.39. Mangan(II) konsantrasyonlarına maruz kalan <i>Pseudomonas stutzeri</i> S44 izolatının EPS miktarları	60
Şekil 4.40. Mangan(II) konsantrasyonlarına maruz kalan <i>Pseudomonas stutzeri</i> S50 izolatının EPS miktarları	60

RESİMLER LİSTESİ

Resim 2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bakterisinin ışık mikroskobu görüntüsü (x1000) [www.textbookofbacteriology.net 2012].....	23
Resim 3.1. VITEK 2 Compact 30 (biomerieux) cihazı.....	26
Resim 3.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> S28 gram boyama mikroskop görüntüsü	27
Resim 3.3. Mikroplate okuyucu (ivymen-2100-C) cihazı.	28
Resim 3.4. EPS izolasyonu TCA ekleme aşaması.	30
Resim 4.1. <i>Pseudomonas stutzeri</i> S6 izolatının <i>Pseudomonas</i> agar besiyerinde koloni morfolojisi.....	32
4.2. İzolatların tanımlamaları	32
Resim 4.2. Cr(VI) metaline maruz bırakılan izolatların mikroplate okuyucu (ivymen- 2100-C) plağındaki görüntüsü (N.K. : Negatif kontrol, P.K. : Pozitif kontrol).....	37

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
Cd	Kadmiyum
Cr	Krom
Cu	Bakır
Mn	Mangan
Zn	Çinko
DNA	Deoksirübo nükleik asit
CuCl ₂	Bakır klorit
CdCl ₂	Kadmiyum klorit
K ₂ Cr ₂ O ₇	Potasyum dikromat
MnCl ₂ ·6H ₂ O	Mangan (II) Klorür Hegzahidrat
CuSO ₄	Bakır sülfat
CO ₂	Karbondioksit
mg	Miligram
g	Gram
ng	Nanogram
kg	Kilogram
µg	Mikrogram
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
L	Litre
Mm	Milimetre
m	Metre
nm	Nanometre
cm	Santimetre

°C	Santigrat derece
MA	Molekül ağırlığı
kDa	Kilodalton
Da	Dalton
EPS	Ekzopolisakkarit
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
EPA	ABD Çevre Koruma Ajansı
TSE	Türk Standartları Enstitüsü
TCA	Trikloro Asetik Asit

1.BÖLÜM

GİRİŞ

Çevre kirliliği günümüzde, geleceğimizi tehdit eden en büyük tehlikelerden birini oluşturmaktadır. Su kirliliği ise çevre kirliliğinin önemli bir kısmını oluşturan ve hayatımızı tehdit eden etmenlerden biri olarak görülmektedir. Sanayileşme ve kentleşmenin büyümesi ile birlikte, atık suların temizlenmesiyle ilgili çalışmalar da artmaktadır. Doğada kendi kendini temizleme olarak bilinen süreç artık atık suyun yeniden kendini temizlemesini sağlamada yetersiz kalmakta ve dolayısı ile atık suların arıtımında yeni teknolojilerin oluşturulması ve geliştirilmesiyle ilgili çalışmalar giderek önem kazanmaktadır.

Ağır metal iyonları teknolojik öneme sahip oldukları için çeşitli endüstrilerde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Atık sularda mevcut ağır metal iyonları (krom, bakır, mangan, kadmiyum, kurşun, çinko, nikel, civa, demir, gümüş, altın, kobalt vs.) suda yaşayan canlılar üzerine toksik etki yapmaktadırlar. Ağır metallerin zehirleyici özelliklerinden dolayı ekosistemi kirletmeleri insan sağlığını da ileri derecede tehlikeye sokmaktadır. Bu nedenle atık sular çevreye verilmeden önce arıtılarak çeşitli su standartlarına göre izin verilen kirlilik değerlerinin altına düşürülmesi gerekmektedir.

Ağır metaller biyobirikime sebep oldukları için tehlikelidir. Ağır metal bileşiklerinin vücuda alınmaları ve depolanması, metabolize edilmelerinden veya atılmalarından daha hızlı olmaktadır. Bu tür atık suların arıtımında kullanılan klasik yöntemler (ozonlama, kimyasal çöktürme, adsorpsiyon, iyon değişimi, koagülasyon-flokülasyon vb.) yatırım ve işletme maliyetlerinin yüksekliği, arıtma sonrasında yeni kirleticilerin oluşması gibi nedenlerden dolayı pratik ve ekonomik olmamaktadır. Bu amaçla atık sulardaki ağır metal iyonlarının ekonomik olarak giderimi ve kazanımında mikroorganizmaların kullanılması mümkün olmaktadır. Yaşayan veya yaşamayan mikroorganizmalar seçici olarak atık sulardaki inorganik iyonları biriktirme ve ayırmada yüksek bir potansiyele sahiptirler [1].

Son yıllarda biyoteknoloji alanındaki araştırmalar mikroorganizmalar yardımı ile sulardaki atık maddelerin parçalaması ve yeni ürünlerin elde edilmesi esasına dayanmaktadır. Böylece hem çevre kirliliği azaltılmış olacak hem de insanların yaşamı

için yararlı ürünlerin elde edilmesi sağlanacaktır. Söz konusu atık maddelerin ham madde olarak kullanımı sonucu mikrobiyal yolla elde edilen biyoteknolojik ürünler mikrobiyal polisakkaritler, pigmentler ve biyosülfektanlar (biyo-yüzey aktif maddeler) olmak üzere sıralanabilmektedir [2, 3, 4]. Doğada birçok mikroorganizma, özellikle *Pseudomonas* cinsi üyeleri, üreme ve çoğalmak için farklı karbon kaynakları kullanarak ikincil (sekonder) metabolitler (ekzopolisakkarit, piyosiyenin ve ramnolipid) sentezlemektedirler [4-10].

Atık sularda yaygın olarak bulunan *Pseudomonas* cinsi bakterilerin, özellikle çevre kirliliği bakımından ciddi risk oluşturan kirletici faktörleri önemli oranda degradasyon kabiliyeti göstererek suların doğal yolla temizlenmesinde rol oynaması sebebiyle çevre biyoteknolojisine yönelik çalışmalarda tercih edilmektedir. Ancak bu özelliğinin yanı sıra bu bakteriler tarafından birçok alanda önemli olan biyoteknolojik metabolitlerin üretiminde biyoteknoloji alanındaki araştırmalara yeni bir boyut getireceği düşünülmektedir. Bu çalışmada, atık su örneklerinden izole edilen *Pseudomonas* spp. suşları kullanılarak bu suşların çeşitli çevrelerde diğer mikroorganizmalara nazaran canlı kalabilme şansını artıran ve onları üstün kılan ayrıca atık suların temizlenmesinde etkili olan ekzopolisakkarit metabolitlerini, atık sularda sıklıkla görülen ağır metallerin (krom, kadmiyum, bakır ve mangan) varlığında üretim yetenekleri araştırılmıştır.

Günümüzde mikroorganizmaların giderdiği ağır metal kadar, nasıl giderdiği de önem kazanmaktadır. Bu çalışma sonucunda EPS' nin metal direncine etkisi ve endüstriyel açıdan bu metabolitin biyoteknolojik olarak üretiminin artırılması ile ülke ekonomisine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2.BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

2.1. Atık Sular

Atık su; endüstride, tarımda ve kentlerde kullanıldıktan sonra akarsu, deniz ve göllere atılan sulara denilmektedir. Su kirliliği ise su ortamının doğal dengesinin bozulması olarak açıklanmaktadır. Su kirliliği, aynı zamanda alıcı ortam su kaynağının kimyasal, fiziksel, bakteriyolojik, radyoaktif ve ekolojik özelliklerinin olumsuz etkilenmesi ile biyolojik kaynaklarda, insan sağlığında, su kalitesinde ve suyun diğer amaçlarda kullanılmasında engelleyici bozulmalar yaratacak madde veya enerji atıklarının boşaltılması olarak da açıklanabilmektedir [11-13].

Sular; fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere üç şekilde kirlenebilmektedir. Renk, koku, tat, sıcaklık, saflık vs. gibi suyun fiziksel özelliklerinin değişmesi fiziksel kirliliğe neden olmaktadır. Suyun sıcaklığının değişmesi, gazların sudaki çözünürlüğünü değiştirmekte olup ayrıca, suyun yoğunluğu, viskozitesi, yüzey gerilimi sıcaklıkla değişmektedir. Tat ve koku suyun estetik değerini etkilemektedir. Bulanıklık ve renk ise ışığın suya sızmasını ve buna bağlı olarak organizma gelişimini ve suyun estetik özelliklerini değiştirmektedir. Söz konusu bu özellikler su yaşamına zararlı etki göstermekte ve diğer kirleticilerin varlığının göstergeleri olduğu bilinmektedir [12, 14]. Suda bulunan inorganik atıklar ve ağır metaller atık suda kimyasal kirlilikten kaynaklanmaktadır. Fosfor, azot, ağır metaller ve radyoaktif maddeler suyun tadını, yoğunluğunu, iletkenliğini ve osmotik basıncını değiştirmektedir. Bu maddeler suyun içerdiği çözülmüş oksijen derişimini düşürmektedir ve suda yaşayan canlıları etkilemektedir.

Organik atıkların etkisiyle yoğun olarak üreyen bakteriler, küfler ve algler de biyolojik olarak suyun kirlenmesine neden olmaktadır. Aynı zamanda virüsler ve patojen bakteriler de su ortamında üreyerek insan sağlığını etkilemektedir [15].

Sulardaki kirlilik doğal dengenin bozulmasına, sucul ekosistemlerin olumsuz yönde etkilenmesine ve suyun kendi kendini temizleme kapasitesinin azalmasına ve ya yok olmasına sebep olmaktadır. Su kirliliği sadece suları değil hava ve toprak gibi diğer

ekosistemleri de olumsuz yönde etkileyerek doğal dengenin bozulmasına yol açmaktadır [16].

Dünyada ve Türkiye’de su kirliliğinin önlenmesi, su kaynakları potansiyelinin korunması ve doğru kullanımı için gerekli hukuki ve teknik esasları ortaya koyan kriterler bulunmaktadır. Birçok element ve bileşik belirli oranların üzerinde bulunduğu toksik etki gösterir ve bu da ortamın doğal dengesinin bozulmasına neden olmaktadır. Türk Standartları (TSE 266), Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve ABD Çevre koruma ajansı (EPA)’ na göre su kalitesi kriterleri Tablo 2.1’ de verilmiştir. Atık suların atık su altyapı tesislerine deşarjında öngörülen atık su standartları Tablo 2.2’ de verilmiştir.

Tablo 2.1. Türkiye’ de ve dünyada kabul edilen içme suyu standartları (2014’ te revize edilmiştir)

	Türk Standartları TSE 266	Dünya Sağlık Örgütü WHO	ABD Çevre Koruma Ajansı EPA
BERRAKLIK (NTU)			
Bulanıklık	25	5	5
MİKROBİYOLOJİK PARAMETRELER			
Koliform Bakteri	<1	0	<1
ORGANİK KİMYASAL PARAMETRELER (mg/lit.)			
Toplam Trihalometanlar		400	100
İNORGANİK KİMYASAL			

MADDELER (mg/lt.)			
Alüminyum, Al	0,2	0,2	1
Arsenik, As	0,05	0,05	0,05
Baryum, Ba	0,3		1
Kadmiyum, Cd	0,01	0,01	0,01
Krom (Toplam)	0,05	0,05	0,05
Florür, F	1,5	1,5	0,7-2,4
Kurşun, Pb	0,05	0,05	0,05
Civa, Hg	0	0	0
Nitrat, NO ₃	50	50	45
Selenyum, Se	0,01		0,01
Gümüş, Ag	0,01		0,05
Antimon, Sb	0,01		0,01
Berilyum, Be			0
Asbest > 10 mikron			7 milyon lif/lt.
RADYOLOJİK PARAMETRELER			
Gross Alfa			15
Gross Beta			50
ESTETİK PARAMETRELER (mg/lt.)			
Klorür, Cl	600	250	250
Renk (Birim)	20	15	15

Bakır, Cu	3		1
Deterjanlar	0,2		0,5
Demir, Fe	0,2		0,3
Mangan, Mn	0,05	0,5	0,05
Koku Eşik Değeri (Birim)			3
pH	6,5-9,2	6,5-8,8	6,5-8,5
Sülfat,SO4	250	250	250
TDS	1500	1000	500
Çinko, Zn	5		5
İLAVE PARAMETRELER (mg/lt.)			
Kalsiyum, Ca	200		
Sertlik,CaCO3		500	
Magnezyum, Mg	50		
Potasyum, K	12		
Sodyum, Na	175	200	
Bakiye Klor	0,1-0,5	5	
Amonyum, NH4	0,05-0,5	1,5	

Tablo 2.2. Atık suların atık su altyapı tesislerine deşarjında öngörülen atık su standartları.

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.

2.2. Ağır Metaller

Yoğunlukları 5 g/cm^3 ' den büyük olan metallere ağır metal denilmektedir. Yoğunlukları suyun yoğunluğundan 5 kat daha fazla olup, doğada 21 metal olmayan, 16 hafif metal ve 53 ağır metal bulunmaktadır [17].

Yer kabuğunun doğal bileşenlerinden olan metaller; erozyon, rüzgar, maden yataklarının taşınması, orman yangınları ve volkanik patlamalar gibi doğal olaylar ile endüstriyel deşarjlar, çöp depo alanlarındaki sızıntılar gibi çeşitli insan aktiviteleri sonucunda alıcı ortamlara girmektedir. Maden işletmeleri (çinko, bakır, kurşun, demir, altın, krom, gümüş ve uranyum), metal (krom, bakır, çinko, demir-çelik vb.), metal kaplama, seramik, fotoğrafçılık, tekstil, kurşun batarya, matbaacılık, elektrik-elektronik, deri, kimya, boya ve otomotiv endüstrileri ağır metal içeren atık su üretmektedir [18]. Ağır metaller atık sularda biyolojik oksijen ihtiyacı değerini düşürerek, ortamın asidik hale gelmesini sağlamaktadır. Bu durum bu metallerle kirlenmiş sularda yaşayan ve bu suyu kullanan canlılar için çok zehirli bir hale gelmektedir. Ayrıca ağır metaller, besin yoluyla girdikleri canlı bünyesinden doğal fizyolojik mekanizmalarla atılamadıkları için bünyede birikmektedir [19]. Bu birikime demir, bakır, nikel, arsenik, krom, kurşun, civa, kadmiyum, çinko gibi ağır metal iyonları ile radyoaktif elementler neden olmaktadır [20-21].

2.2.1. Krom, kadmiyum, bakır ve mangan kirliliği ve etkileri

Krom metalik gri renkte olup, sanayide sıkça kullanılan ve kolayca kırılabilir. Erime noktası $1900 \text{ }^\circ\text{C}$, kaynama noktası $2671 \text{ }^\circ\text{C}$ ve yoğunluğu $7,1 \text{ g/cm}^3$ olan krom, evsel atıklar ve sanayilerden toprak ve suya karıştığı zaman çevre açısından çok zararlı bir hal almaktadır [22]. EPA, WHO ve Avrupa standartları doğal sularda maksimum $50 \text{ } \mu\text{g/L}$ Cr(VI)'ya izin vermektedirler [23]. Kromun yaygın olarak kullanıldığı; tekstil kumaş boyası, deri, metal kaplama vb. sanayilerinde krom içeren atık sular meydana gelmektedir. Metal kaplama sanayisinde arıtılma işleminden geçmemiş atık sular yaklaşık olarak 100 ppm Cr(VI) içermektedirler ve bu da izin verilen limit olan $0,05 \text{ ppm}$ 'den oldukça fazla olduğu için çevre açısından tehlikeli olmaktadır [24-26]. Kağıt endüstrisi çıkış sularında ise yaklaşık 80 ppm civarında krom atık olarak ortama bırakılmaktadır [27].

Cr(VI)'nın metabolizmadaki birikimi kansere yol açmakta ve genetik deformasyonlara sebebiyet vermektedir [26]. Krom insanlar tarafından yeme, içme, soluma ve deri teması ile alınabilmektedir. Cr(VI) solunum problemleri, deri kızarıklıkları, mide kanseri ve ülser, böbrek ve karaciğerlerde tahribat, immün sistemde zayıflama, akciğer kanseri, genetik materyalin değişmesi gibi sağlık problemlerine, daha ileriki safhalarda ise ölüme neden olmaktadır [28].

Kadmiyum(II) genellikle çinko ile kombine haldedir ve yeryüzünün hemen hemen her yerinde bulunmaktadır. Erime noktası 321 °C, kaynama noktası 767 °C ve yoğunluğu 8,64 g/cm³ olan kadmiyum, gübre ve pestisitte bol miktarda bulunduğu için en çok toprağa karışmaktadır [22]. Sularda meydana gelen kadmiyum kirliliği ise sanayi atıklarından kaynaklanmaktadır. Havada maksimum konsantrasyonu 0,1 mg/m³, suda ise maksimum konsantrasyonu 0,01 ppm' e izin verilmektedir [29].

İnsanlar Cd(II)'u genelde besinler vasıtası ile almakta ve kadmiyum miktarı yüksek besinler tüketildiğinde vücutta birikimlere neden olmaktadır. Midye, ahtapot, yosun, kakao, mantar ve karaciğer gibi besinler yüksek miktarda Cd(II) içerebilmektedir. Cd(II) kemik erimesi (Itai-itai sendromu), üreme bozuklukları ve kısırlık, ishal ve mide bulantısı, bağışıklık sisteminde zayıflama, merkezi sinir sistemi bozuklukları, böbrek hastalıkları (Fanconi sendromu), DNA' da hasar ve kanser gibi sağlık problemlerine neden olmaktadır [28].

Tarımsal kesimlerde havadaki ortalama bakır konsantrasyonu 5-50 ng/m³ iken tatlı suda 1-20 µg/L ve endüstriyel kirlenmemiş bölgelerdeki bakır konsantrasyonu ise 0,15 µg/L olmaktadır. Bakır, doğal suların pH değerine bağlı olarak çözünürlük sınırındaki azalma sonucu suların dibinde çökelmekte ve doğal yeraltı tatlı suların çökeleklerinde yaklaşık 16-5000 mg/kg (kuru ağırlık) arasında ve deniz dibinde yaklaşık 2-740 mg/kg (kuru ağırlık) bulunmaktadır. Kirlenmemiş toprakta ise bakır konsantrasyonu yaklaşık 30 mg/kg (sınır değeri 2-25 mg/kg) seviyelerinde olmaktadır [30]. Bakır işletme endüstrisi atık sularındaki Cu(II) kirliliği 400 mg/L'ye kadar çıkmaktadır. Bu değer su-nitelik standartlarına göre fazlasıyla yüksek gelmektedir [31]. Bakırın en önemli özelliklerinin arasında aşınma ve korozyon direnci, yüksek elektrik ve ısı iletkenliği, çekilebilme ve dövülebilme özellikleri sayılabilmektedir. Ayrıca alaşımları çok çeşitli olup endüstride

(basınçlı sistemler, borular, vanalar, otomotiv, elektrik santralleri ve elektrik-elektronik vb.) değişik amaçlı kullanılmaktadır [30].

Genelde yiyecek ve içeceklere kazayla bakır ihtiva eden maddelerin karışmasıyla veya kasten bakır tuzlarının yutulması sonucu zehirlenme gerçekleşmekte ve bu hastalık bakır çalığı olarak bilinmektedir. Cu(II) tuzlarıyla akut zehirlenmeler, endüstriyel atıkların ya da bakır tuzlarının özellikle CuSO₄ (bakır sülfat)' ün oral yolla alınmasıyla bazen ölümlerle sonuçlanmaktadır. Vücutta biriken aşırı bakır, karaciğerde tahribata sebebiyet vermektedir. Bakır karbonat, küçük bakır tanecikleri ya da bakır tozlarına maruz kalındığında mide bulantısı, zayıflık ve şiddetli aksırmaya neden olmaktadır. Ayrıca karın ağrısı, kusma, bitkinlik, sarılık, kansızlık, soluma zorluğu gibi etkilerde gözlenebilmektedir. Vücutta bakır birikmesi sonucu Wilson hastalığı meydana gelmekte ve ayrıca kronik olarak bakıra maruz kalmada ise akciğer kanseri tespit edilmektedir. Yüksek konsantrasyonda bakır, balık ve diğer sucul canlıların böbrek ve karaciğer gibi organları etkilemekte ve sinir sisteminde hasara yol açmaktadır [30-32].

Mangan yer kabuğunda bol miktarda bulunmaktadır. Doğada çeşitli oksidasyon kademelerinde bulunmakta olup II ve IV değerlikli oksidasyon kademeleri doğal sulara büyük öneme sahip olmaktadır [33]. Doğal su pH' ında, oksijen mevcudiyetinde Mn(IV) formu mevcut iken, indirgeyici ortamda Mn(II) bulunmaktadır [34]. Mangan içme suyu içerisinde estetik problemlere neden olmaktadır. Bu yüzden mangan konsantrasyonunun 0,05 mg/L (50 µg/L)' nin altında olması istenmektedir. Musluk sularında manganın 0,05 mg/L' nin üzerindeki derişimlerinde tat, koku ve renk olarak hissedilebilir seviyelerde olduğu görülmektedir. Plastik, deri, kağıt, dokuma, buz ve içecek gibi endüstrilerde kullanılan sulara manganın konsantrasyonlarının yüksek olması, ürünlerin görünüşünü ve rengini bozmaktadır. Gıda sanayisinde ise, ürünün tadının bozulmasına ve renginin değişmesine neden olmaktadır. İçme-kullanma suyu kaynaklarında mangan metalinin bulunması olumsuz sonuçlar oluşturmaktadır. Yüksek konsantrasyonda mangan içeren suların kullanımı; mangan oksit ile kaplanmış borular, temizlenme gereksini olan su ısıtıcıları ve aşırı dozda deterjan kullanımı ile ilgili çeşitli şikayetlere sebebiyet vermektedir [35].

2.2.2. Atık sulardan ağır metallerin giderimi

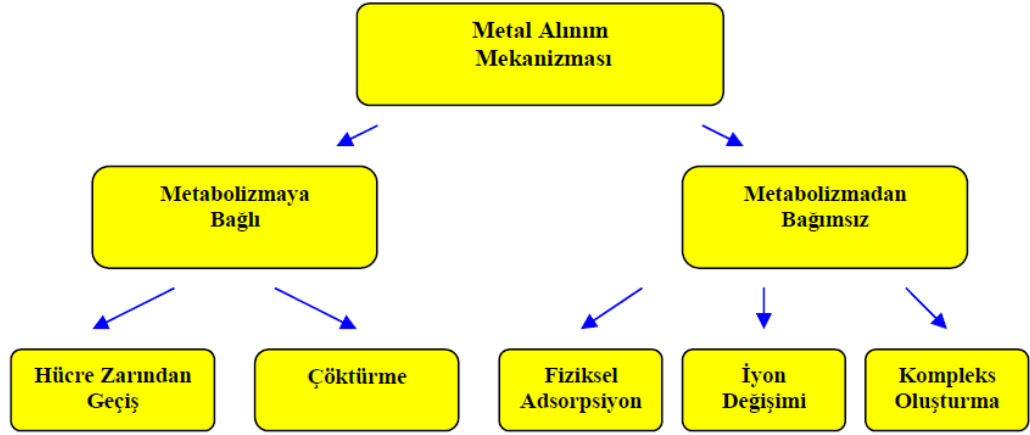
Atık sulardan ağır metallerin giderilebilmesi için birçok farklı yöntem kullanılmaktadır. Bu alanda en çok kimyasal çöktürme, iyon değişimi, kimyasal oksidasyon ve indirgeme, elektrokimyasal uygulama, filtrasyon ve ters ozmoz uygulanmaktadır. Bu klasik yöntemlerin kullanımı aktif çamurlarda yoğun toksik bileşikler meydana getirerek arıtımı daha da zor hale getirmekte ve maliyeti artırmaktadır [36]. Ayrıca bu yöntemler fazla maliyetli olmasından dolayı yüksek metal konsantrasyonların gideriminde kullanılırken, düşük konsantrasyonlu (1-100 ppm) metal kirliliğinde kullanılamamaktadır [37]. Bu nedenle endüstriyel atık sulardan ağır metal gideriminde biyolojik sistemlerin kullanılmasına yönelik biyoteknolojik uygulamalar ön plana çıkmaktadır. Ağır metallerin gideriminde birçok mikroorganizmanın canlı, ölü ve tutuklanmış hücreleri denenerek, alınımın en yüksek olduğu pH ve sıcaklık gibi çevresel şartlar araştırılmaktadır.

2.3. Mikroorganizma-Metal İlişkisi

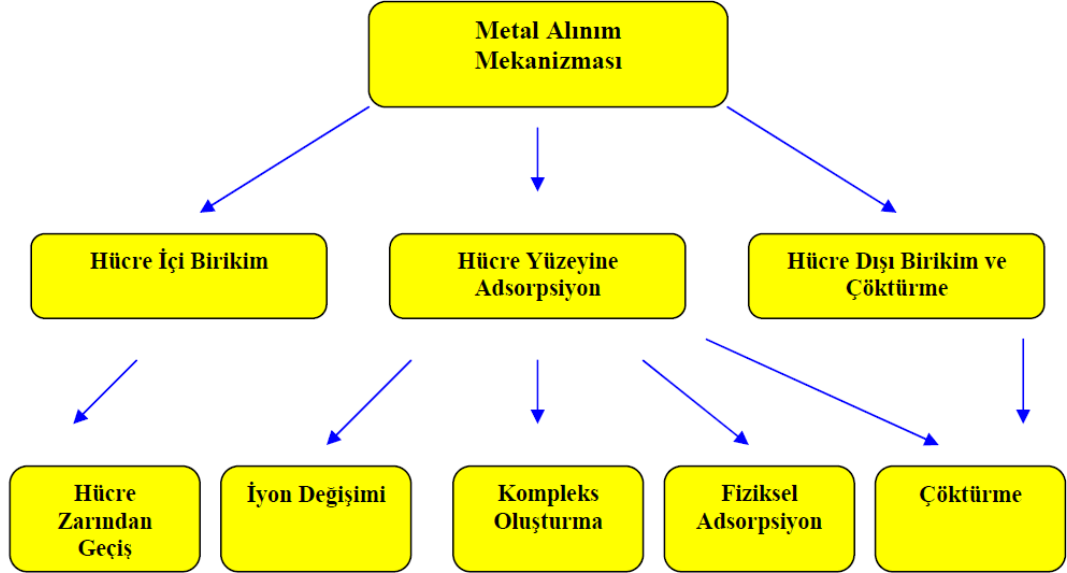
Mikroorganizmalar metali tamamen parçalayamamakta, ancak başka bir forma dönüştürerek toksik etkilerini azaltmakta veya tamamen kaybetmektedirler. Biyolojik olarak mikroorganizmalar ile ağır metal giderimi; metal iyonlarının hücre içine alınması (biyobirikim), ağır metalin mikroorganizmanın yüzeyine tutunması (biyosorpsiyon, adsorpsiyon) ve metallerin mikroorganizma tarafından salgılanan biyolojik ajanlarla kimyasal dönüşümü şeklinde tanımlanmaktadır [38].

Mikroorganizmalarla ağır metal giderimi metabolizmadan bağımsız olarak ve/veya metabolizmaya bağlı gerçekleşmektedir (Şekil 2.1) [39].

(A)



(B)



Şekil 2.1. Metal alımın mekanizmaları. (A) Hücre metabolizmasına göre sınıflandırma. (B) Metal gideriminin meydana geldiği yere göre sınıflandırma [30].

2.4. Mikroorganizmalarla Ağır Metal Giderimi

Mikroorganizmalarla ağır metal giderimi birçok araştırmacıya göre iki aşamada gerçekleşmektedir.

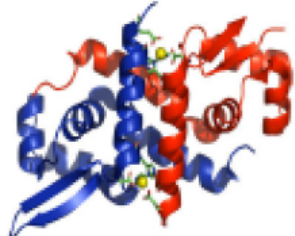
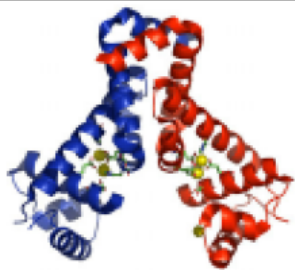
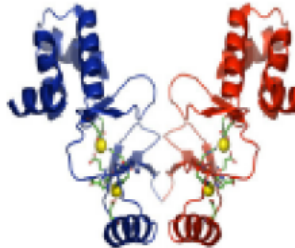
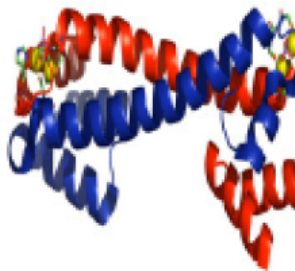
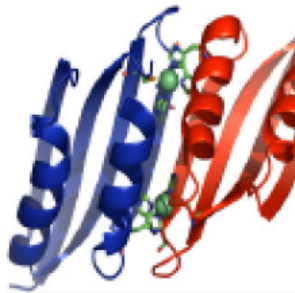
Birinci aşama: Pasif alım (fiziksel adsorpsiyon ya da hücre yüzeyinde iyon değişikliği) olarak tanımlanmaktadır. Hızlı bir reaksiyon olmaktadır ve mikroorganizma ile metal iyonlarının temasından çok kısa bir süre sonra gerçekleşmektedir. Hücre yüzeyine

metallerin bağlanması fizikokimyasal bir reaksiyon olup, hücre yüzeyinin yapısı ile yakından ilişkili olmaktadır. Her bir mikroorganizmanın biyosorpsiyondaki etkinliği mikroorganizmanın hücre duvarının kompozisyonuna ve mikroorganizma türüne göre büyük farklılıklar göstermektedir. Birçok mikroorganizmanın hücre yüzeyi lipit, protein ve polisakkarit içermektedir. Ayrıca hücre yüzeyindeki karboksil, hidroksil, amino, sülfat, sülfidril, fosfat ve tiyol grupları da metal bağlama özellikleri nedeniyle biyosorpsiyonu desteklemektedir [41].

İkinci aşama: Aktif alımın olarak tanımlanmakta olup metabolizmaya bağlı ve daha yavaş gerçekleşmektedir. Bu aşamada metal iyonları hücre zarından stoplazma içerisine taşınmaktadır [42]. Metaller stoplazma içerisine taşınırken, birçok mikroorganizmanın metal bağlayıcı proteinler sentezledikleri rapor edilmektedir. Metal bağlayıcı özelliğe sahip olan düşük moleküler ağırlıklı (6-7 kDa) bu proteinlere metalotiyoninler (MT) adı verilmekte ve ağır metallerin detoksifikasyonunda görev aldıkları düşünülmektedir [43-44]. Metalotiyoninler yüksek miktarda sistein aminoasiti içeren sülfidril grupları ihtiva etmektedirler [45]. Yapısal olarak MT zinciri Cys-X-Cys, Cys-Y-Cys veya Cys-X-Y-Cys şeklinde olup, X ve Y sistein dışındaki aminoasitleri temsil etmektedir [46].

Prokaryot hücrelerde, normal hücre metabolizması için gerekli olan kritik seviyelerin üstünde veya altındaki metal iyonu konsantrasyonlarını algılayan ve metallerin işlevini düzenleyen (metalloregulatory) proteinler görev almaktadır. Panella (2005)' e göre, prokaryotik metal düzenleyici proteinler 5 alt gruba ayrılmaktadır (tablo 2.3).

Tablo 2.3. Prokaryotlarda metal düzenleyici protein grupları [37]. ^a Her bir protein grubunun kristal yapısını göstermektedir. Yeşil, sarı ve kırmızı renkli protein yapıya bağlı metal iyonlarını ifade etmektedir

Örnek Protein ve Proteinin Bağladığı Metal Grupları	Proteinin Yapısı ^a
ArsR (As, Ab) CadC (Cd,Pb) CzrA, SmtB (Zn) NmtR (Ni)	
DtxR (Fe) IdeR (Fe) MntR (Mn)	
Fur (Fe) Zur (Zn)	
CueR (Cu) MerR (Hg) PbrR (Pb) ZntR (Zn)	
NikR (Ni)	

Siyanobakteriler ile sulardaki Zn^{2+} giderimi üzerinde yapılan çalışmalarda, giderimin hücredeki metallothionein proteinleri ve polifosfat rezervleri vasıtası ile yapıldığı belirlenmiştir [48-49].

Ağır metallerin gideriminde önemli ve etkili mikroorganizma metabolitlerinden bir diğeri de ekzopolisakkaritlerdir. Bazı prokaryot (bakteriler, arkeler ve siyanobakteriler) ve ökaryot (funguslar ve yeşil algler) mikroorganizmalar glukoprotein, polisakkarit, lipopolisakkarit ve peptid yapıda ekzopolisakkaritler üretmektedirler. Ekzopolisakkaritler (EPS) olumsuz çevre şartlarına maruz kaldıklarında bakteriler tarafından üretilen metabolik ürünlerdir [50-51]. EPS genellikle polisakkaritler, nükleik asitler, proteinler, uronik asit ve lipitlerden meydana gelir ve sülfidril karboksil, amin, fosforik ve hidroksil gruplarını ihtiva etmektedir [52-54]. Mikrobiyal ekzopolisakkaritler simbiyoz ve biyofilm oluşturma ve fagositozdan korunma gibi görevlerin yanı sıra stres şartlarına dirençlilik sağlamaktadır [55]. Yapılan birçok araştırmada ağır metale maruz kalan hücrelerin ekzopolisakkarit miktarlarının da arttığı gözlemlenmiştir [56-60].

2.5. Mikrobiyal Ekzopolisakkaritler

2.5.1. Genel özellikler

Mikrobiyal ekzopolisakkaritler (EPS), suda çözülebilen, iyonik veya iyonik olmayan biyopolimer özelliklerine sahip olmaktadır [61]. EPS, düz veya dallanmış monosakkaritlerin glikozidik bağ ile bağlanması sonucu oluşan, yüksek molekül ağırlığına sahip polimerlerdir. Ekzopolisakkariti oluşturan monosakkaritler çoğunlukla heksozlardır ancak pentozlar da ekzopolisakkarit yapısında bulunabilmektedir [62-64].

EPS, yüksek moleküler ağırlıklı polisakkaritler, protein, humik asit, lipid, DNA, nükleik asit, fosfolipid ve diğer polimerik bileşiklerden oluşmaktadır [65-66]. Bu nedenle süksinil, asetil veya pürivil gibi organik fonksiyonel gruplar ve sülfat gibi bazı inorganik bileşenlerden oluşmaktadır [65]. EPS normalde düşük miktarda DNA içermekte ve bu DNA da ölü hücrelerden lizis sonrası gelen DNA olmaktadır. Ancak yüksek miktardaki DNA zorlu ekstraksiyon metodundan dolayı hücrelerin lize olduğunun göstergesi olabilmektedir [67].

Birçok maya türleri ve bakteriler mikrobiyal EPS üretmektedir [68]. EPS üreten mikroorganizmalar katı yüzeylerde kolonilerin mukoid görünüşü ile belirlenebilmekte, sıvı besiyerinde ise oldukça viskoz bir ortam oluşturmaktadırlar [61].

EPS, homopolisakkarit ve heteropolisakkarit olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır. Homopolisakkaritler, 3 veya daha fazla monosakkaritten oluşmakta, ancak heteropolisakkaritler farklı monosakkaritlerin birleşmesiyle oluşmaktadır [69]. Levan ve dekstran gibi homopolisakkaritler tek tip monosakkaritten oluşmaktadır. Jellan veya ksantan gibi heteropolisakkaritler ise birkaç çeşit monosakkaritten oluşmakta ve kompleks bir yapıya sahip olmaktadır. Heteropolisakkaritler çoğunlukla hücre içerisinde sentezlenirler ve bakteriyel EPS grubunun önemli bir kısmını oluşturmaktadırlar [70].

Homopolisakkaritler 3 farklı türe ayrılmaktadır. Bunlardan ilki tek tip bağlardan oluşur ve düz nötral homopolisakkaritlerdir. Bu gruptan ayrı olarak açıl grupları içeren polianyonik homopolimerler mevcut olmaktadır [61]. Üçüncü tür ise daha kompleks yapıdaki nadir rastlanan sikleroglukan tipindeki türlerdir. Bu tür homopolisakkaritler, tekrarlayan 1,6- α -Dglikozil yan zincirlerinden dolayı tetrasakkarit ünitelerine sahip olmaktadır [71]. Homopolisakkaritlerin çoğu tek tip bağ içeren, düz, nötral glukanlar olmakla birlikte heteropolisakkaritlerin tamamı yapısındaki üronik asitten dolayı polianyonik özellik göstermektedirler [65].

Heteropolisakkaritler genellikle 1' den 4' e kadar farklı uzunluklardaki sahip, kısa yan zincirlerden meydana gelmektedir [62]. Heteropolisakkaritler D-galaktoz, D-glukoz, N-asetilgalaktozamin, N-asetilglikozamin, L-ramnoz ve glukoronik asit içeren birimlerin tekrarlanması ile meydana gelmektedir [72].

Mikrobiyal EPS' ler hücrel lokasyonları, fiziksel ve kimyasal yapı özellikleri ve fonksiyonları baz alınarak 3 ana sınıfa ayrılmaktadır. Hücre duvarının bileşeni olan lipopolisakkaritler, hücre içi karbon ve enerji kaynağı görevi gören sitozolik polisakkaritler ve slim veya kapsül formunda dış ortama salgılanan ekzopolisakkaritler olarak ayrılmaktadır. Bunlardan ilk ikisi hücrenin bir parçası olmaktadır [73].

EPS enerji kaynağı olarak katabolize edilmemekte, ancak EPS sentezi önemli ölçüde enerji gerektirmektedir. Birçok bakteri enerjisinin %70'den fazlasını EPS üretiminde

harcamaktadır [74-75]. Ekzopolisakkaritlerin başlıca görevi hücreyi çevreden korumaktır [70]. EPS, genetik bilginin korunması, enerji üretimi ya da enerji indirgenmesi, fosfat, protein ve silikon gibi makromoleküllerin depolanması, ağır metal ve antibakteriyel etkenler vb. tehlikeli çevresel faktörlere karşı savunma gibi önemli roller üstlenmektedir [76]. Hücrenin EPS tabakası ile çevrelenmesi hücreyi protozon istilasına ve kurumaya karşı korumaktadır. Ayrıca dış polisakkarit tabakasının anyonik yapısı esansiyel mineral ve bileşenlerin korunmasına yardımcı olmaktadır. EPS bazı metalleri indirgemekte ve bu nedenle metal ve iyonları şelatlama gücüne sahip olmaktadır [70].

EPS üretimi ışık, basınç ve sıcaklık yoğunluğu gibi çevresel baskılara direkt cevap olmaktadır. EPS üretimi dış çevrede etkileşimde olunan mikroorganizma ile çevrenin katı veya sıvı olmasından etkilenmektedir. Termofilik, asidofilik türler ve arkeler dahil EPS ekstrem şartlara adapte olmaya yardım etmektedir [70]. Doğal ortamında ekzopolisakkarit farklı işlevler görmektedir. Örneğin virülans faktörü ile bağlantılı olabilmekte, hayvan veya bitki patojenitesinde etki göstermekte, bitki-mikroorganizma interaksyonu, kurumaya karşı ya da bakteriyofaj ve protozoa saldırılarına karşı korumaktadır. Doğal ortamlarda da yapay ortamlarda da EPS biyofilm yapısında önemli yapısal rol oynamaktadır. Çoğu mikrobiyal koloninin doğal ortamında çeşitli sayılarda ökaryotik ve prokaryotik mikroorganizmalar katı-sıvı fazlara bağlanarak birlikte gelişmektedir [77].

2.5.2. EPS biyosentezi

EPS'ler, bakteri suşlarının çoğalma evresinde suşa ve çoğalma evresinin farklı kademelerine bağlı olarak değişen koşullarda sentezlenmektedir. Sentez olayı hücre dışında veya hücre membranında gerçekleşebilmektedir [78]. Çoğu EPS biyosentezi bakteriyel hücre duvarı polimerleri, lipopolisakkarit ve peptidoglukan sentezine benzemektedir [79].

EPS salgılanması 'Quorum sensing' olarak adlandırılan ve bakteri yoğunluğuna bağlı olarak spesifik feromonların salgılanması ile başlamaktadır. Salgılanan feromonlar biyofilm oluşumu, antibiyotik üretimi, sporulasyon gibi biyokimyasal olayları başlatmaktadır [80].

EPS'lerin biyosentezi, birçok bakteri suşu için önemli bir özellik olmaktadır. Sentez için farklı enzimlerin varlığına gereksinim olmakta ve EPS biyosentezinde rol oynayan enzimlerden bazıları lipopolisakkaritlerin sentezinde de yer almaktadır [81]. Çoğu bakteriyel ekzopolisakkarit hücre içinde sentezlenmekte ve hücre dışına makro molekül olarak salgılanmaktadır. Ancak bunun dışında dekstran ve levan gibi birkaç istisna mevcuttur. Bu istisna ekzopolisakkarit sentezi ve polimerizasyonu ise hücre dışında meydana gelmektedir. Salgılanan enzimler hücre dışında substratı polimere dönüştürmektedir [82]. EPS'lerin oluşumunda glukozil-transferaz, UDP-glukoz-dehidrogenaz, galaktozil-transferaz 1, 2 ve polimeraz gibi polisakkarit sentezine özgü olmayan birçok enzim görev almaktadır [83].

Bakteriyel biyosentetik yolu; substrat alımı, polisakkarit sentezi ve merkezi metabolit yolundan oluşmaktadır. Substrat tipine bağlı olarak aktif ve pasif taşıma sistemi ile hücreye alınmaktadır. Ardından substrat hücre içi fosforilasyonla katabolize edilmekte veya substrat taşınmakta ve oksidatif periplazmik yol boyunca okside edilebilmektedir [82]. Periplazmik oksidatif yol sadece bazı bakterilerde olmakla birlikte hücre içi fosforilasyon yolu çoğu bakteride bulunmaktadır. [82].

Ekzopolisakkarit sentezi nükleozid difosfat şekerlerini içeren intraselüler bir prosestir [79]. Genellikle kromozomlara lokalize olmuş gen veya genler tarafından kontrol edilmekte fakat bazı bakteri türlerinde kromozom ve megaplazmid olmak üzere iki farklı yolla kontrol edilmektedir [73]. Üretilen polimerin yapısına göre 12-17 kb büyüklüğünde gen sekansına ihtiyaç duyulmaktadır. Farklı polisakkarit sentez sistemleri arasında fazlasıyla benzerlik olduğu bulunmaktadır. Ancak ekstraksiyon ve polimerizasyon mekanizması hakkında yeterli bilgi mevcut olmamaktadır [79].

Çoğu ekzopolisakkarit için temel karbonhidrat yapısı gelişme koşullarıyla önemli bir değişim göstermez, fakat ikame gruplar geniş ölçüde değişebilmektedir. Bu sebeple de polimer özellikleri değişebilmektedir. Birçok ekzopolisakkarit üreten mikroorganizma değişen miktarlarda hücre içi depo ürünleri biriktirebilmekte, bu nedenle ekzopolisakkarit üretim potansiyeli düşmektedir. Ekzopolisakkarit sentezi üremenin ilk aşamalarında, üreme aşamasında ya da durgun fazda olabilmektedir [82].

Bakteriyel ekzopolisakkarit üretimini arttırmak amacıyla en ilgi çekici ve umut verici alan metabolik mühendisliğidir. Bu alanda, üretim reaksiyonu katalizleyen enzim genlerinin geliştirilmesiyle sağlanmaktadır. Aynı zamanda enzim aktivitesi veya gen ekspresyonunu düzenleyen genlerin değiştirilmesiyle sağlanmaktadır. Biyosentetik proses 3 farklı seviyede kontrol edilmektedir: şeker nükleotid öncülerinin sentezi, tekrarlayan birimlerin birleştirilmesi, polimerizasyon ve dışa salım [82].

2.5.3. EPS' nin endüstriyel önemi ve kullanım alanları

Birçok mikroorganizma, ekstraselüler polimerik araçların biyosentezi tarafından fonksiyonel bir konsorsiyum oluşturmakta ve biofilm olarak isimlendirilen EPS' leri sentezlemektedirler. Bu ürün bakterilerin besleyiciler ile konuşlanmış sert yüzeylere tutunmalarını sağlayan ve koloniler halinde büyümelerine yardım eden yapılardır [84-85]. Bu ekzopolisakkaritler ya bakteri yüzeyine tutulu olarak kalmakta ya da yapışkan bir şekilde ekstraselüler ortamlarda serbest olarak bulunmaktadırlar. Jel formasyonu absorpsiyon, emülsiyon, flokulasyon, film formasyonu ve koruma gibi pek çok role sahip bu polimerler biyolojik aktif biyofilm matriksinin yapı materyalidir [86].

Ekzopolisakkaritler yeni işlevsellikleri ile pek çok ilginç fiziki, kimyasal ve rehological (maddenin sıvı halindeki özellikleri) özelliklerinden dolayı yeni biyomateryaller gibi hareket ederler ve yapıştırıcı, deterjan, tekstil, mikrobiyal olarak zenginleştirilmiş petrol iyileştirmeleri (NEOR), dere yatağı temizlemeleri, atık su iyileştirmeleri, mayalanma, kozmetik, eczacılık ve gıda katkı maddesi olarak oldukça geniş kullanım alanlarına sahip olmaktadır [86-88]. Ayrıca biyofilm özelliği gösteren ekzopolisakkaritler bakteriyi antibiyotiklere ve deterjanlara karşı dirençli hale getirmektedirler [89-93]. Biyofilm bakteriyi yalnızca yaşayabilmesi için dış ortamdan koruması değil aynı zamanda bakterinin genetik özelliklerinin korunmasında ve genetik bilgi değişiminde de daha iyi ortamlar hazırlamaktadır [94].

Ekzopolisakkaritler insanoğlu üzerinde antivirüs, anti-tümör ve ateş düşürücü etmen olarak ilaç sanayisinde kaplama materyali olarak birçok fizyolojik aktivitelere katkıda bulunmakta ayrıca interferon, trombosit yığınları birikmesi ve faktör sentezlerini uyaran koloniler için teşvik edici olarak kullanılmaktadırlar [95]. 40.000-70.000 Da gibi düşük mol ağırlıklı olan EPS' ler tıpta en çok kullanılanlardır. Dekstran-kalsiyum kompleksi

hayvan beslemede hipokalsemi tedavisinde, dekstran-demir kompleksi anemi vakalarında kullanılmaktadır. Ağ yapılı sephadeks dekstranlar ise, biyolojik maddelerin fonksiyonlarına ayrılmasında ve saflaştırma işlemlerinde kullanılmaktadır [96,97].

Yapılan çalışmalar sonucunda ekzopolisakkaritlerin kolesterolü düşürdüğü, bağırsak florasını düzenlediği ve antiülser aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir [98,99]. Aynı zamanda kimya alanında inceltici olarak ekzopolisakkaritlerden yararlanılmaktadır [100].

Ekzopolisakkarit üreten laktik asit bakterileri gıda ürünleri ve fermente süt ürünlerinde reolojik karakteristik sağlaması ve tekstür özelliğini geliştirmesi için kullanılmaktadır, aynı zamanda gıda ürünlerinde kullanılan bu bakteriler geniş çeşitlilikte yapısal EPS üretirler ve bu ürünler gıda ürünlerinde biokoyulaştırıcı olarak kullanılmaktadır [101].

Yoğun çalışmaların konusu olan ve günümüzde ticaret ürünü olarak kullanılan farklı polimerler şunlardır: *Xanthomonas campestris* tarafından sentezlenen ksantan zankı, *Pseudomonas* türleri ve *Acetobacter chorococcum* tarafından sentezlenen alginatlar, *Streptococcusequii* tarafından sentezlenen hiyaluronik asit, *Sphingomonas paucimobilis* tarafından sentezlenen gellan, *Acetobacter xylinium* bakterisi tarafından sentezlenen bakteriyel selülozlar ve *Rhizobium* tarafından sentezlenen süksinoglikan gibi ürünler yaygın bir kullanım alanına sahip olmaktadır [97,102].

Bakteriler haricinde birçok mantarda gelişimi boyunca glikoz ve ekstraselüler homopolimer sentezi yapmaktadır. Mantarlar tarafından üretilen bu polimerlerde kozmetik, gıda ve ecza endüstrilerinde ticari kullanım alanları bulmaktadırlar. Ayrıca β (1 \rightarrow 3) ve β (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6) mantarimsı glikan tiplerinin anti-inflamatuar, anti-tümör ve immunodilasyon aktivitelerine sahip oldukları bilinmektedir [97,103,104].

2.5.4. EPS üreten mikroorganizmalar

Son yıllarda farklı mikrobiyal ekzopolisakkaritlerin araştırmasına büyük önem verilmiş, mikroorganizmaların birçoğunun değişen kompozisyonlarda EPS ürettikleri belirlenmektedir. Tespit edilen ekzopolisakkaritlerin özellikleri araştırılmış ve elde edilen bulgular sonucunda mikrobiyal ekzopolisakkaritlerin, karbon kaynakları için yarışan metabolitler oldukları belirlenmiştir [78].

EPS üreten birçok mikroorganizma izole edilmektedir. Bakteriler, arkeler, algler, funguslar ve çoğunlukla mezofilik, halofilik ve termofilik gruplardan izole edilmektedir. Mezofilik cinsler arasında *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus helveticus*, *Bacillus* spp., *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis* ve *Streptococcus* spp. türleri iyi derecede EPS üretmektedirler [105]. *Pseudomonas* spp., *Xanthomonas campestris*, *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter chorococcum*, *Streptococcus equii*, *Sphingomonas paucimobilis* gibi türlerin ve diğer pek çok bitki patojeni türün EPS ürettikleri bildirilmektedir [78]. Diğer potansiyel EPS üreticileri arasında *Sinorhizobium* spp., *Aureobasidium* spp., *Acetobacter* spp., *Escherichia* spp. türleri sayılabilmektedir. Termofilik mikroorganizma türleri bakteri ve arke filumlarında bulunabilir ve çeşitli çevrelerden izole edilen termofilik türler EPS üretme yeteneğinde olmaktadır. Termofilik arke türleri arasında *Sulfolobus* ve *Thermococcus* ekzopolisakkarit üretir, ayrıca *Thermococcus litoralis* ve *Archaeoglobus fulgidus*' un biyofilm yapısında önemli miktarlarda EPS ürettiği bildirilmektedir [105].

EPS üreten halofilik arke türleri arasında *Halococcus*, *Haloferax*, *Haloarcula*, *Halobacterium* ve *Natronococcus* türleri bulunmaktadır. En çok ve yaygın olarak EPS üreten halofilik bakteri türü *Halomonas* türüdür. EPS üreten *Halomonas* türleri önemli miktarda üronik asit ve yüksek sülfat üretmekte ve bu da jelleşme özelliğini belirlemektedir [105].

Ekstremofilik mikroorganizmalar grubundan EPS üreticisi ekstremofiller izole edilmekte ve optimize edilmiş şartlarda üretilmekte, EPS' lerin karakterizasyonu yapılmaktadır. Bu mikroorganizmalara *Alteromonas infernus*, *Alteromonas macleodii* spp. *fijiensis*, *Thermotoga maritima* ve *Vibrio diabolicus* gibi türler örnek olarak gösterilebilmektedir [71].

Rhizobium türlerinin iki farklı EPS ürettiği bilinmektedir. Bunlar süksinoglukan (EPS I) ve galaktoglukan(EPS II) olarak isimlendirilmektedir. EPS I üretilmekte fakat EPS II fosfat limitasyonu altında üretilmektedir [106].

2.6. *Pseudomonas* Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri

Pseudomonas' lar çomak şeklinde bir yapıya sahiptir ve çoğu türü hareketlidir. Hareketli olanlarda hareket lofotrik veya monotrik flagellerle olmaktadır. *Pseudomonas*' lar yeşilimsi mavi bir pigmente sahiptirler. Katı ortamlarda 24 saatte yaklaşık 5mm çapta, konveks, aromatik kokulu ve türe göre değişen özel renkte koloniler oluşturmaktadırlar. *Pseudomonas*' ların literatürde 84 türüne rastlanmaktadır ve tümü gram negatiftir. Bu türlerin çoğu frorasan pigment sentezlemektedir ve bazı türler bu sarımtırak yeşil pigmente ek olarak diğer renklerde bazı pigmentleride sentezlemektedirler. Örneğin *Pseudomonas aeruginosa* çözülebilen ve rengi mavi olan bir pigment daha sentezlemektedir [107].

Pseudomonas genusu türleri katalaz pozitif olmakta, bazı türleri insanlar, hayvanlar ve bitkilerde patojen özelliği göstermektedir. Birçok tür, sınırlı besin koşullarında geliştiğinde büyük miktarlarda β -hidroksibütirat biriktirmektedirler. *Pseudomonas* türlerinin hücre duvarları Gram-negatif bakterilerin hücre duvarlarına benzemektedir. Ancak kimyasal kompozisyonda birçok önemli farklılıklar bulunabilmektedir [107].

Pseudomonas türlerinin büyük çoğunluğu kemoorganotrofik olup, bazıları fakültatif kemolitotroftur, buna ek olarak H_2 ve CO_2 ' i enerji kaynağı olarak kullanabilmektedirler. *Pseudomonas*' ların pek çok türü amonyum iyonları veya nitrat ile tek karbon ve enerji kaynağı olarak organik bir bileşik içeren mineral besiyerlerinde gelişebilmektedir ve sadece birkaç tür ilave organik faktöre ihtiyaç duymaktadır. *Pseudomonas*' lar için temel bir beslenme karakteristiği, tek bir karbon bileşiği içeren çok basit bir mineral besiyerinde gelişme kapasitesidir [107].

Pseudomonas suşlarında sıklıkla bakteriosinler bulunmaktadır. Bakteriosinler, bakterilerin suşları tarafından üretilen ve aynı türün diğer suşları üzerinde letal etki gösteren proteinlerdir. Pek çok *Pseudomonas* türü birçok antibakteriyel ajana karşı dirençliliğe sahip olup, antibiyotik ve ilaç duyarlılığı pratikte yeni türlerin tanınmasında da önem arz etmektedir. *Pseudomonas aeruginosa* mikroskop görüntüsü resim 2.1' de verilmiştir [107]



Resim 2.1. *Pseudomonas aeruginosa* bakterisinin ışık mikroskobu görüntüsü (x1000)
[www.textbookofbacteriology.net 2012].

3. BÖLÜM

MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar

Atık su tesisinde bulunan giriş havuzu, kum ve yağ tutucu havuz, havalandırma havuzu, çökeltim havuzu ve çıkış havuzu olmak üzere beş ayrı havuzdan atık su örnekleri alınarak, bu sulardan 27 adet *Pseudomonas aeruginosa* ve 23 adet *Pseudomonas stutzeri* izolatları elde edilmiş ve çalışmada kullanılmıştır.

3.1.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri

Atık sulardan *Pseudomonas* izolatlarını elde etmek, elde edilen bakterileri muhafaza etmek, metallere maruz bırakmak ve bu bakterilerden EPS elde etmek için farklı besiyerleri belirtilen oranlarda kullanılmıştır.

Pseudomonas Agar F (base) (Merck KGaA)

Ticari olarak üretilip satın alınan *Pseudomonas* agar'ın 35 g'ı 10 mL gliserol ile birlikte 1000 ml distile suda çözülerek 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril hale getirilmiştir. Steril petri kaplarına dağıtılmıştır. Besiyerleri ve karışım oranları Tablo 3.1' de gösterilmiştir.

Nutrient broth (Merck KGaA)

Ticari olarak üretilip satın alınan nutrient broth'un 8 g'ı 1000 mL distile suda çözülerek 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril hale getirilmiştir. 5-10'ar mL şeklinde steril tüplere dağıtılmıştır. Besiyerleri ve karışım oranları Tablo 3.1' de gösterilmiştir.

Nutrient agar (Merck KGaA)

Ticari olarak üretilip satın alınan nutrient agar'ın 20 g'ı 1000 mL distile suda çözülerek 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril hale getirilmiştir. Steril petri kaplarına ve yatık agar hazırlamak için steril tüplere dökülmüştür. Besiyerleri ve karışım oranları Tablo 3.1' de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve karışım miktarları

Besiyerleri	Karışım miktarları
Pseudomonas agar F (base) (Merck KGaA)	35 g/1000 mL + 10 mL gliserol
Nutrient broth (Merck KGaA)	8 g/1000 mL
Nutrient agar (Merck KGaA)	20 g/1000 mL

3.1.3. Çalışmada kullanılan metaller

Çalışmada Krom(VI), Kadmiyum (II), Bakır (II) ve Mangan (II) olmak üzere 4 farklı metal kullanılmıştır. İzolatlar uygun besiyeri ortamında tuz formundaki metallere maruz bırakılmıştır. Kullanılan metallerin isimleri ve molekül ağırlıkları (MA), tuz formlarının kimyasal formülü ve molekül ağırlıkları (MA) Tablo 3.2' de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Metal isimleri ve MA' sı, tuz formlarının kimyasal formülü ve MA' sı

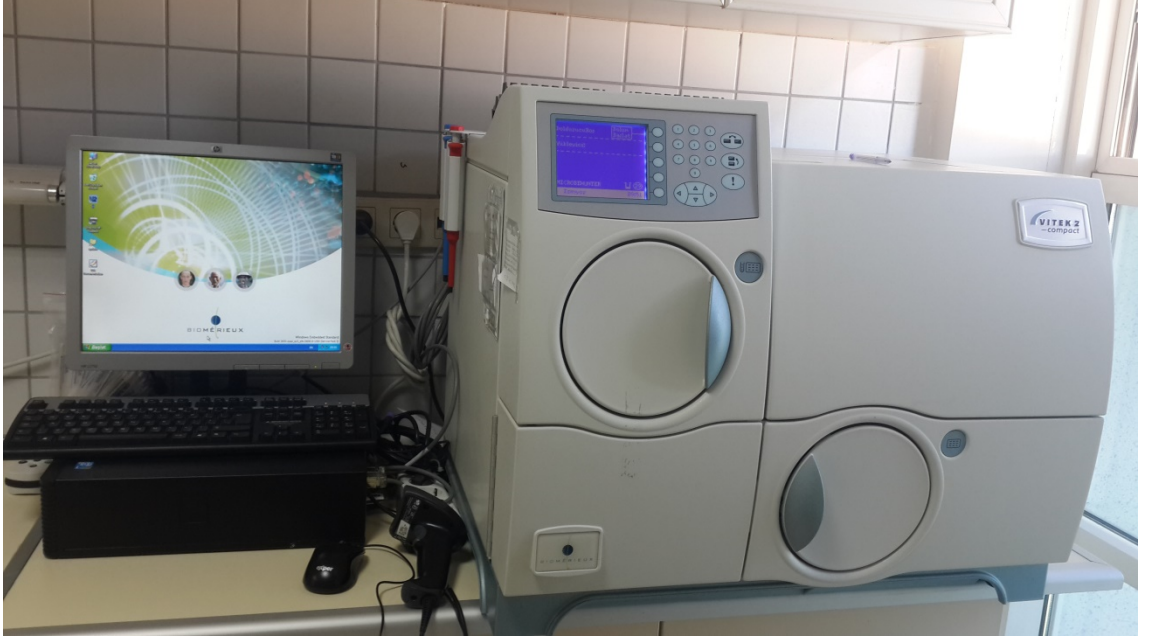
Metal isimleri	Metal MA' sı (g/mol)	Tuz formunun kimyasal formülü	Tuz formunun MA' sı (g/mol)
Krom (VI)	51,996	$K_2Cr_2O_7$	294,185
Kadmiyum (II)	112,411	$CdCl_2$	183,317
Bakır (II)	63,546	$CuCl_2$	134,452
Mangan (II)	54,938	$MnCl_2 \cdot 6H_2O$	233,934

3.2. Metot

3.2.1. Atık sudan *Pseudomonas* izolatlarının elde edilmesi

Atık su arıtma tesisinde bulunan havuzlardan farklı günlerde alınan su örnekleri laboratuvarında, belirtilen ölçülere göre hazırlanıp steril petrilere dökülmüş *Pseudomonas* agara ekim yapılmıştır. 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra tek düşen kolonilerden tekrar ekim yapılarak 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24

saatlik inkübasyondan sonra izolatlar koloni morfolojisi, besiyerindeki morfolojik görünümü, gram boyama ve VITEK 2 Compact 30 (biomerieux) sonuçlarına göre tiplendirilmiştir.



Resim 3.1. VITEK 2 Compact 30 (biomerieux) cihazı

3.2.2. İzolatların muhafazası

Nutrient broth besiyeri belirtilen miktarlarda hazırlanmıştır ve beşer ml steril tüplere dağıtılmıştır. Atık sudan izole edilen bakteriler öze yardımıyla alınmıştır ve nutrient broth içerisinde karıştırılmıştır. 37 °C’ de 24 saat inkübasyona bırakılarak bakterilerin aktifleşmesi sağlanmıştır. Nutrient agar besiyeri belirtilen miktarlarda hazırlanmış ve yatık agar hazırlamak için steril tüplere beşer ml alınmıştır. 2 gün boyunca yatık halde donması beklenmiştir. Nutrient broth besiyerinde 24 saat aktifleşen bakteriler yatık agara ekim yapılmış ve +4 °C de 3 ay süre ile muhafaza edilebilmiştir. Aynı şekilde aktifleşen bakterilerden 1 mL alınmış ve steril ependorf içerisindeki 1 mL gliserolle karıştırılmıştır, -18 °C’ de 1 yıl süre ile muhafaza edilmiştir.

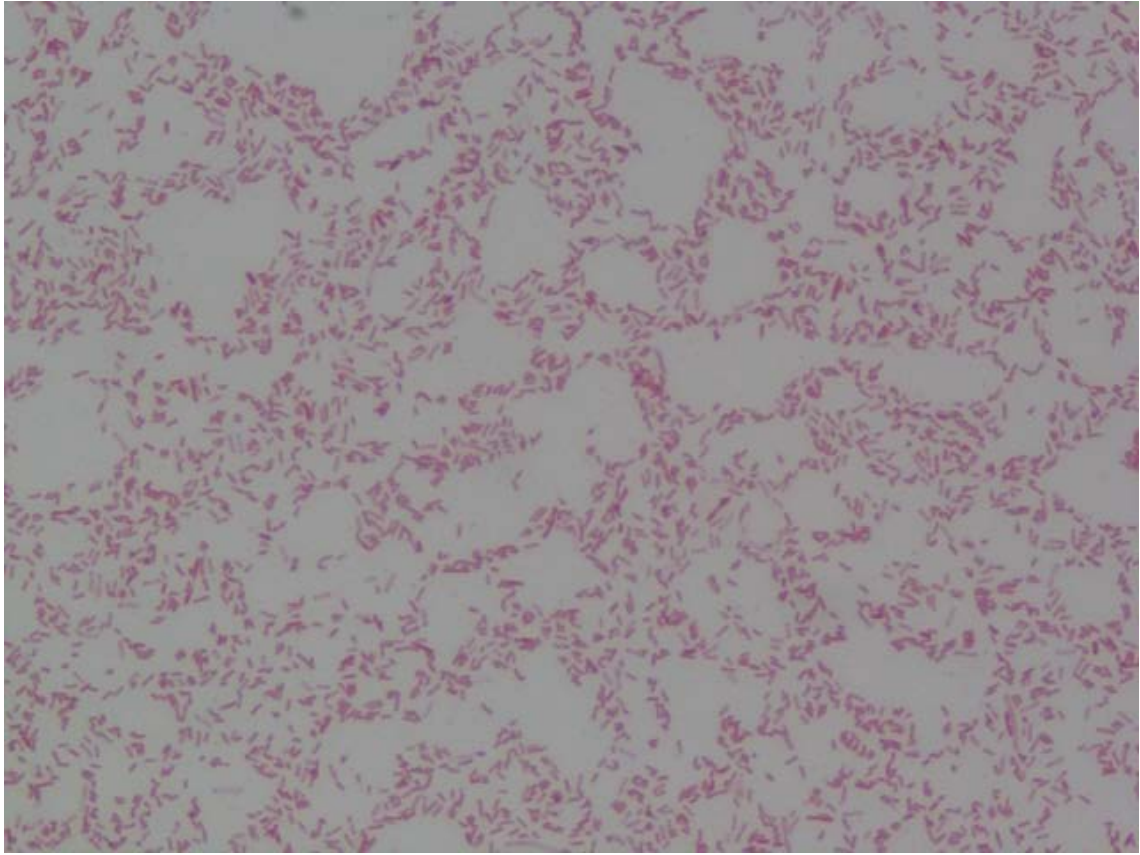
3.2.3. Gram boyama yöntemi

Atık sulardan elde edilen izolatlar öze yardımıyla alınarak bir damla serum fizyolojik içerisinde çözülmüştür. Preparatlar Tablo 3.3’ te verildiği şekilde hazırlanarak boyamaları yapılmıştır. Boyanan preparatlar 100X objektifte incelenmiş, gram negatif

boyanan ve *Pseudomonas* olduğu öngörülen izolatların, VITEK 2 Compact 30 (biomerieux) ile tür tanımlaması yapılmıştır.

Tablo 3.3. Gram boyama ve süreleri.

Boyalar	Süreleri
Kristal Viyolet	1 dakika
Lugol	1 dakika
%96' lık Etil alkol	30 saniye
Sulu Fuksin	45 saniye



Resim 3.2. *Pseudomonas aeruginosa* S28 gram boyama mikroskop görüntüsü

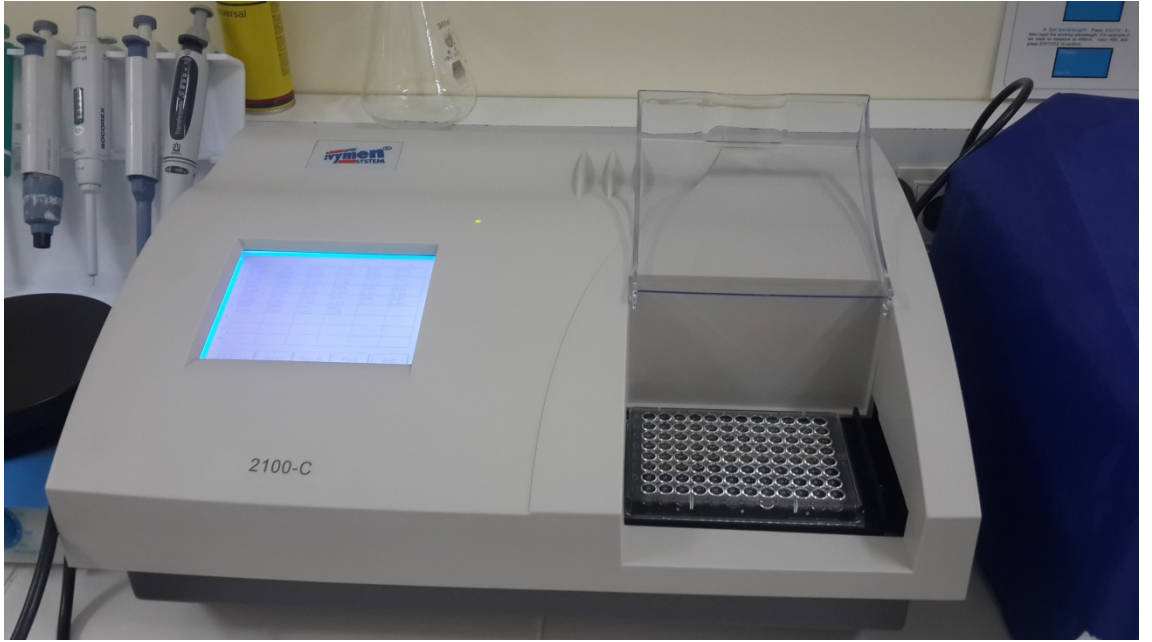
3.2.4. Metallerin sulu çözeltilerinin hazırlanması

Tüm metaller için öncelikle ana stoklar hazırlanmıştır. İstenilen konsantrasyonlardaki metal çözeltisi, hazırlanan bu ana stok çözeltisinden elde edilmiştir. Krom(VI) metali için 2000 ppm, kadmiyum(II) metali için 4000 ppm, bakır(II) metali için 2000 ppm ve

mangan metali için 2000 ppm'lik ana stoklar hazırlanmıştır. Kullanılan metaller tuz formunda oldukları için belirli oranda tartılıp saf su içerisinde çözdürülerek metal derişimleri elde edilmiştir.

3.2.5. İzolatların metal toleranslarının tespiti

Yatık agarda +4 °C' de bulunan izolatlar içerisinde 5 ml nutrient broth besiyeri bulunan tüplere alınmıştır. 37 °C' de 24 saat aktifleşmesi için inkübe edilmiştir. Aktifleşen izolatların bulanıklık değerleri Mc Farland cihazı ile ölçülmüş ve steril besiyeri ilavesi ile bulanıklıkları 1 değerine eşitlenmiştir. Metal toleransı tespiti için metallerin 10 ppm' lik sulu çözeltileri kullanılmıştır. İzolatlar nutrient broth besiyerinde 10 ppm' lik metal derişimiyle 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübe edildikten sonra mikroplate okuyucu (ivymen-2100-C) ile 630 nm' de okunarak bakteri yoğunlukları belirlenmiştir.



Resim 3.3. Mikroplate okuyucu (ivymen-2100-C) cihazı.

3.2.6. Seçilen izolatların belirlenen metal derişimlerinde büyüme eğrileri

Krom(VI) metali için S9, S17, S18, S24 ve S46 izolatlarına 5, 7,5, 10 ve 15 ppm' lik derişimler verilmiştir. Kadmiyum(II) metali için S10, S23, S32, S44 ve S50 izolatlarına 10, 20, 30 ve 40 ppm' lik derişimler verilmiştir. Bakır(II) metali için S7, S8, S25, S32 ve S45 izolatlarına 10, 20, 40 ve 80 ppm' lik derişimler verilmiştir. Mangan(II) metali için S10, S29, S32, S44 ve S50 izolatlarına 100, 200, 300 ve 400 ppm' lik derişimler

verilmiştir. Mangan metali için ana stok kullanılmış, bakır için 500 ppm' lik, krom ve kadmiyum için 100 ppm' lik ara stok kullanılarak hazırlanmıştır. Bakteri – metal – besiyeri karışımı 37 °C' de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Etüve konulmasından itibaren 1., 4., 8., 12., 16. ve 24. saatlerde mikropate okuyucu (ivymen-2100-C) ile 630 nm' de bakteri yoğunlukları ölçülmüştür.

3.2.7. LC₅₀ tayin metodu

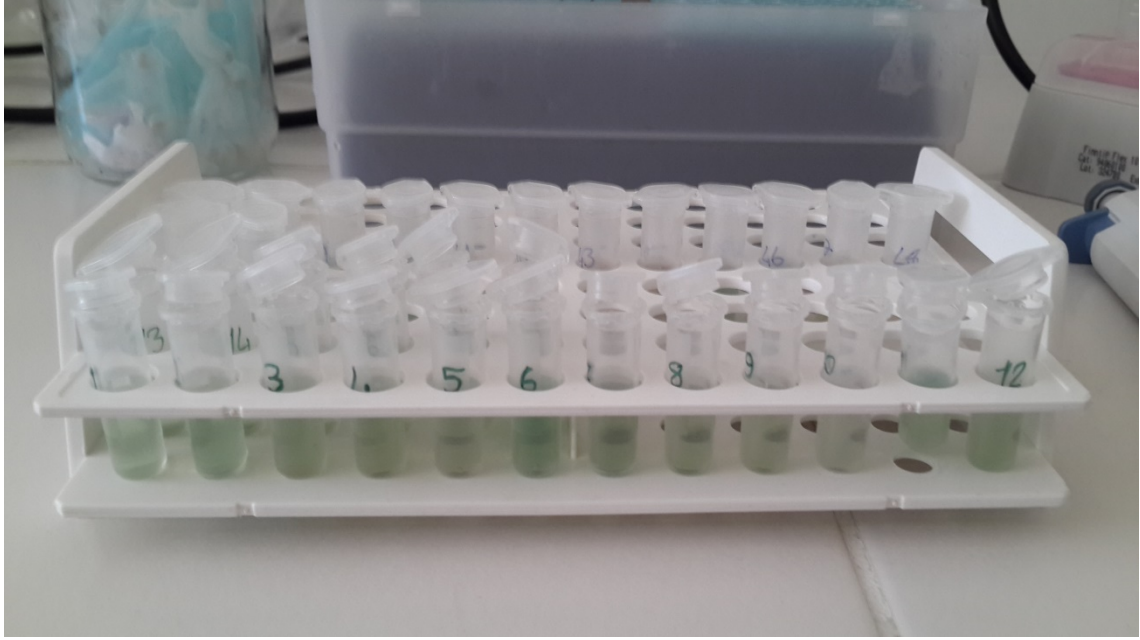
LC₅₀ tayin metodu ile 24 saatlik süre zarfında, farklı konsantrasyonlarda metal içeren ortamda bulunan izolatların %50'sini öldüren miktar hesaplanmıştır. Canlı hücrelerin % 50'sini öldüren metal dozları (LC₅₀), % 95 güven sınırlarında probit analizleri ile tespit edilmiştir [112, 113]. LC₅₀ değerleri, yirmi dördüncü saate ait metale maruz kalan hücrelerin biyokütlelerinin kontrol hücrelerin biyokütlelerinden çıkarılarak hesaplanmıştır.

3.2.8. EPS izolasyon metodu

İzolatlar nutrient broth besiyerinde 3 kez aktifleştirilmiştir, 3. aktifleştirmenin 24 saatlik inkübasyonundan sonra EPS üretimleri belirlenmiştir. Kültürlerden 1 mL örnekler alınarak 100 °C' de 15 dakika kaynatılmış ve buz üzerinde soğutulmuştur. Bu aşama EPS'yi hidroliz eden enzimleri inaktive etmek ve hücreye bağlı bulunan EPS'nin ayrılması için yapılmıştır. Oda sıcaklığına gelen kültürler 12000 g' de 15 dakika 4 °C' de santrifüj yapılarak hücreler ayrılmıştır. Süpernatant temiz bir ependorfa alınmıştır. Süpernatantın üzerine 1,7 µL TCA (trikloroasetik asit) eklenmiş (%85 w/v), 4 °C' de 2 saat beklenmiştir. 12000 g de 30 dakika 4 °C' de santrifüj ile protein ve peptitler çöktürülmüştür ve süpernatant temiz bir ependorfa alınmıştır. Süpernatant üzerine 1(örnek):3(alkol) oranında saf (absolute) alkol eklenerek güçlü bir şekilde karıştırılmış ve 4 °C'de 1 gece inkübe edilmiştir. Bu aşamada protein ile birlikte EPS çöktürülmüştür. 4 °C' de yapılan 24 saatlik inkübasyondan sonra 12000 g de 30 dakika 4 °C' de santrifüj edilerek EPS-protein kompleksi çöktürülmüştür ve pellet elde edilmiştir(EPS). Pellet üzerindeki alkol dökülüp üzerine 500 µl alkol eklenerek vortekslemeden yıkama yapılmıştır. Pellet üzerinden alkol dökülerek kalan alkol uçurulmuştur (40 °C' de). Elde edilen EPS 1 mL saf suda çözümlenerek -40 °C'de muhafaza

edilmiştir. Daha sonra fenol – sülfürik asit metoduna göre toplam karbonhidrat miktarı belirlenmiştir [108-111].

50 adet izolatın metalsiz EPS tayini yapılmış, metaller için seçilen izolatların 3. aktifleştirilmesinde 4 farklı derişimde ve LC₅₀ derişiminde metal verilerek EPS izolasyonu gerçekleştirilmiştir.



Resim 3.4. EPS izolasyonu TCA ekleme aşaması.

3.2.9. Fenol – sülfürik asit metodu

Çalışmada uzun cam tüpler kullanılmıştır. Suda çözünen EPS'lerden 1'er mL tüplere alınmıştır. Körv olarak saf su kullanılmıştır. Bunların üzerine 0,5 mL fenol, ardından 5 mL sülfürik asit eklenmiştir. Asit eklendikten sonra ısınan tüp soğutulup vorteksle karıştırılarak 20 dakika 37 °C' de bekletilmiştir. Spektrofotometrede 490 nm' de OD'leri okunmuştur.

3.2.10. İstatistiksel veri

Çalışmada 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 testler çift paralel çalışılmış ve ortalama sonuçlar verilmiştir.

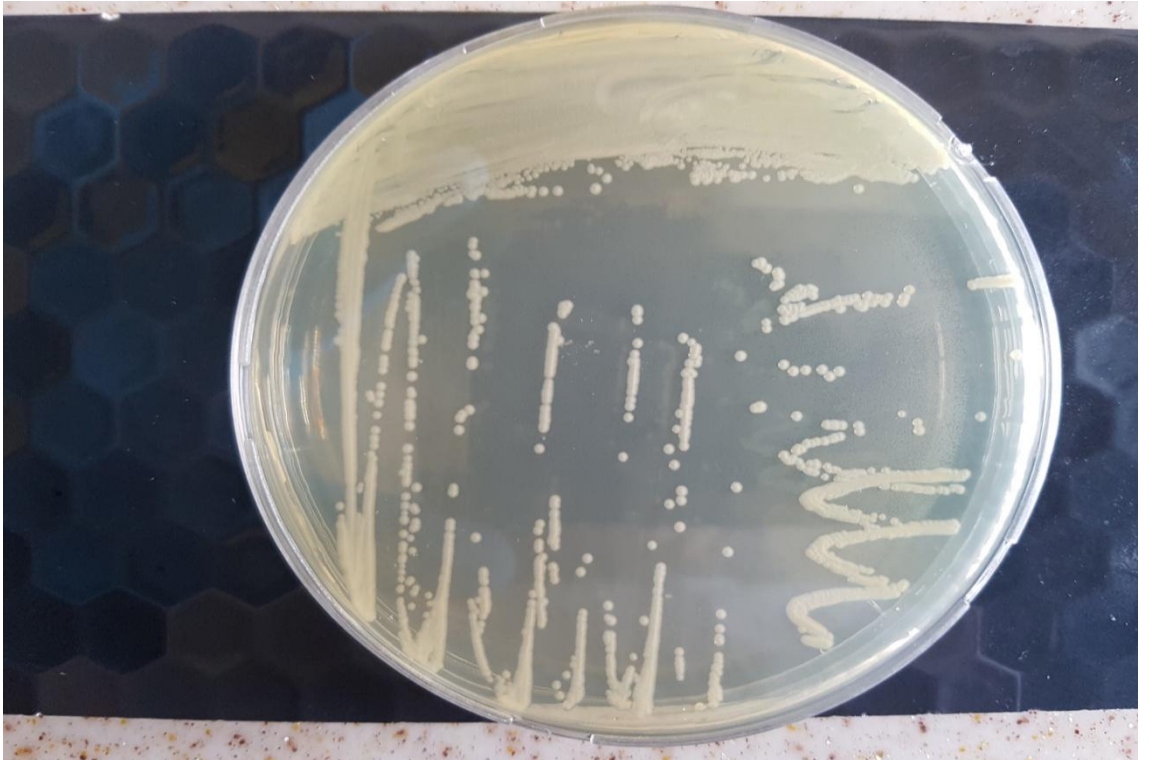
4. BÖLÜM

BULGULAR

Bu çalışmada krom(VI), kadmiyum(II), bakır(II) ve mangan(II) gibi ağır metallerin atık sulardan izole edilen *Pseudomonas* spp.' ların canlılığına ve EPS üretimlerine etkisi incelenmiştir.

4.1. Atık sudan *Pseudomonas* izolasyonu

Atık su arıtma tesisinde bulunan havuzlardan farklı günlerde alınan su örnekleri laboratuvarında, belirtilen ölçülere göre hazırlanıp steril petrilere dökülmüş *Pseudomonas* agara ekim yapılmıştır. 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra tek düşen kolonilerden tekrar ekim yapılarak 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyondan *Pseudomonas* türleri, *Pseudomonas* agar besiyerinde kırık beyaz, yeşilimsi renge, kıvamlı, yuvarlak, karakteristik kokusu olan koloniler oluşturmuşlardır. Resim 4,1' de *Pseudomonas* agar besiyerinde koloni morfolojileri gösterilmiştir.



Resim 4.1. *Pseudomonas stutzeri* S6 izolatının *Pseudomonas* agar besiyerinde koloni morfolojisi.

4.2. İzolatların tanımlamaları

Pseudomonas agar besiyerinde üreyen izolatların önce gram boyamaları yapılmıştır. Gram boyama ile tanımlaması doğrulanmış izolatlar kısa süreli muhafaza için yatık agara inoküle edilmişlerdir. Son olarak VITEK 2 Compact 30 (biomerieux) cihazında tür tanımlamaları yapılmıştır. Tablo 4.1’ de izolatların numaraları, tür adları, kaynağı ve gram boyama sonuçları verilmiştir.

Tablo 4.1. İzolatların numaraları, tür adları, kaynağı ve gram boyama sonuçları.

İZOLAT NO	TÜR ADI	KAYNAK	GRAM BOYAMA
S1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Giriş Havuzu	Gram (-)
S2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Giriş Havuzu	Gram (-)
S3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kum ve Yağ Tutucu Havuz	Gram (-)
S4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kum ve Yağ Tutucu Havuz	Gram (-)
S5	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Havalandırma Havuzu	Gram (-)
S6	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Havalandırma Havuzu	Gram (-)
S7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Çökeltim Havuzu	Gram (-)
S8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Çökeltim Havuzu	Gram (-)
S9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Çıkış Havuzu	Gram (-)
S10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Çıkış Havuzu	Gram (-)
S11	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Giriş Havuzu	Gram (-)
S12	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Giriş Havuzu	Gram (-)
S13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kum ve Yağ Tutucu Havuz	Gram (-)
S14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kum ve Yağ Tutucu Havuz	Gram (-)
S15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Havalandırma Havuzu	Gram (-)
S16	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Havalandırma Havuzu	Gram (-)
S17	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Çökeltim Havuzu	Gram (-)
S18	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Çökeltim Havuzu	Gram (-)
S19	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Çıkış Havuzu	Gram (-)
S20	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Çıkış Havuzu	Gram (-)

S21	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Giriş Havuzu	Gram (-)
S22	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Giriş Havuzu	Gram (-)
S23	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Kum ve Yağ Tutucu Havuz	Gram (-)
S24	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Kum ve Yağ Tutucu Havuz	Gram (-)
S25	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Havalandırma Havuzu	Gram (-)
S26	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Havalandırma Havuzu	Gram (-)
S27	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Çökeltim Havuzu	Gram (-)
S28	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Çökeltim Havuzu	Gram (-)
S29	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Çıkış Havuzu	Gram (-)
S30	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Çıkış Havuzu	Gram (-)
S31	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Giriş Havuzu	Gram (-)
S32	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Giriş Havuzu	Gram (-)
S33	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Kum ve Yağ Tutucu Havuz	Gram (-)
S34	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Kum ve Yağ Tutucu Havuz	Gram (-)
S35	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Havalandırma Havuzu	Gram (-)
S36	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Havalandırma Havuzu	Gram (-)
S37	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Çökeltim Havuzu	Gram (-)
S38	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Çökeltim Havuzu	Gram (-)
S39	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Çıkış Havuzu	Gram (-)
S40	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Çıkış Havuzu	Gram (-)
S41	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Giriş Havuzu	Gram (-)
S42	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Giriş Havuzu	Gram (-)
S43	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kum ve Yağ Tutucu Havuz	Gram (-)
S44	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Kum ve Yağ Tutucu Havuz	Gram (-)
S45	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Havalandırma Havuzu	Gram (-)
S46	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Havalandırma Havuzu	Gram (-)
S47	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Çökeltim Havuzu	Gram (-)
S48	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Çökeltim Havuzu	Gram (-)
S49	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Çıkış Havuzu	Gram (-)
S50	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Çıkış Havuzu	Gram (-)

4.3. İzolatların metal toleranslarının tespiti

Yatık agarda +4°C’de muhafaza edilen izolatlar, içerisinde 5 ml nutrient broth besiyeri bulunan tüplere alınmıştır. 37 °C’ de 24 saat aktifleşmesi için inkübe edilmiştir.

Aktifleşen izolatların bulanıklık değerleri Mc Farland cihazı ile ölçülmüş ve steril besiyeri ilavesi ile bulanıklıkları 1 değerine eşitlenmiştir. Metal toleransı tespiti için metallerin 10 ppm' lik sulu çözeltileri kullanılmıştır. 37 °C'de 24 saat etüvde inkübe edilmiştir. İnkübe edildikten sonra mikroplate okuyucu (ivymen-2100-C) ile 630 nm' de okunarak bakteri yoğunlukları belirlenmiştir. Bakterilerin 4 farklı metalde yüzde ölüm değerleri tablo 4.2' de verilmiştir.

Tablo 4.2. İzolatların 10 ppm'lik 4 farklı metalde % ölüm değerleri.

İzolat numaraları	Krom(VI) % ölüm değeri	Kadmiyum(II) % ölüm değeri	Bakır(II) % ölüm değeri	Mangan(II) % ölüm değeri
S1	86,65±3,2	94,74±3,8	1,81±0,05	15,90±0,6
S2	91,13±3,4	92,94±3,4	7,21±0,5	19,78±0,6
S3	68,87±2,8	82,35±3,2	6,56±0,5	4,53±0,05
S4	84,96±3,2	59,50±2,7	18,45±1,0	32,79±1,2
S5	39,68±1,5	100±4,0	31,33±1,2	16,33±0,6
S6	50,84±2,2	100±4,0	22,80±1,1	31,34±1,2
S7	64,28±2,8	43,02±2,0	0	29,07±1,1
S8	93,24±3,4	51,25±2,2	0	9,91±0,5
S9	33,80±1,2	77,61±3,1	22,85±1,1	26,52±1,2
S10	65,64±2,8	23,28±1,0	49,53±2,2	0
S11	98,31±3,7	48,06±2,2	57,69±2,5	16,81±0,7
S12	46,90±2,1	59,97±2,5	36,93±1,3	10,96±0,6
S13	42,26±2,0	77,66±3,1	40,21±2,0	29,78±1,1
S14	38,25±1,9	43,50±2,0	3,84±0,05	32,72±1,2
S15	83,97±3,2	42,42±2,0	11,75±0,6	11,33±0,6
S16	40,54±2,0	50,59±2,2	74,13±3,1	10,14±0,6
S17	35,38±1,2	85,61±3,2	54,75±2,5	36,54±1,3
S18	32,49±1,2	100±4,0	13,68±0,5	24,82±1,1
S19	69,70±2,8	43,92±2,0	41,03±2,0	14,30±0,5
S20	83,18±3,2	38,06±1,3	26,06±1,1	3,26±0,05
S21	65,69±2,8	31,26±1,2	44,55±2,1	12,36±0,5
S22	57,00±2,5	100±4,0	17,44±0,7	18,09±0,7
S23	72,50±3,0	15,86±0,9	22,14±0,9	39,14±2,0
S24	29,55±1,1	72,16±3,0	44,77±2,0	10,39±0,5
S25	56,48±2,5	41,81±2,0	0	24,39±1,2

S26	97,93±3,7	100±4,0	28,13±1,2	3,23±0,05
S27	63,32±2,8	51,96±2,2	45,83±2,1	12,46±0,5
S28	91,95±3,6	66,40±2,8	40,84±2,0	15,55±0,6
S29	88,51±3,3	68,15±2,8	12,43±0,5	0
S30	70,96±3,0	40,97±2,0	48,32±2,1	6,05±0,05
S31	89,62±3,4	100±4,0	27,48±1,2	7,21±0,05
S32	73,15±3,1	14,11±0,6	0	0
S33	88,54±3,3	104,00±4,0	16,86±0,6	14,18±0,6
S34	62,03±2,7	65,15±2,8	10,35±0,5	19,27±0,7
S35	58,66±2,7	100±4,0	22,27±0,9	18,61±0,7
S36	61,95±2,7	23,74±0,9	18,55±0,9	9,94±0,05
S37	82,14±3,2	58,97±2,5	21,55±0,9	11,25±0,5
S38	87,95±3,3	64,87±2,7	40,82±2,0	24,13±0,9
S39	87,84±3,3	65,45±2,7	17,91±0,7	14,33±0,6
S40	92,57±3,7	64,91±2,7	9,29±0,05	9,12±0,05
S41	85,47±3,2	100±4,0	46,39±2,1	31,97±1,2
S42	85,83±3,2	47,25±2,1	9,68±0,05	7,20±0,05
S43	59,53±2,7	70,89±3,0	45,24±2,1	9,17±0,05
S44	40,12±2,0	0	36,87±1,3	0
S45	92,66±3,7	54,66±2,4	0	21,25±0,9
S46	29,08±1,2	76,58±3,1	41,10±2,0	10,87±0,1
S47	44,36±2,1	73,40±3,1	13,79±0,6	7,81±0,1
S48	84,37±3,2	74,86±3,1	38,70±2,0	5,11±0,1
S49	91,48±3,7	46,43±2,1	19,43±0,7	18,23±0,7
S50	93,66±3,8	10,79±0,5	6,45±0,05	0

Dirençli izolatlar kırmızı ile belirtilmiştir.

Elde edilen sonuçlar ışığında her metal için en çok direnç sağlayan beşer izolat seçilmiştir ve seçilen izolatlara hangi derişimlerde metal verileceği saptanmıştır. Bir sonraki aşamada bakterilere uygulanacak metal derişimleri Tablo 4.3' te gösterilmiştir. Metaller en çok dirençlilik gösteren izolatlar Tablo 4.4' te verilmiştir.

Tablo 4.3. Bakterilere uygulanacak metal derişimleri.

Metaller	Derişimleri (ppm)			
Krom(VI)	5 ppm	7,5 ppm	10 ppm	15 ppm
Kadmiyum(II)	10 ppm	20 ppm	30 ppm	40 ppm

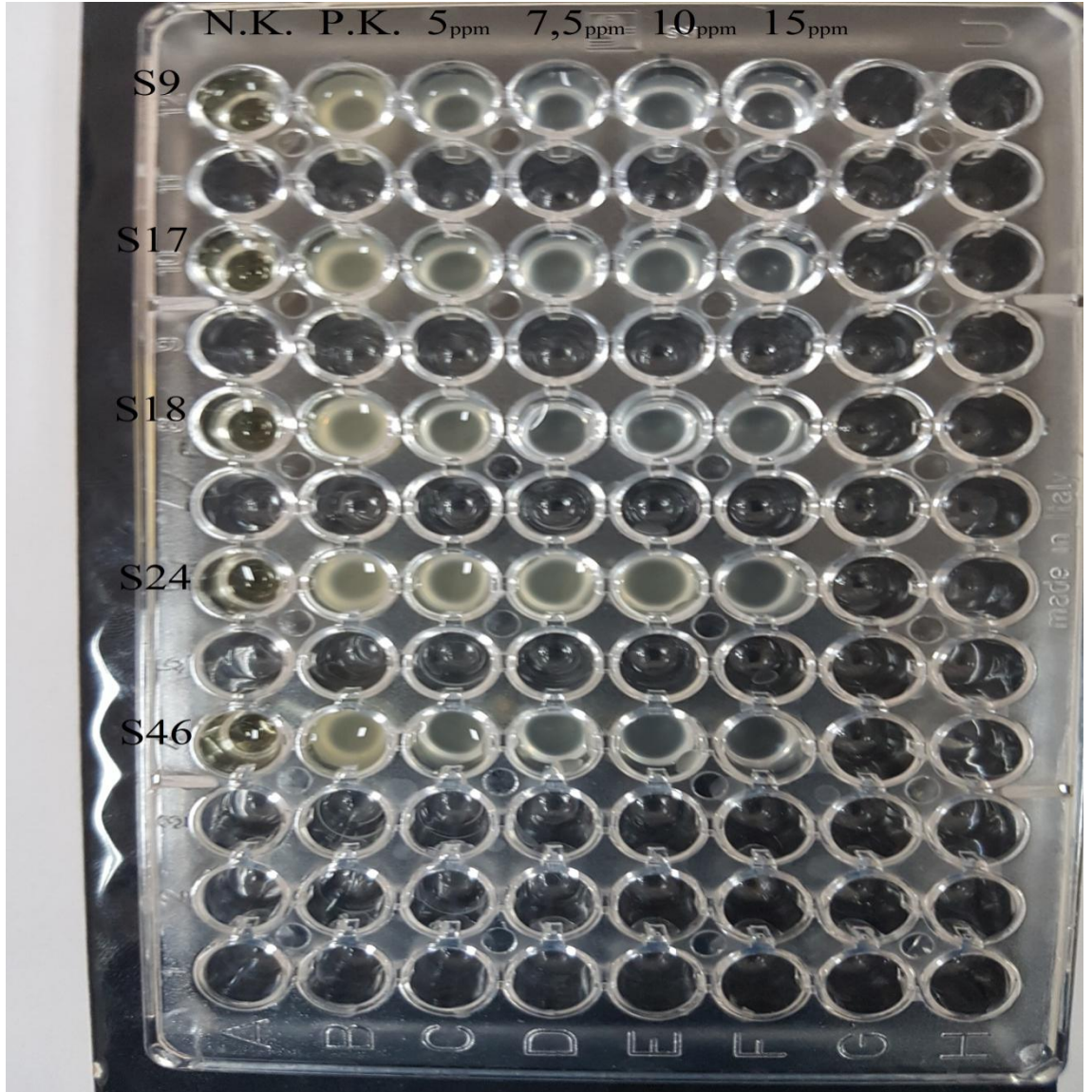
Bakır(II)	10 ppm	20 ppm	40 ppm	80 ppm
Mangan(II)	100 ppm	200 ppm	300 ppm	400 ppm

Tablo 4.4. Metallerle direnç gösteren izolatlar

Metaller	Seçilen izolatlar				
Krom(VI)	S9	S17	S18	S24	S46
Kadmiyum(II)	S10	S23	S32	S44	S50
Bakır(II)	S7	S8	S25	S32	S45
Mangan(II)	S10	S29	S32	S44	S50

4.4. Dirençli İzolatların belirli konsantrasyonlardaki metallerde % ölüm ve LC₅₀ değerleri

Krom(VI) metali için S9, S17, S18, S24 ve S46 izolatları 5, 7,5, 10 ve 15 ppm' lik derişimlere maruz bırakılmıştır. Kadmiyum(II) metali için S10, S23, S32, S44 ve S50 izolatları 10, 20, 30 ve 40 ppm' lik derişimlere maruz bırakılmıştır. Bakır(II) metali için S7, S8, S25, S32 ve S45 izolatları 10, 20, 40 ve 80 ppm' lik derişimlere maruz bırakılmıştır. Mangan(II) metali için S10, S29, S32, S44 ve S50 izolatları 100, 200, 300 ve 400 ppm' lik derişimlere maruz bırakılmıştır. Bakteri – metal – besiyeri karışımı 37 °C' de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Etüve konulmasından itibaren 1., 4., 8., 12., 16. ve 24. saatlerde mikropate okuyucu (ivymen-2100-C) ile 630 nm' de bakteri yoğunlukları ölçülmüştür. İzolatların farklı saatlerdeki OD değerlerine göre % ölüm değerleri ve LC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Metallerle göre seçilen izolatların LC₅₀ değerleri Tablo 4.5' te verilmiştir.

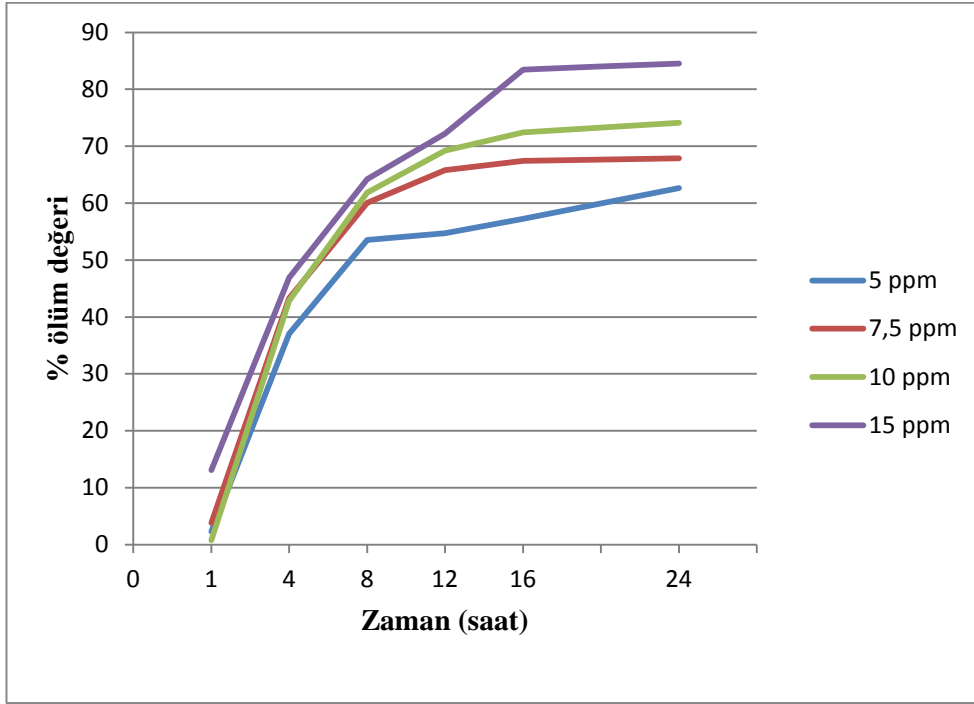


Resim 4.2. Cr(VI) metaline maruz bırakılan izolatların mikroplate okuyucu (ivymen-2100-C) plağındaki görüntüsü (N.K.: Negatif kontrol, P.K.: Pozitif kontrol).

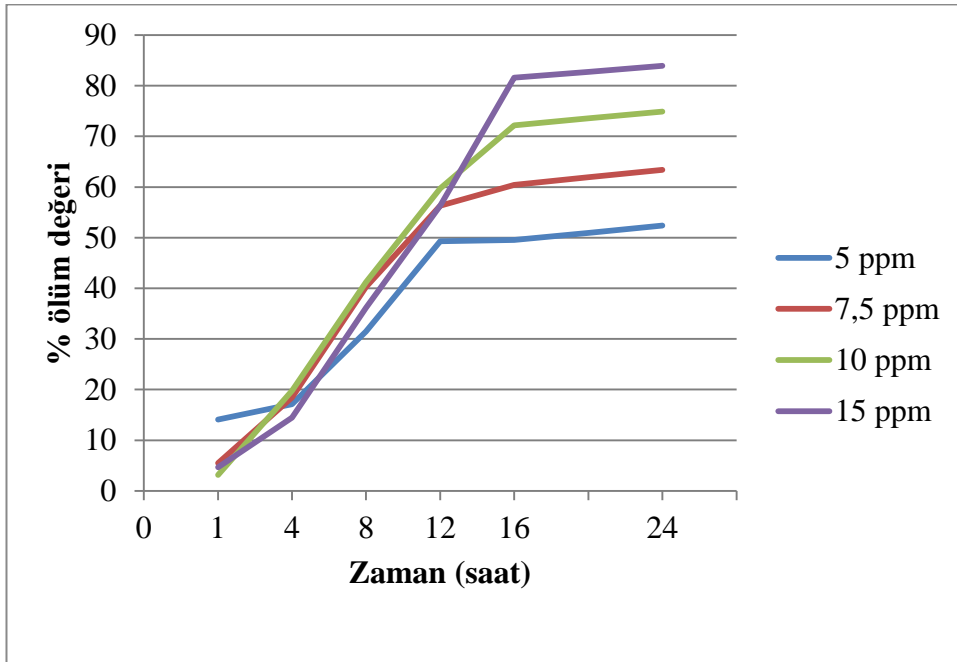
Tablo 4. 5 Metallere göre seçilen izolatlarn LC₅₀ değerleri.

Metaller	İzolatlarn	LC ₅₀ değeri (ppm)
Krom	S9	2,29±0,1
	S17	4,44±0,2
	S18	4,55±0,2
	S24	10,48±0,7
	S46	7,38±0,5
Kadmiyum	S10	21,44±1,4
	S23	26,96±1,6
	S32	25,30±1,6
	S44	19,65±1,2
	S50	22,23±1,5
Bakır	S7	32,93±2,0
	S8	54,45±3,5
	S25	54,18±3,5
	S32	53,00±3,5
	S45	52,81±3,5
Mangan	S10	175,08±4,2
	S29	224,98±4,9
	S32	205,97±4,8
	S44	207,10±4,8
	S50	232,71±5,0

Seçilen izolatlarn belirli konsantrasyonlardaki metal ile olan OD değerlerine göre metal derişimi arttıkça ölüm oranının arttığı görölmüştür. LC₅₀ değerlerine bakıldığında krom metalinde en dirençli izolatlarn S24 olduğu gözlemlenmiştir. Aynı şekilde kadmiyumda S32, bakırda S8 ve mangan metalinde S37 izolatlarnın 24 saatin sonunda seçilen diğer izolatlara nazaran % ölüm değerleri daha düşük olup metallere karşı dirençlerinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.



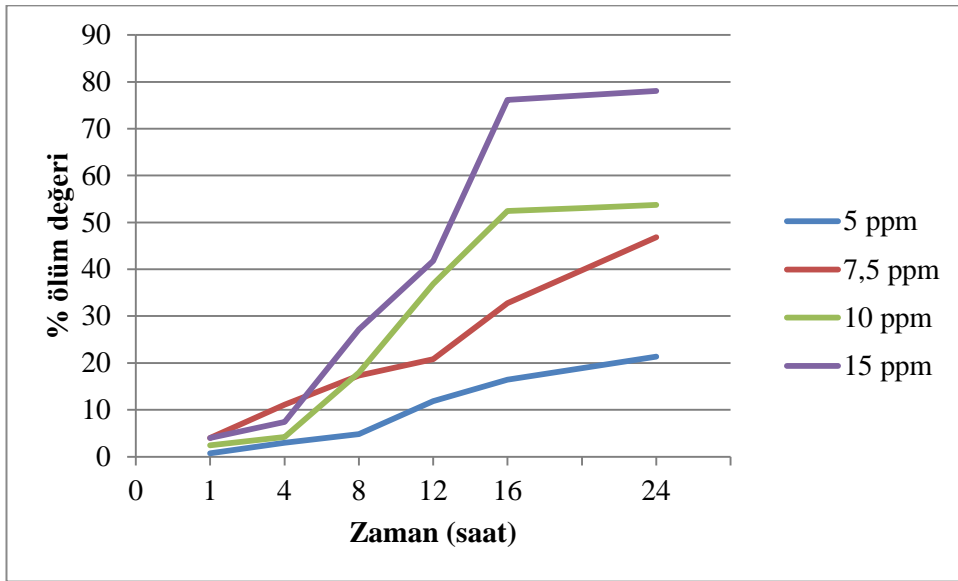
Şekil 4.1. *Pseudomonas aeruginosa* S9 izolatına krom(VI) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi



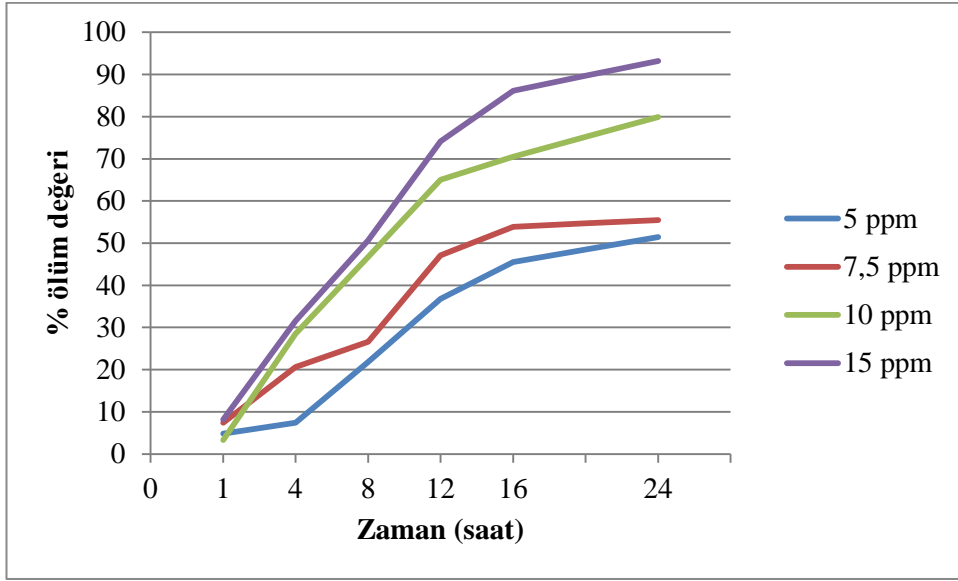
Şekil 4.2. *Pseudomonas stutzeri* S17 izolatına krom(VI) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi



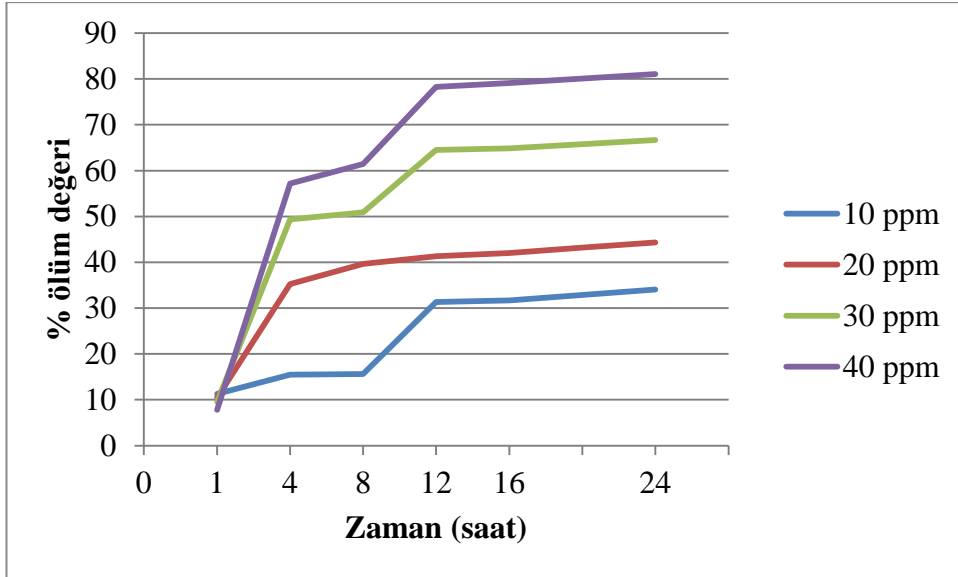
Şekil 4.3. *Pseudomonas stutzeri* S18 izolatına krom(VI) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi



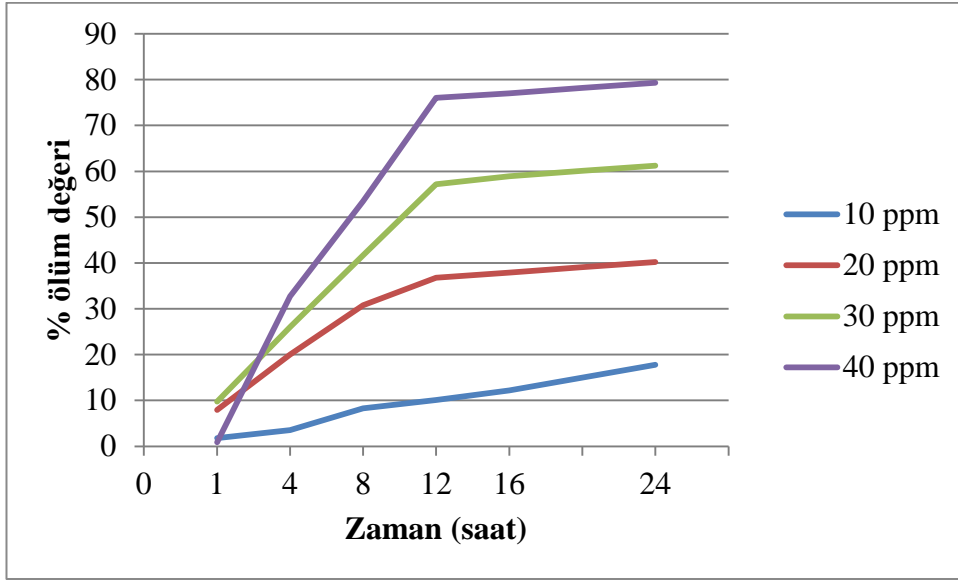
Şekil 4.4. *Pseudomonas stutzeri* S24 izolatına krom(VI) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi



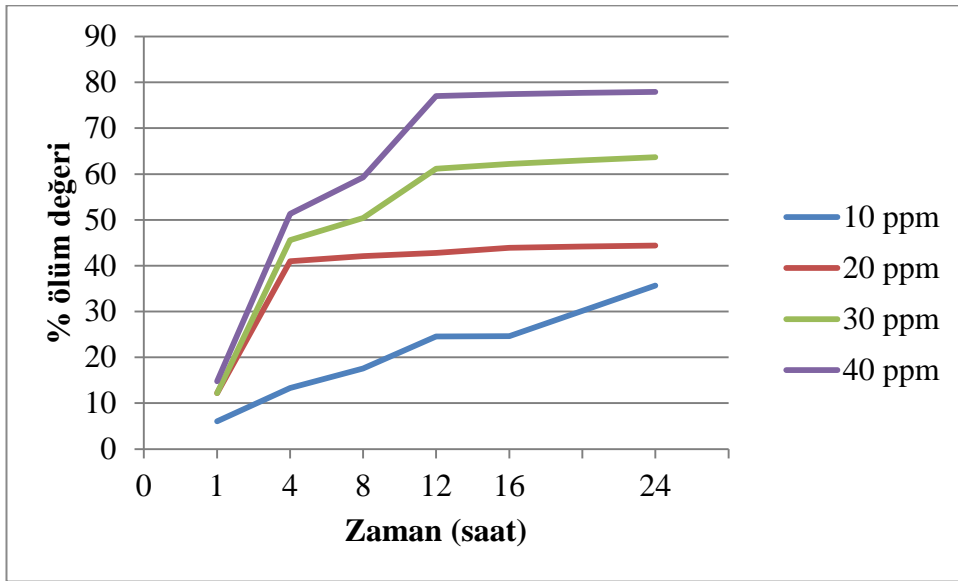
Şekil 4.5. *Pseudomonas stutzeri* S46 izolatına krom(VI) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi



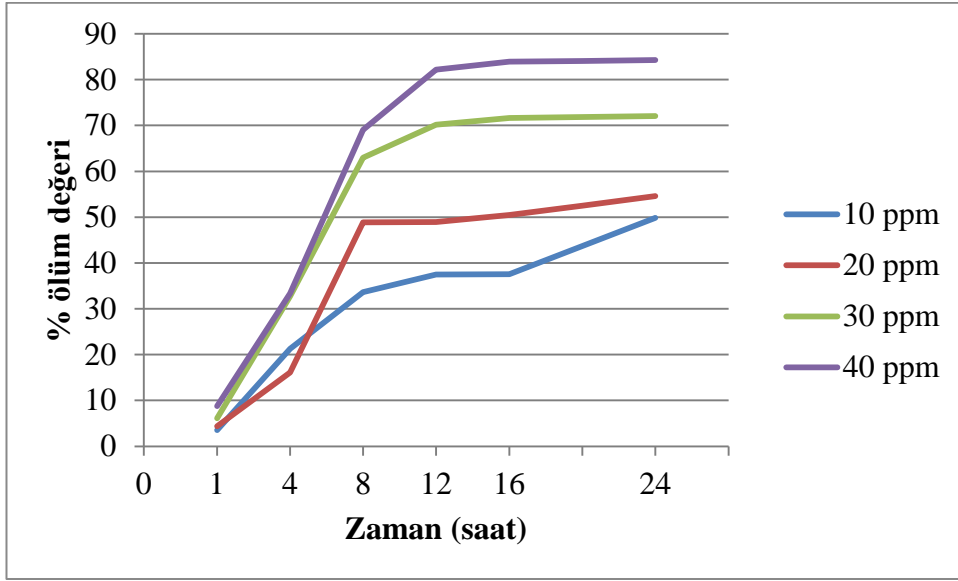
Şekil 4.6. *Pseudomonas aeruginosa* S10 izolatına kadmiyum(II) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi



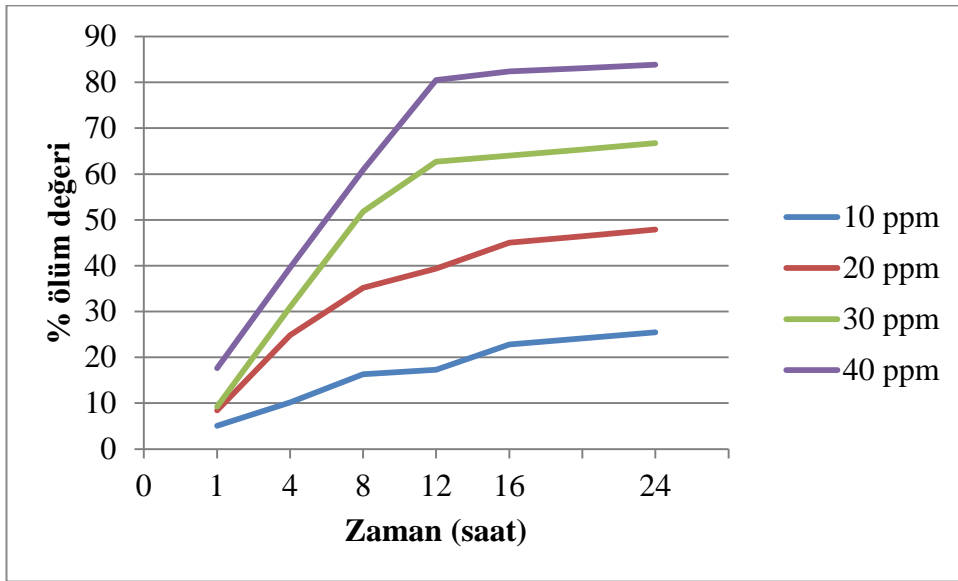
Şekil 4.7. *Pseudomonas stutzeri* S23 izolatına kadmiyum(II) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi



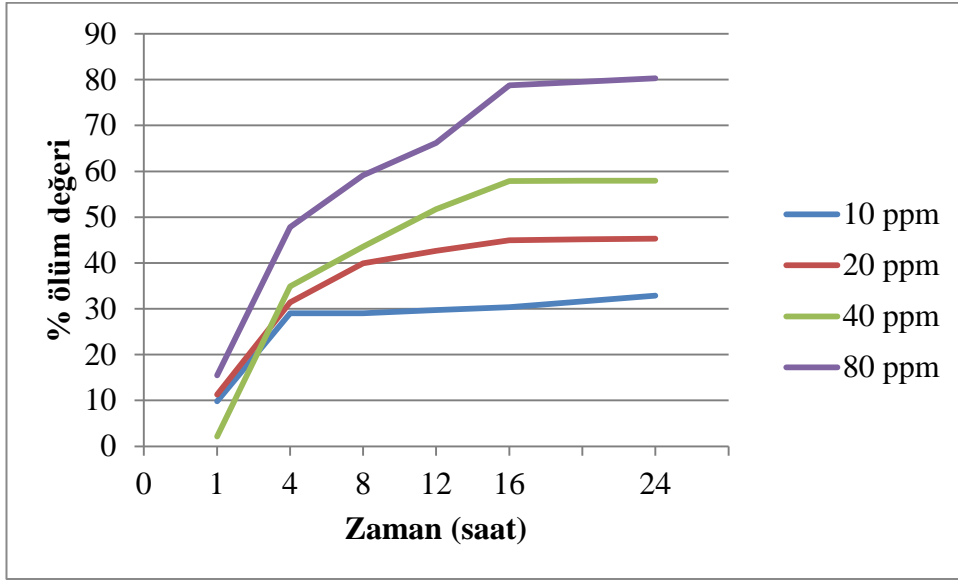
Şekil 4.8. *Pseudomonas stutzeri* S32 izolatına kadmiyum(II) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi



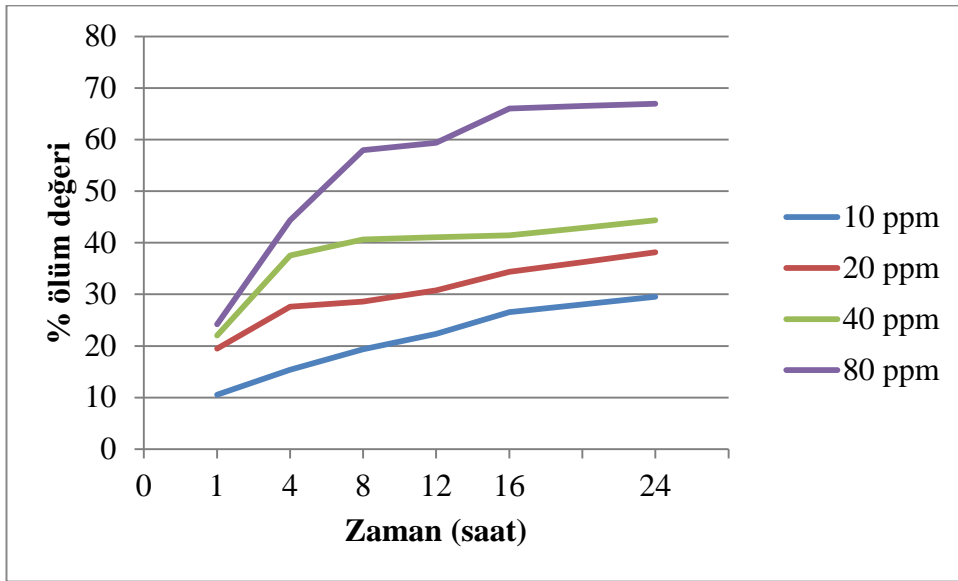
Şekil 4.9. *Pseudomonas stutzeri* S44 izolatına kadmiyum(II) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi



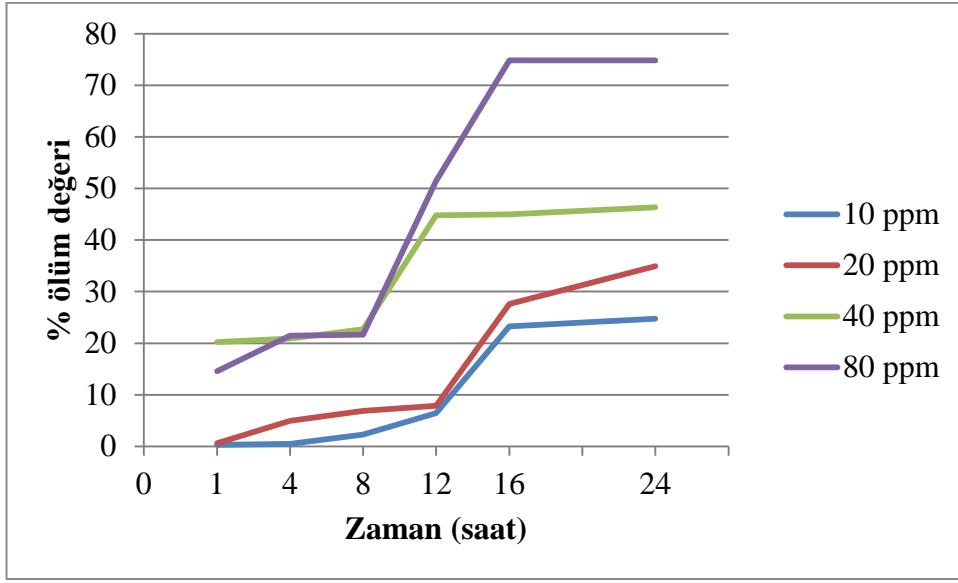
Şekil 4.10. *Pseudomonas stutzeri* S50 izolatına kadmiyum(II) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi



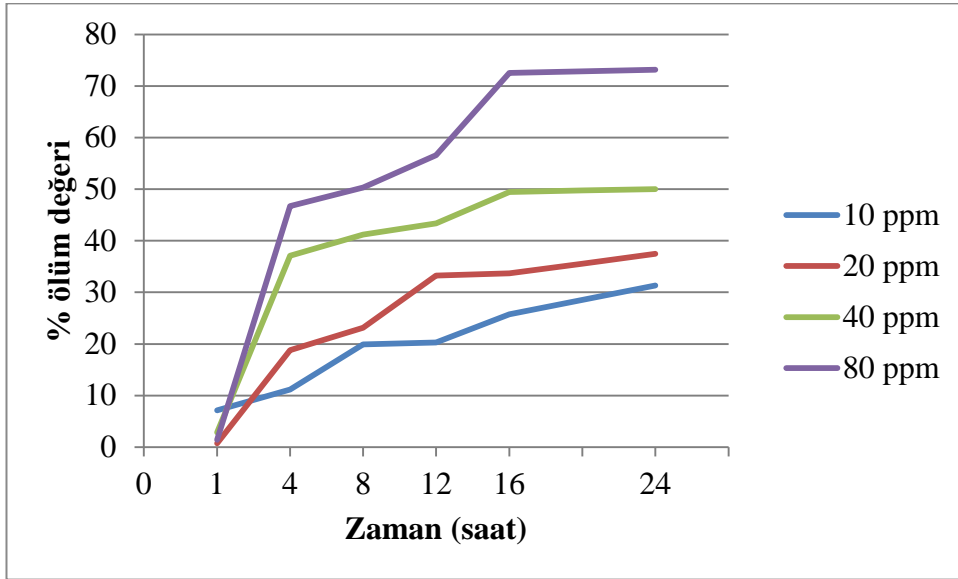
Şekil 4.11. *Pseudomonas stutzeri* S7 izolatına bakır(II) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi



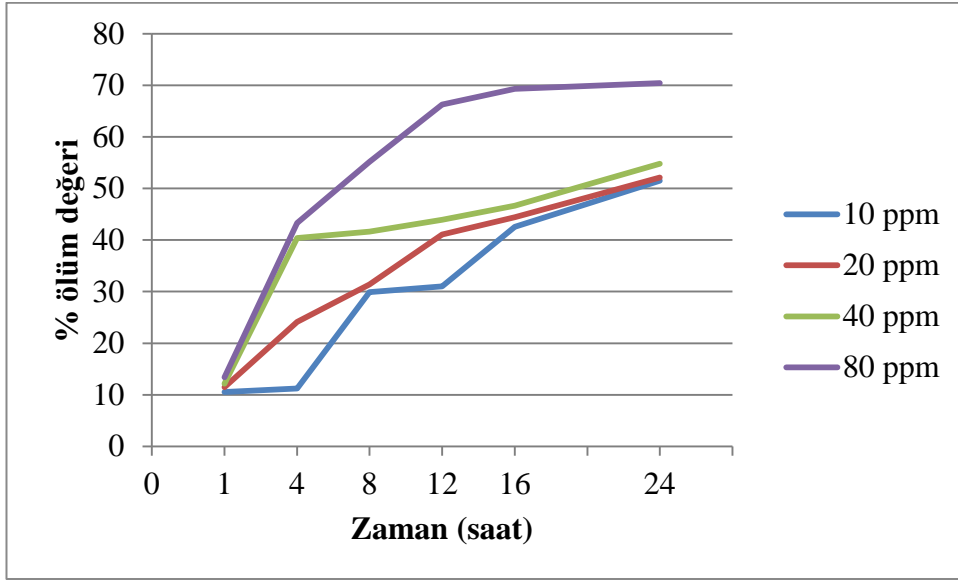
Şekil 4.12. *Pseudomonas aeruginosa* S8 izolatına bakır(II) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi



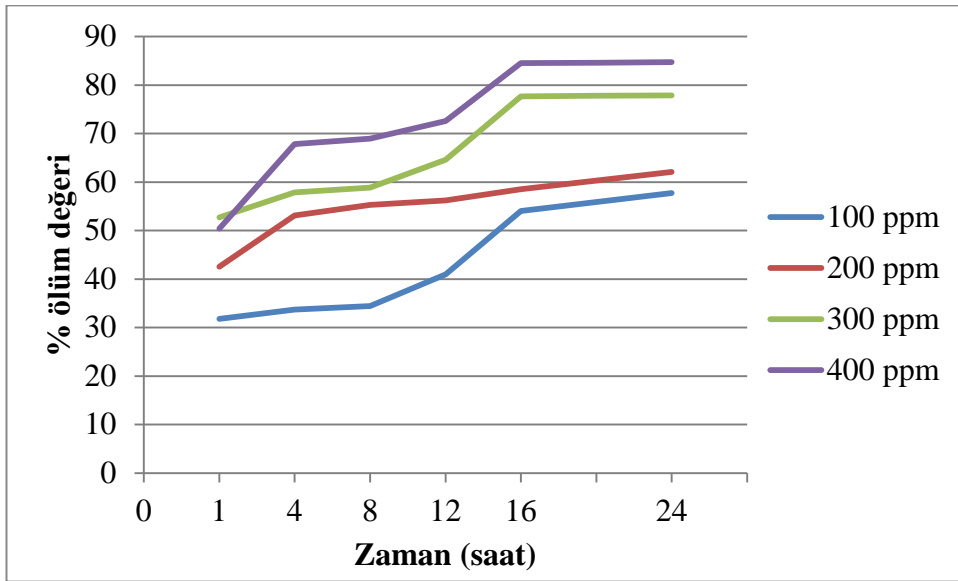
Şekil 4.13. *Pseudomonas stutzeri* S25 izolatına bakır(II) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi



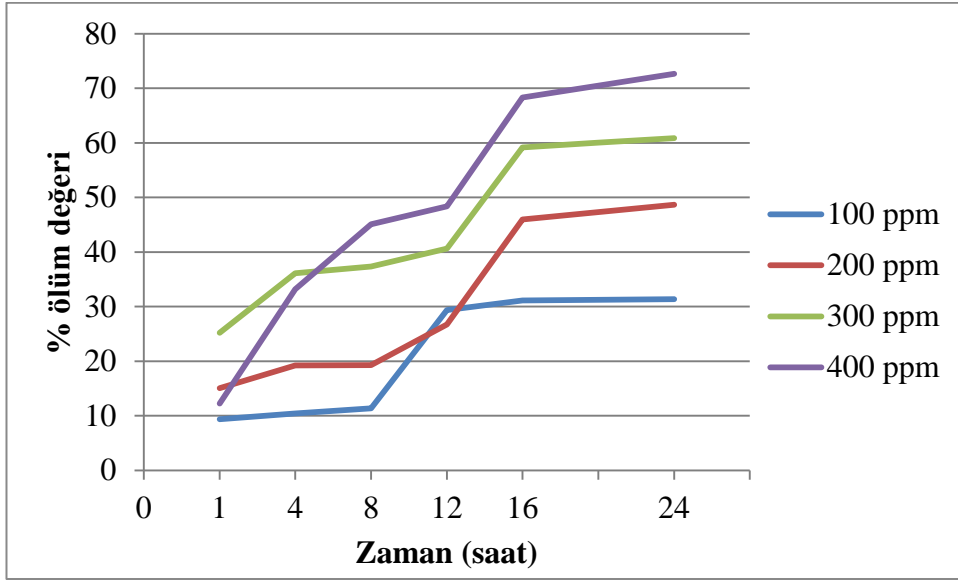
Şekil 4.14. *Pseudomonas stutzeri* S32 izolatına bakır(II) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi



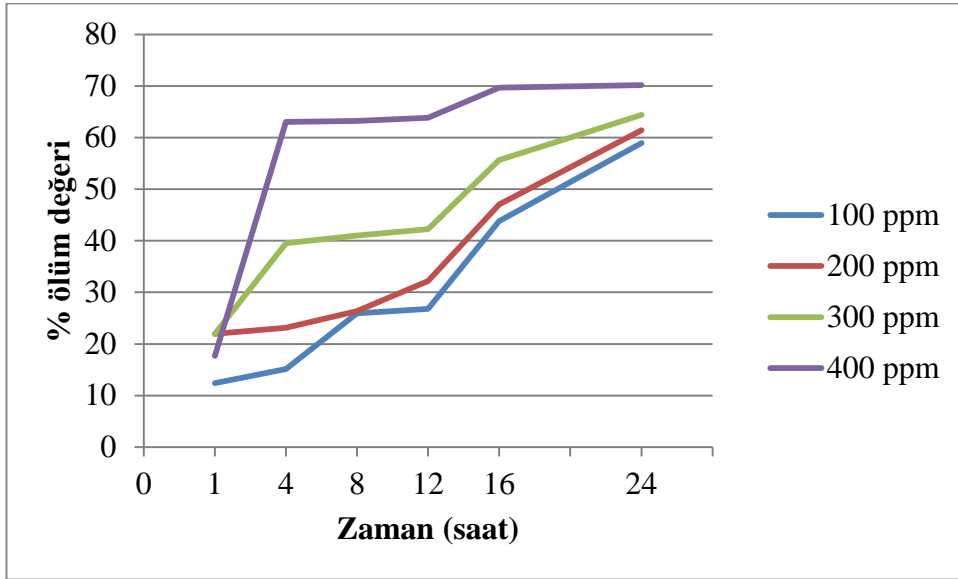
Şekil 4.15. *Pseudomonas stutzeri* S45 izolatına bakır(II) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi



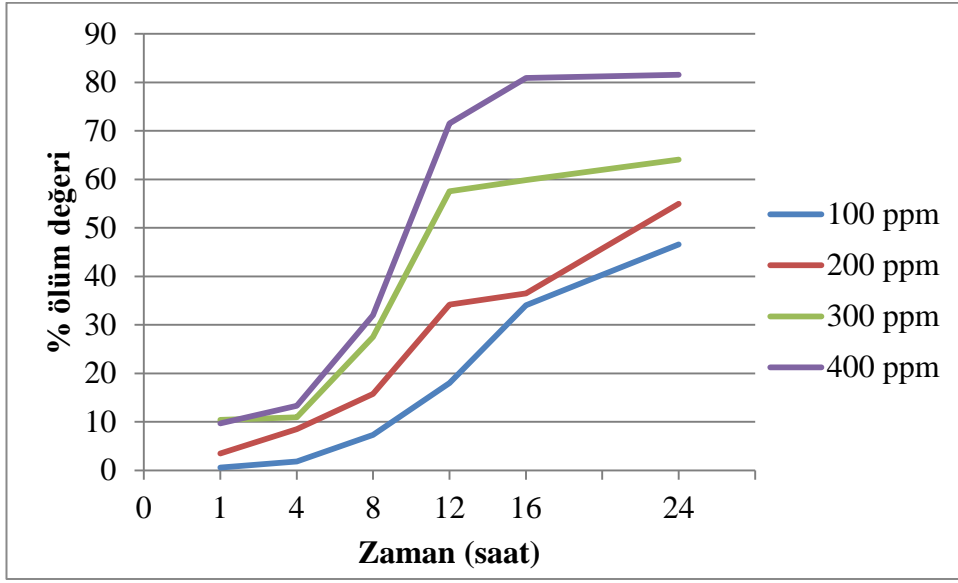
Şekil 4.16. *Pseudomonas aeruginosa* S10 izolatına mangan(II) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi



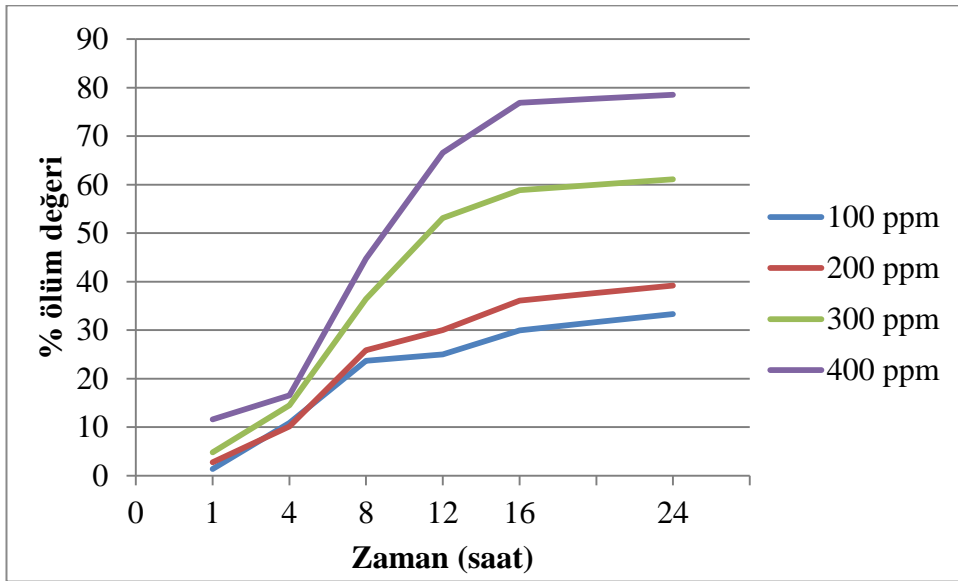
Şekil 4.17. *Pseudomonas aeruginosa* S29 izolatına mangan(II) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi



Şekil 4.18. *Pseudomonas stutzeri* S32 izolatına mangan(II) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi



Şekil 4.19. *Pseudomonas stutzeri* S44 izolatına mangan(II) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi



Şekil 4.20. *Pseudomonas stutzeri* S50 izolatına mangan(II) derişimlerinin 24 saat boyunca etkisi

4.5. İzolatların metalli ve metallsiz ortamlarda EPS miktarları

Metallsiz ortamda 50 izolatın EPS miktarları tespit edilmiştir. İzolatların EPS miktarları mg/l cinsinden Tablo 4.6' da verilmiştir. Metallsiz 50 izolatın içerisinde en yüksek EPS miktarı *Pseudomonas aeruginosa* S20 ve *Pseudomonas stutzeri* S39 izolatlarında olduğu tespit edilmiştir. En düşük EPS miktarı ise *Pseudomonas stutzeri* S25 ve *Pseudomonas stutzeri* S45 izolatlarında tespit edilmiştir.

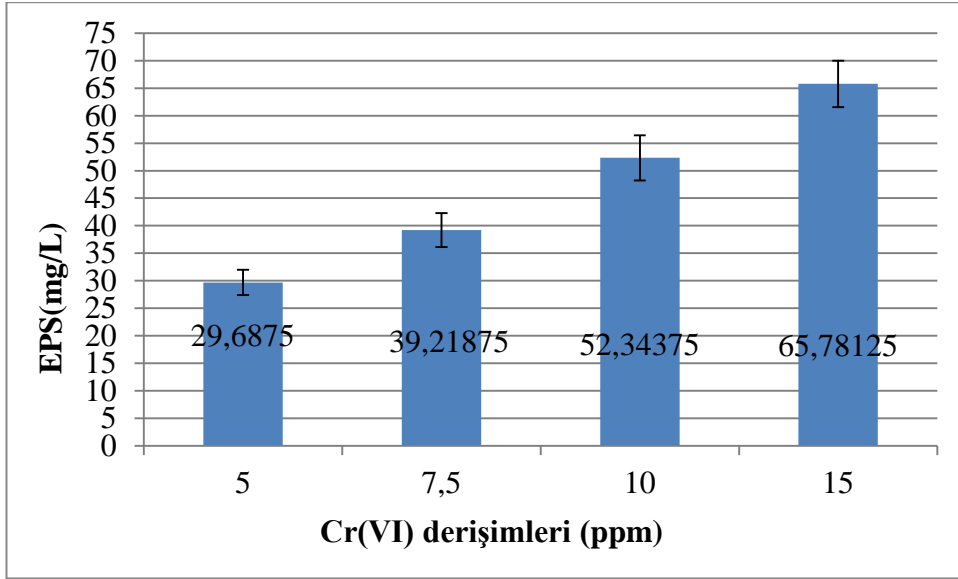
Tablo 4.6. 50 izolatın EPS miktarları.

İzolat No	İzolat cins ve türü	EPS Değeri
S1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24,53±1,2
S2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23,43±1,2
S3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26,71±1,3
S4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34,37±1,6
S5	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	38,43±1,7
S6	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	42,03±1,9
S7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20,78±1,1
S8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18,28±1,1
S9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26,56±1,3
S10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18,59±1,1
S11	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	48,28±2,1
S12	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	38,43±1,8
S13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34,21±1,6
S14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	49,84±2,1
S15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	49,06±2,1
S16	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	48,59±2,1
S17	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	30,46±1,5
S18	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	32,65±1,5
S19	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50,46±2,3
S20	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52,03±2,4
S21	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42,18±1,9
S22	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35,46±1,6
S23	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	41,09±1,9
S24	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	30,46±1,5
S25	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	17,81±1,0
S26	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	39,53±1,9
S27	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	23,90±1,2

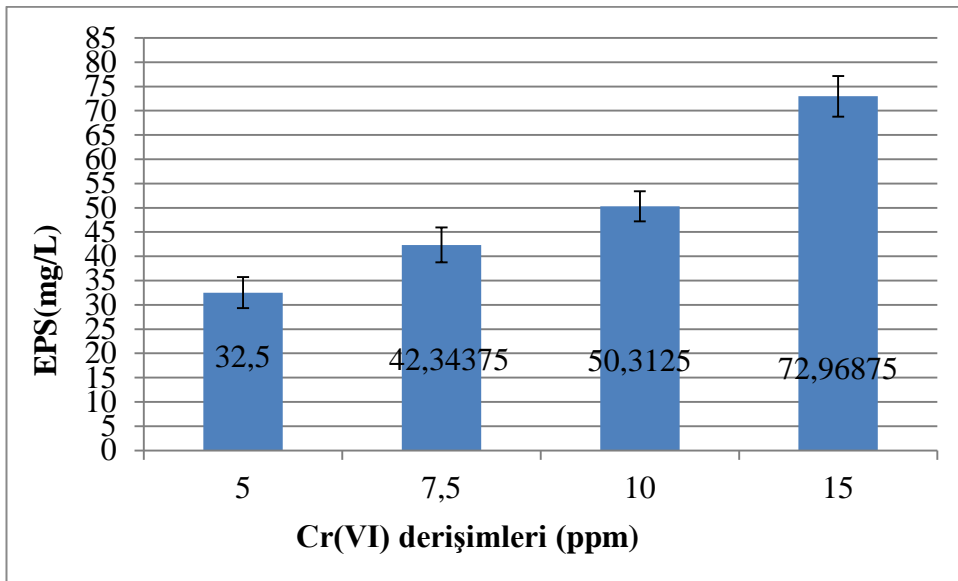
S28	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	45,78±2,0
S29	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24,06±1,2
S30	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35,46±1,6
S31	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18,28±1,1
S32	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	20,15±1,1
S33	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	35,31±1,6
S34	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	36,56±1,6
S35	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	45,93±2,0
S36	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34,68±1,6
S37	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25,15±1,2
S38	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	30,4±1,5
S39	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	52,03±2,4
S40	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	36,40±1,6
S41	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37,81±1,6
S42	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42,65±1,9
S43	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48,43±2,1
S44	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	18,28±1,1
S45	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	17,18±1,1
S46	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	41,56±1,9
S47	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	47,81±2,1
S48	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40,62±1,9
S49	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48,12±2,1
S50	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	19,06±1,2

Metale maruz kalan izolatlardan EPS izolasyonu gerçekleştirilmeden önce biyokütleri ölçülmüş ve en düşük biyokütleyle göre tüm izolatların biyokütleri eşitlenmiştir. Metale maruz kalan izolatlarda genel olarak metal derişimi arttıkça EPS miktarının da arttığı gözlemlenmiştir. Krom(VI) metaline maruz bırakılan izolatlarda *Pseudomonas stutzeri* S46 izolatının 15 ppm' lik derişiminde en yüksek EPS değeri (74,68 mg/L), *Pseudomonas stutzeri* S46 izolatının 5 ppm'lik derişiminde en düşük EPS değeri (25,31 mg/L) tespit edilmiştir. Kadmiyum(II) metaline maruz kalan izolatlarda *Pseudomonas stutzeri* S23 izolatının 40 ppm' lik derişimde en yüksek EPS değeri (60,93 mg/L), *Pseudomonas stutzeri* S32 izolatının 10 ppm' lik derişiminde en düşük EPS değeri (26,09 mg/L) gözlemlenmiştir. Aynı şekilde bakır(II) metaline maruz kalan izolatlarda 80 ppm' de *Pseudomonas stutzeri* S45 izolatında en yüksek EPS (74,06 mg/L), 10 ppm'

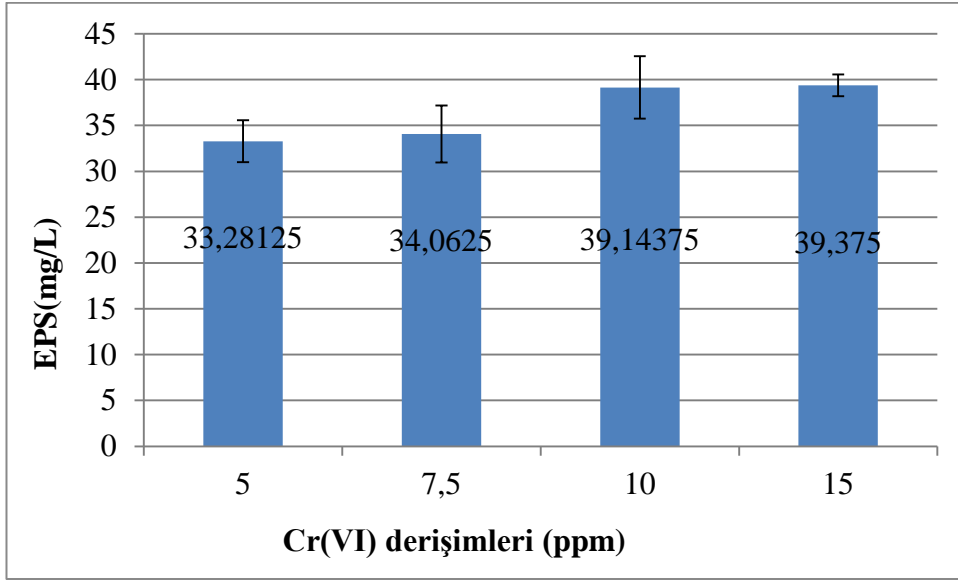
de *Pseudomonas stutzeri* S45 izolatında en düşük EPS değeri (17,5 mg/L) tespit edilmiştir. Mangan(II) metaline maruz kalan izolatlarda 400 ppm' de *Pseudomonas stutzeri* S44 izolatında en yüksek EPS (46,40 mg/L), 100 ppm' de *Pseudomonas stutzeri* S44 izolatında en düşük EPS miktarı (18,75 mg/L) tespit edilmiştir.



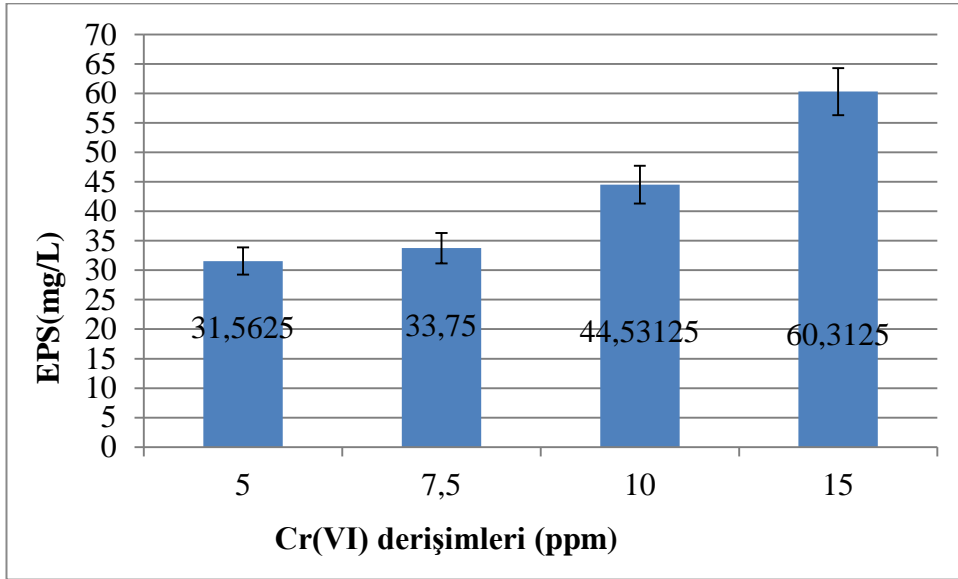
Şekil 4.21. Krom(VI) konsantrasyonlarına maruz kalan *Pseudomonas aeruginosa* S9 izolatının EPS miktarları



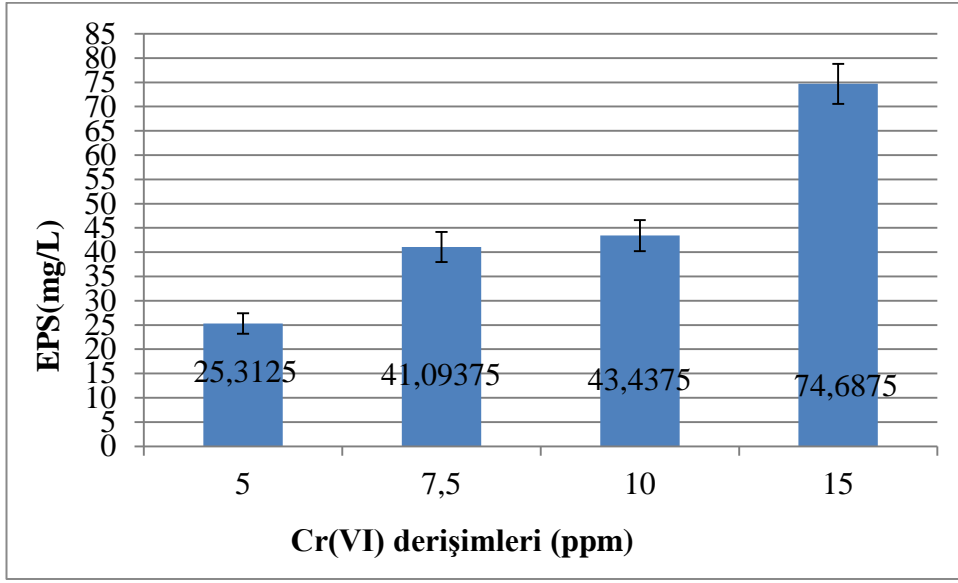
Şekil 4.22. Krom(VI) konsantrasyonlarına maruz kalan *Pseudomonas stutzeri* S17 izolatının EPS miktarları



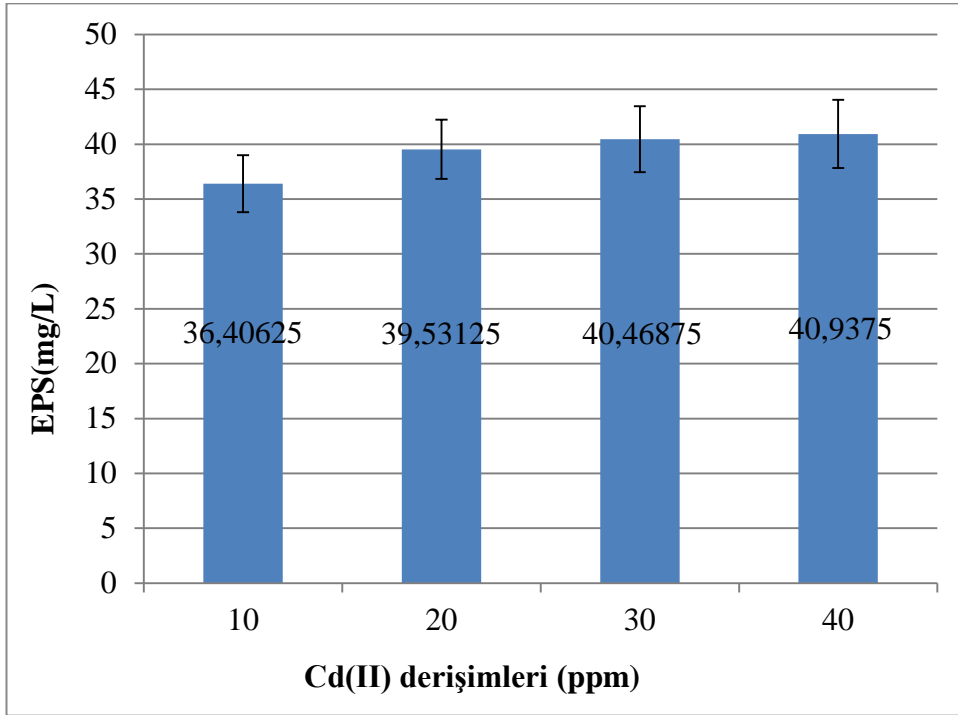
Şekil 4.23. Krom(VI) konsantrasyonlarına maruz kalan *Pseudomonas stutzeri* S18 izolatının EPS miktarları



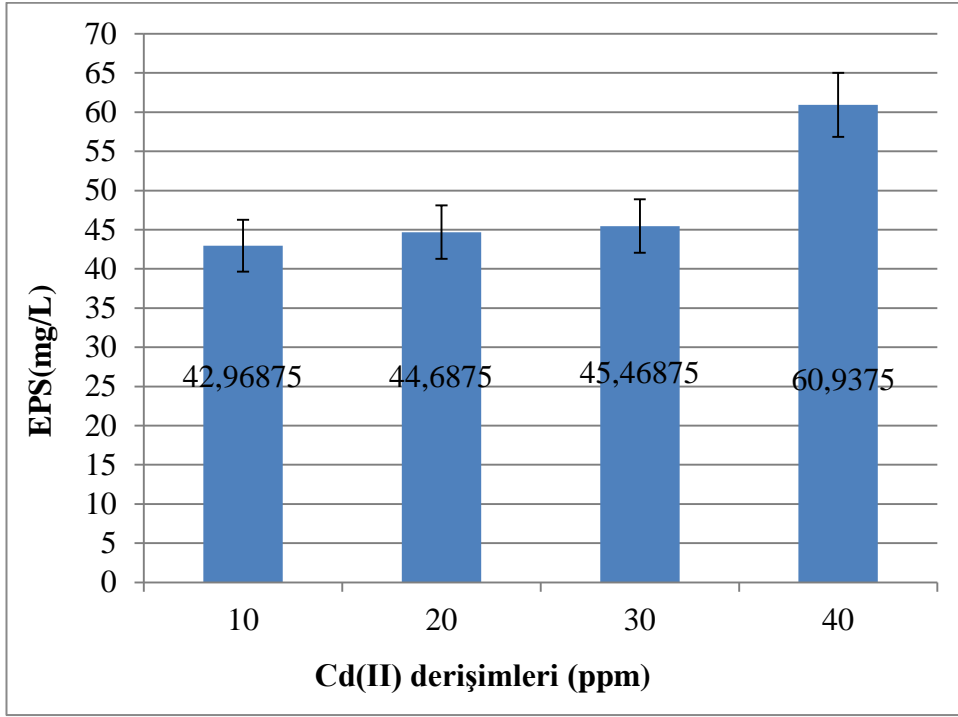
Şekil 4.24. Krom(VI) konsantrasyonlarına maruz kalan *Pseudomonas stutzeri* S24 izolatının EPS miktarları



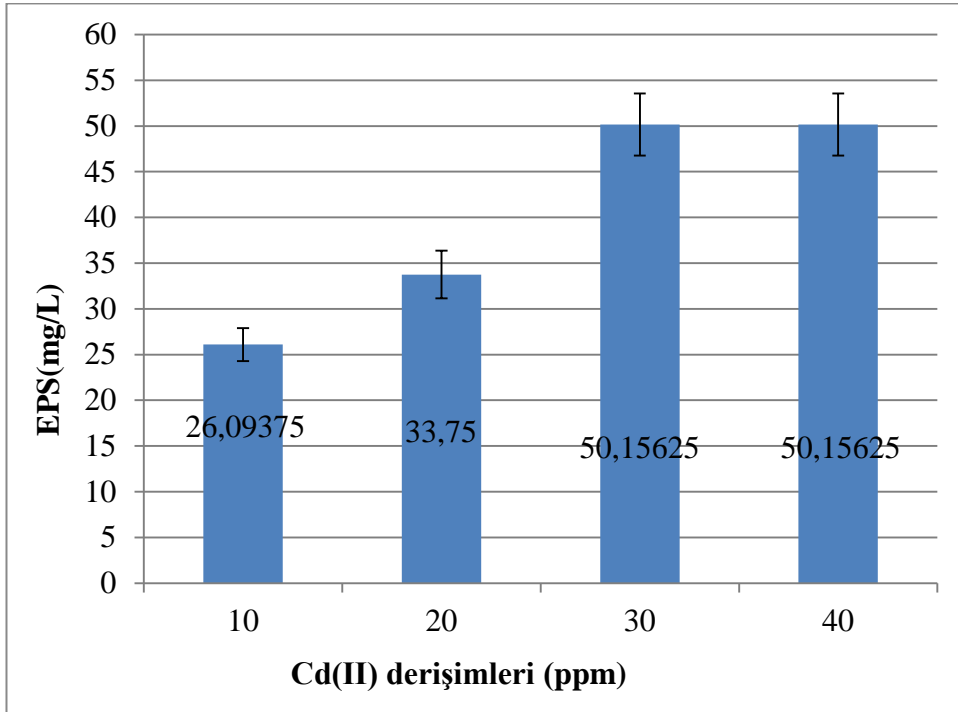
Şekil 4.25. Krom(VI) konsantrasyonlarına maruz kalan *Pseudomonas stutzeri* S46 izolatının EPS miktarları



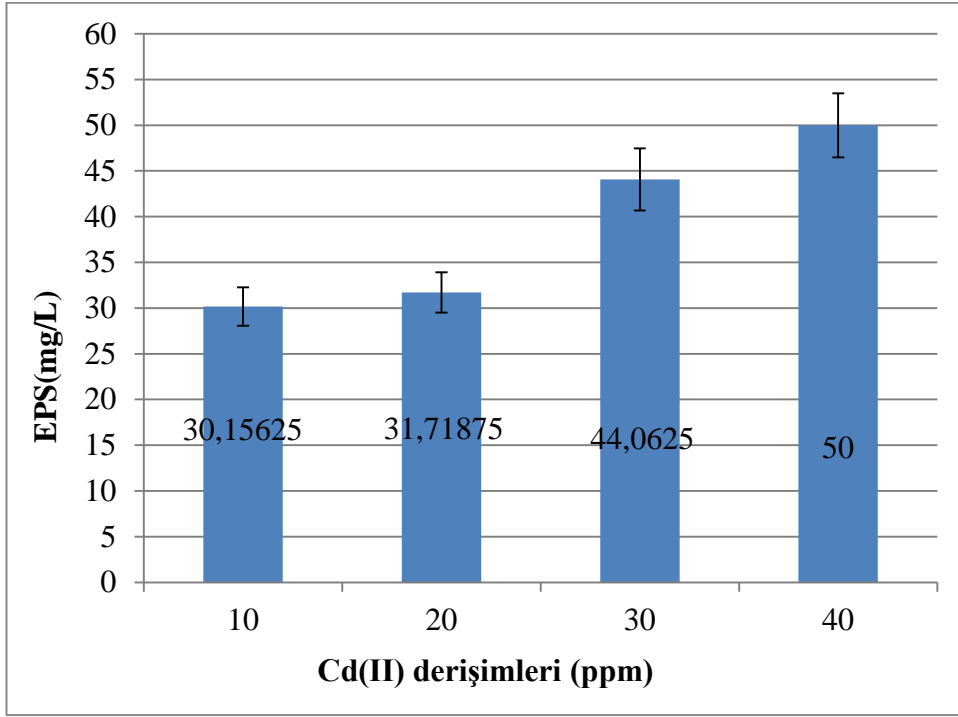
Şekil 4.26. Kadmiyum(II) konsantrasyonlarına maruz kalan *Pseudomonas aeruginosa* S10 izolatının EPS miktarları



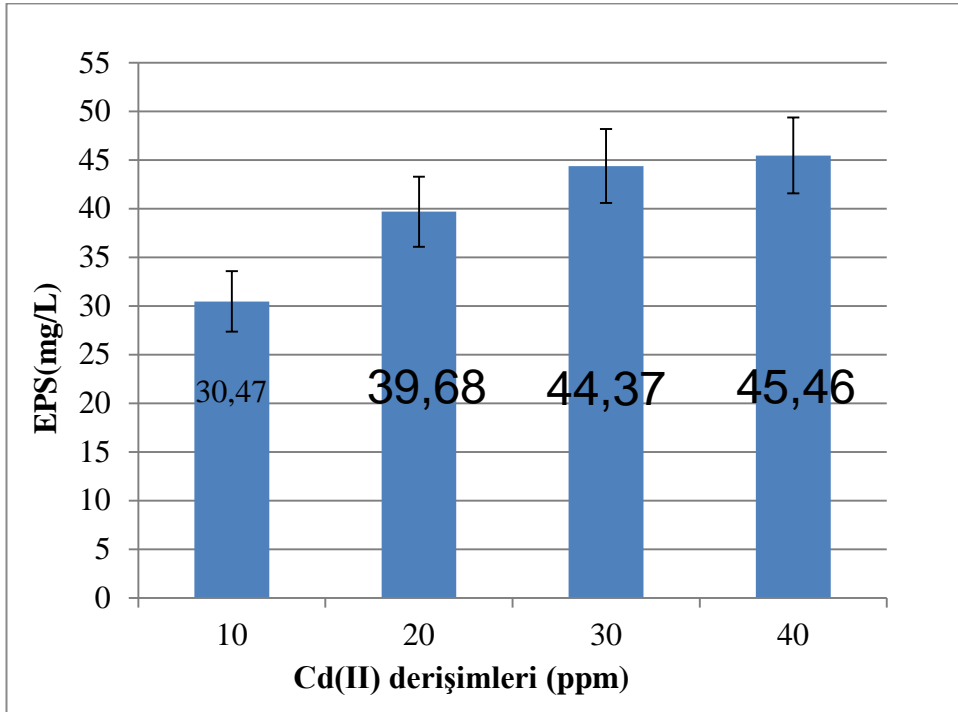
Şekil 4.27. Kadmiyum(II) konsantrasyonlarına maruz kalan *Pseudomonas stutzeri* S23 izolatının EPS miktarları



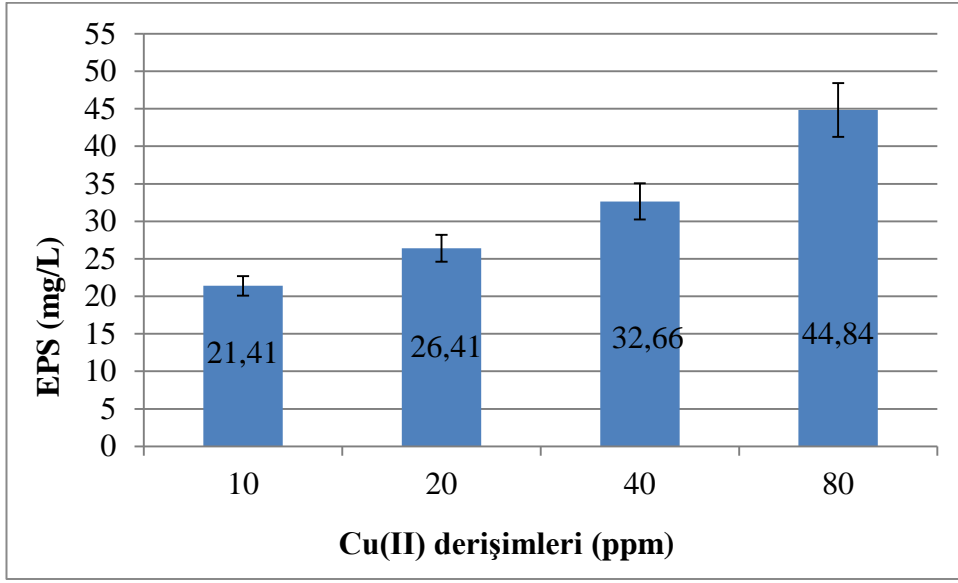
Şekil 4.28. Kadmiyum(II) konsantrasyonlarına maruz kalan *Pseudomonas stutzeri* S32 izolatının EPS miktarları



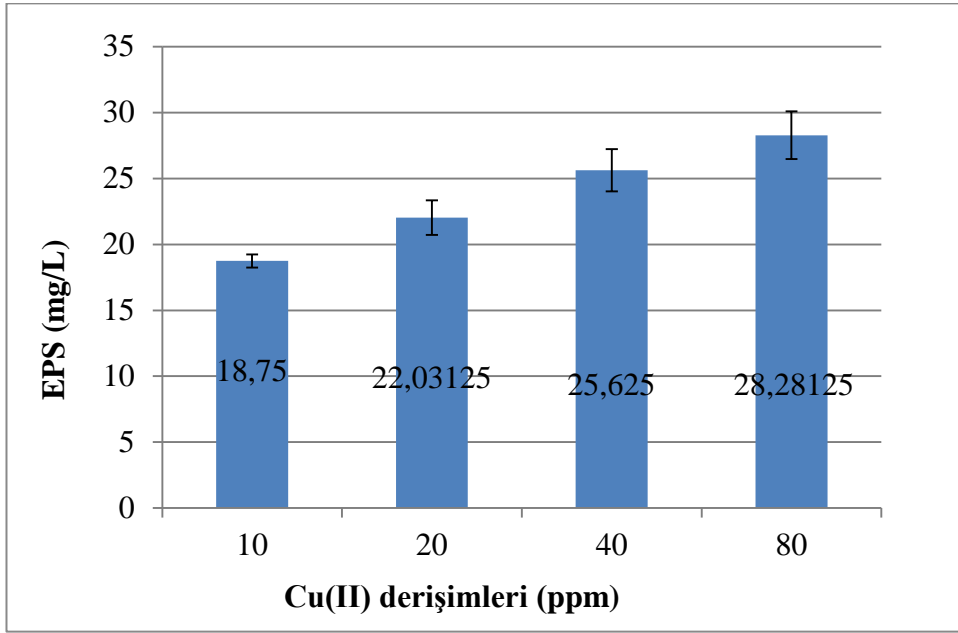
Şekil 4.29. Kadmiyum(II) konsantrasyonlarına maruz kalan *Pseudomonas stutzeri* S44 izolatının EPS miktarları



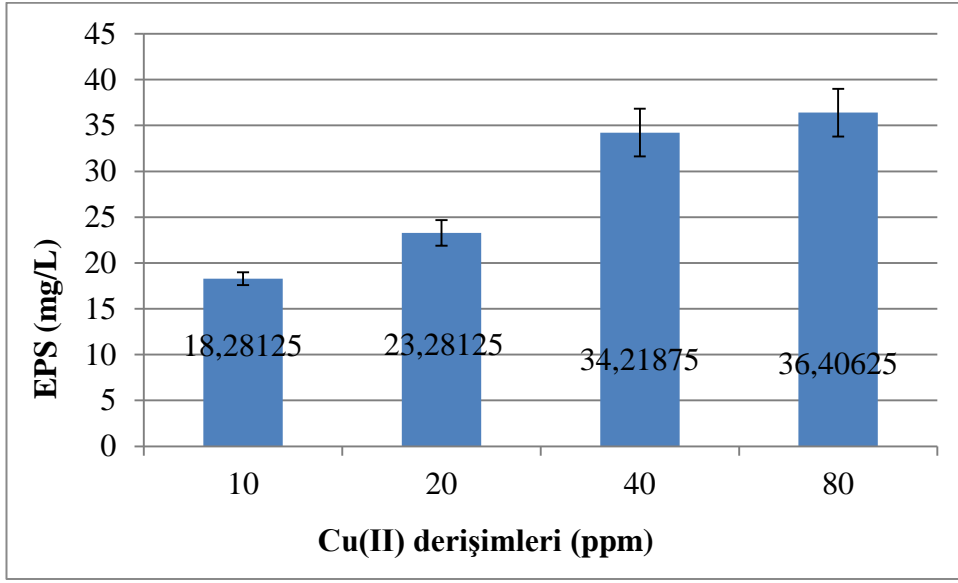
Şekil 4.30. Kadmiyum(II) konsantrasyonlarına maruz kalan *Pseudomonas stutzeri* S50 izolatının EPS miktarları



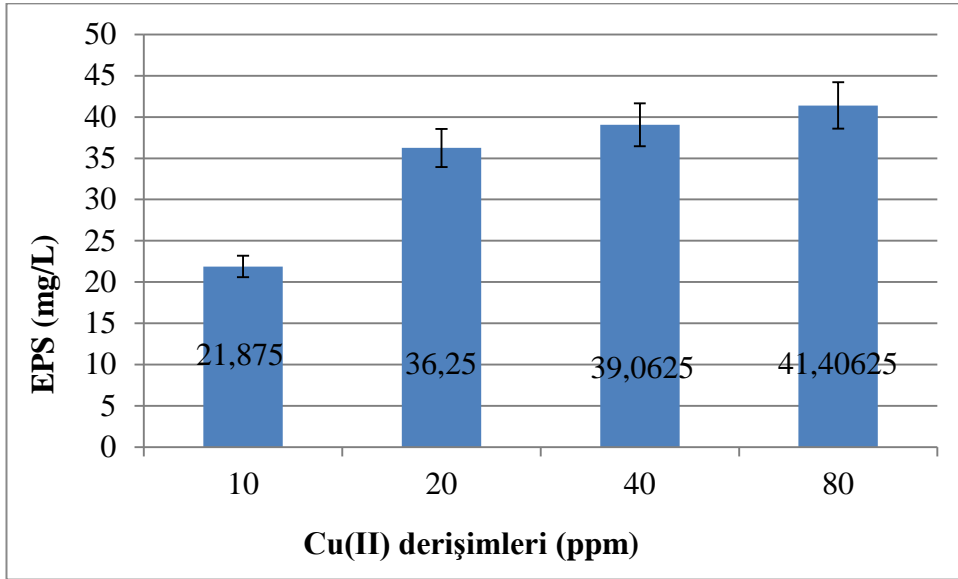
Şekil 4.31. Bakır(II) konsantrasyonlarına maruz kalan *Pseudomonas stutzeri* S7 izolatının EPS miktarları



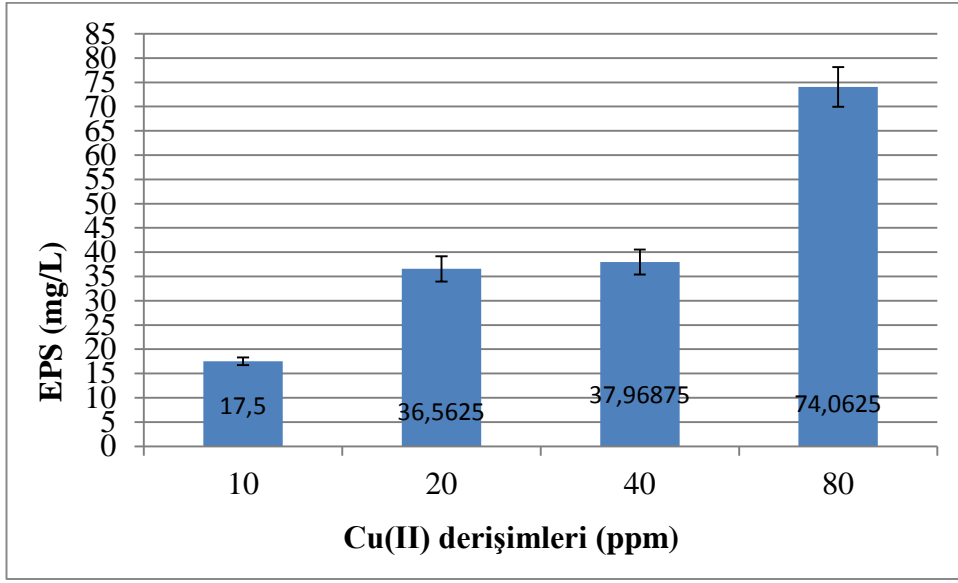
Şekil 4.32. Bakır(II) konsantrasyonlarına maruz kalan *Pseudomonas aeruginosa* S8 izolatının EPS miktarları



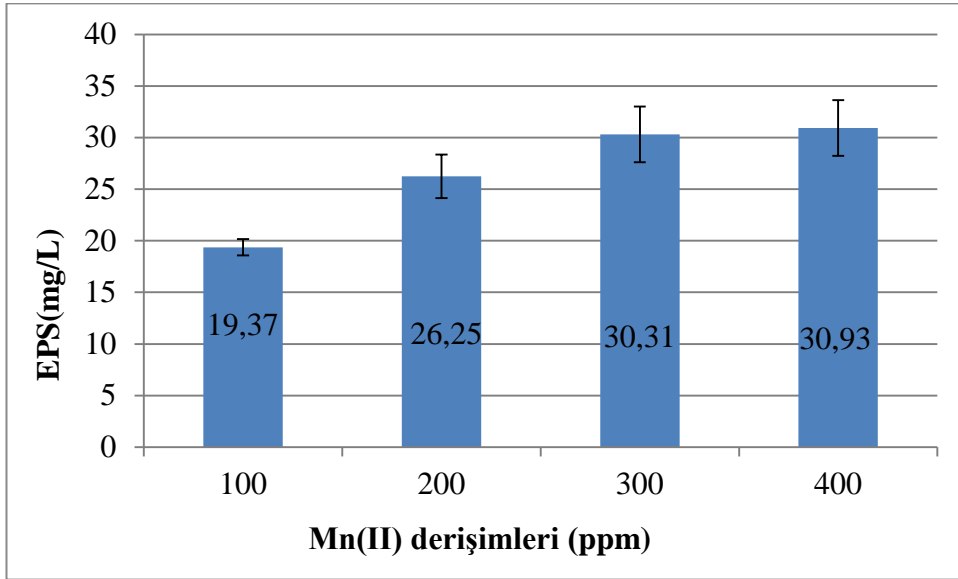
Şekil 4.33. Bakır(II) konsantrasyonlarına maruz kalan *Pseudomonas stutzeri* S25 izolatının EPS miktarları



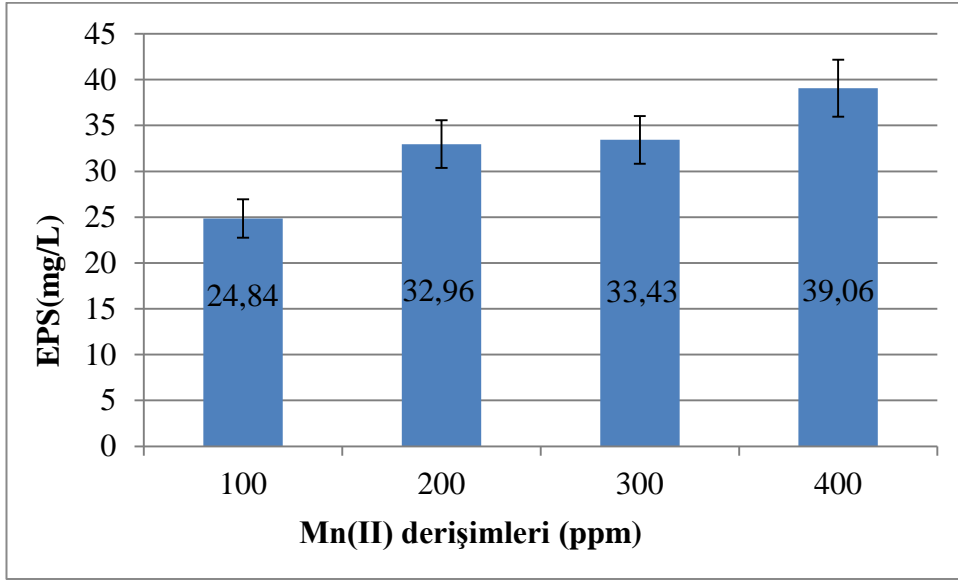
Şekil 4.34. Bakır(II) konsantrasyonlarına maruz kalan *Pseudomonas stutzeri* S32 izolatının EPS miktarları



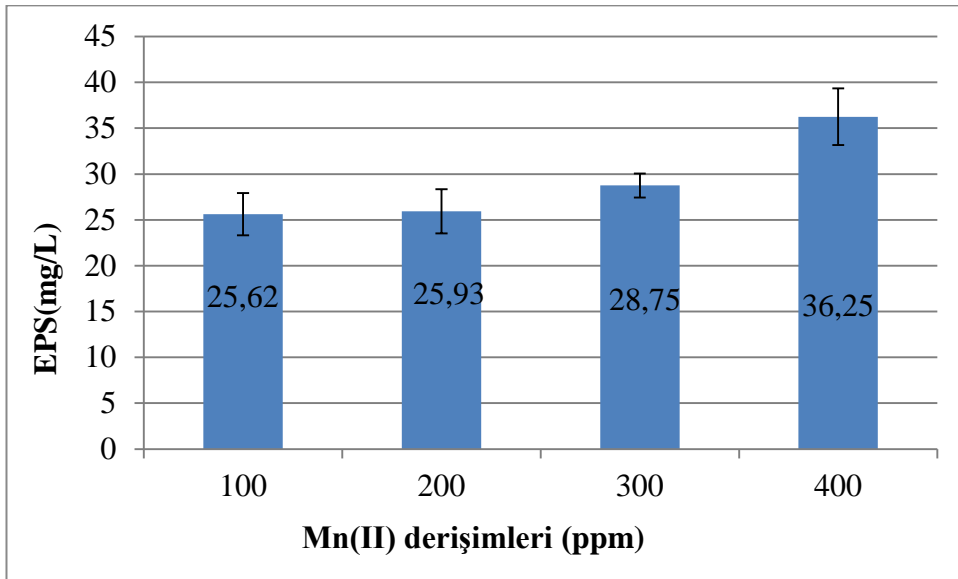
Şekil 4.35. Bakır(II) konsantrasyonlarına maruz kalan *Pseudomonas stutzeri* S45 izolatının EPS miktarları



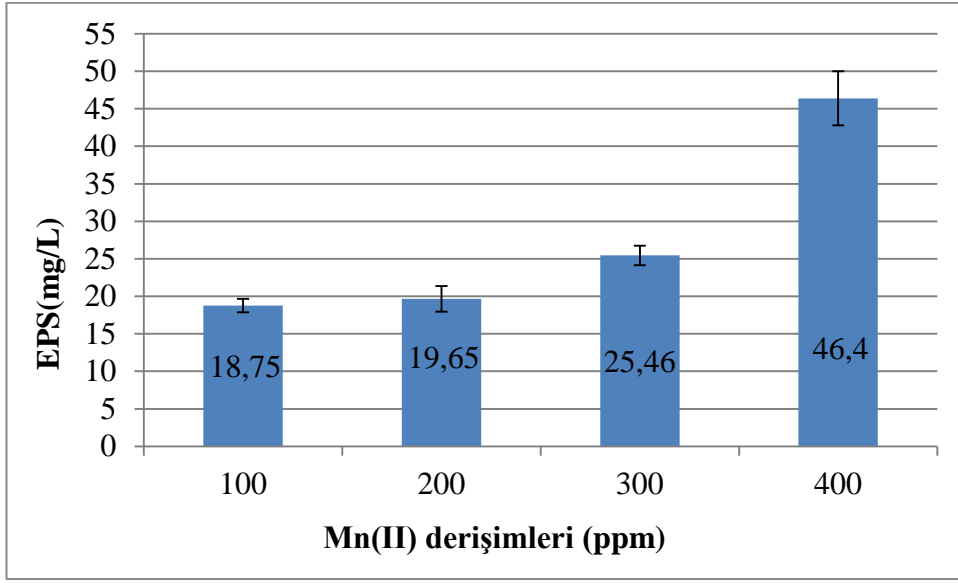
Şekil 4.36. Manganez(II) konsantrasyonlarına maruz kalan *Pseudomonas aeruginosa* S10 izolatının EPS miktarları



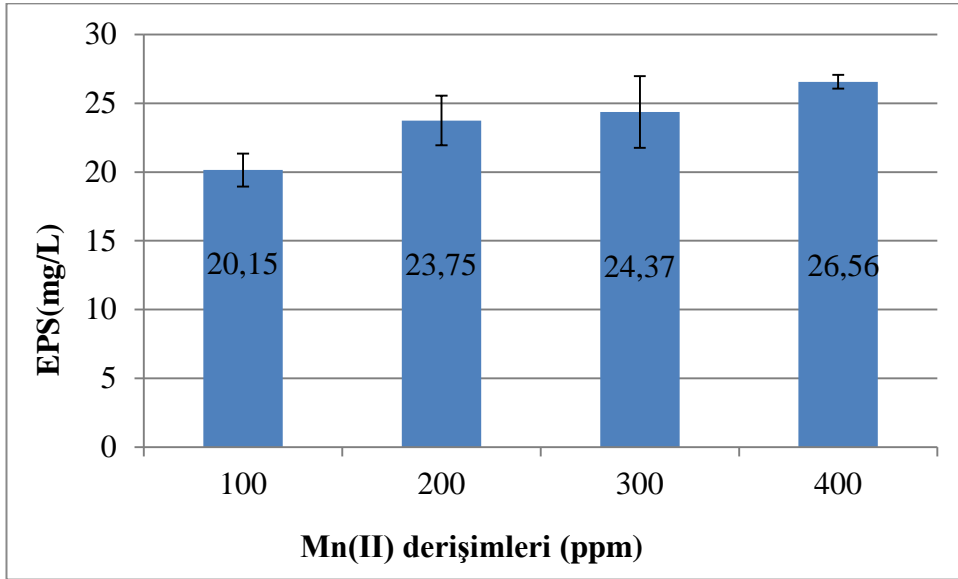
Şekil 4.37. Mangane(II) konsantrasyonlarına maruz kalan *Pseudomonas aeruginosa* S29 izolatının EPS miktarları



Şekil 4.38. Mangane(II) konsantrasyonlarına maruz kalan *Pseudomonas stutzeri* S32 izolatının EPS miktarları



Şekil 4.39. Mangan(II) konsantrasyonlarına maruz kalan *Pseudomonas stutzeri* S44 izolatının EPS miktarları



Şekil 4.40. Mangan(II) konsantrasyonlarına maruz kalan *Pseudomonas stutzeri* S50 izolatının EPS miktarları

5. BÖLÜM

TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Pseudomonas cinsi bakteriler; su, toprak, memeli bağırsakları kanalizasyon ve bazı bitkiler gibi çok geniş bir yayılış alanına sahip olan ve farklı ortamlardan kolayca izole edilebilen gram negatif, basil mikroorganizmalardır [114, 115]. *Pseudomonas* cinsi bakterilerin bazı metabolitler (ekzopolisakkarit, piyosiyenin ve ramnolipid) ürettiği ve bu bakterilerin kirlili alanlarda canlı kalabilme şansının tamamen ürettikleri ikincil metabolitlere bağlı olduğu bildirilmektedir [116-119]. Endüstriyel amaçlı kullanılan bakterilerde aranan en önemli özellik yüksek ikincil metabolit üretimi olmaktadır [120].

Biyoteknolojik uygulamalarda son yıllarda mikrobiyal ekzopolisakkaritler birçok alanda kullanılmaktadır. Mikrobiyal ekzopolisakkaritler, gıda ve ilaç endüstrisinde ve mikrobiyolojik besiyerlerini katılaştırmak için ticari hale getirilmektedirler [81]. Deniz, tatlı su, atık su, toprak gibi farklı çevresel örneklerden izole edilen, *Pseudomonas* spp.' ların EPS ürettikleri bilinmektedir [122]. Bu bakımdan son yıllarda biyoteknolojide geniş uygulama alanlarına sahip olan EPS üretimi birçok araştırmacının dikkatini çekmektedir [123].

Sanayinin gelişmesi ile birlikte son yıllarda çevreye bırakılan atıklar, gün geçtikçe artmakta ve bu atıklar arasında çevreye ve canlılara yüksek oranda zarar veren ağır metaller bulunmaktadır. Bu metaller hücrelerde birikerek, belirli dozların üzerinde toksik olup ölümlere yol açmaktadır. Ağır metal giderimi için kullanılan iyon değişimi, kimyasal çöktürme ve ters ozmoz gibi geleneksel yöntemler pahalı ve etkisiz olup, ağır metallerin çok az miktarını gidermektedir. Ağır metal içeren atık sular, çevreye verilmeden önce arıtılmalı ve uluslararası su standartlarına göre izin verilen kirlilik değerlerinin altına düşürülmelidir [124].

Günümüzde, klasik yöntemlere alternatif olarak daha ekonomik ve pratik, canlı (biyobirikim) ve ölü (biyosorpsiyon) mikrobiyal biyokütle ile ağır metallerin giderimi önem kazanmıştır. Metal iyonları, hücre yüzeyindeki reaksiyon alanları (hücre duvarındaki proteinlerin fonksiyonel grupları ve peptid bağları) ile kompleks yaparak adsorbe edilebildikleri gibi bazı mikroorganizmalar ekzopolisakkarit yapıda polimerler sentezleyerek çözeltideki metal iyonlarını bağladığı bildirilmektedir [50].

Bu tez çalışmasında atık sularda çok yoğun bulunmaları, kolay izole edilebilmeleri vb. özelliklerinden dolayı atık su havuzlarından izole edilen *Pseudomonas*' lar tercih edilmiştir. Atık su örneklerinden toplam 50 adet *Pseudomonas* izole edilmiş, izolatların VITEK 2 Compact 30 (biomerieux) ile tür tanımlamalarına göre 27'sinin *Pseudomonas aeruginosa* ve 23'ünün *Pseudomonas stutzeri* olduğu tespit edilmiştir. Yapılan ön çalışmalar neticesinde atık sulardan alınan numuneler analiz edilerek Cr(VI), Cd(II), Cu(II) ve Mn(II) metallerinin yüksek miktarda olduğu belirlenmiştir. Atık su standartlarına göre Cr(VI) metalinin mevzuat limiti 5 ppm iken bu çalışmada kullanılan atık su numunesinde 6,86 ppm tespit edilmiştir. Cd(II) metalinde mevzuat limiti 2 ppm iken çalışmada kullanılan atık su numunesinde 7,18 ppm olarak tespit edilmiştir. Cu(II) metalinde mevzuat limiti 2 ppm iken bu çalışmada kullanılan atık su numunesinde 16,2 ppm olarak tespit edilmiştir. Mn(II) metalinin atık su standartlarında üst limiti bulunmamaktadır ancak bu çalışmada 14,92 ppm olarak tespit edilmiştir.

Atık sularda *Pseudomonas* cinsi bakterilerin fazla bulunması, bakterilerin bu sulardaki ekstrem şartlara karşı dayanıklılığını sağlayan ürettikleri EPS, piyosiyanın ve ramnolipid gibi sekonder metabolitlerden kaynaklanmaktadır [81]. *Pseudomonas* bakterileri, bu özelliğinden dolayı atık sularda diğer birçok bakteriye göre daha fazla bulunmaktadır.

İzole edilen 50 adet *Pseudomonas* izolatının ön metal toleransları tespit edilmiştir. Bunun için izolatlar Cr(VI), Cd(II), Cu(II) ve Mn(II) metallerinin 10 ppm' lik derişimlere maruz bırakılmış ve 24 saatlik inkübasyon sonunda % ölüm değerleri hesaplanmıştır. Yüzde ölüm değerlerine göre her bir metale en çok direnç sağlayan beşer izolat seçilmiş ve seçilen izolatların hangi metal derişimlerine maruz bırakılacağı saptanmıştır. Dirençli izolatların belirli konsantrasyonlardaki metallerde EPS üretiminin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Uygulanan metaller arasında Cr(VI) ve Cd(II), Cu(II) ve Mn(II)' a nazaran daha toksik etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. Cr(VI) metalinde en dirençli izolat S46 olup Cd(II) metalinde en dirençli izolat S44' tür . Cu(II) metalinde en dirençli izolatlar S7, S8, S25, S32, S45 olup, Mn(II) metaline en dirençli izolatlar S10, S29, S32, S44, S50 olduğu tespit edilmiştir. Cr(VI)'nın çok az miktarı dahi sudaki ekolojik dengeyi bozmaktadır. Cd(II) ise mikroorganizmalar açısından yüksek oranda toksik olup, bazı

mikroorganizmaların demir metabolizmasında görev aldığı bilinmektedir. Bununla birlikte, her iki metal miktarı belirli düzeyi aştığında mikroorganizmalar üzerinde toksik etki göstererek, bir süre sonra ölümlere yol açmaktadır [140]. Yamini ve ark. 2004 yılında Cr(VI)'nin, Simonet ve ark. 1984 yılında Cd(II)'nin patojen bakterilerin patojenitesini azalttığını rapor etmişlerdir [141,142]. Mn(II) ve Cu(II)'da ise durum daha farklıdır. Bu iki metalin eser miktarları metabolik faaliyetlerde görev almaktadır. Cu(II) yaşamın aerobik formlarında görev alan önemli bir metaldir. Elektron transport zincirinde ve redoks aktif enzimlerde elektron alıcısı görevi görmektedir. [143] Bununla birlikte bakırın yüksek dozları prokaryot ve ökaryotlar için toksik etki göstermektedir [144,145]. Mn(II) ise canlı hücrelerde süperoksit dismutaz ve fotosistem II için gerekli olan enzimler için elzem olan önemli bir eser elementtir [146]. Bu nedenle Cu(II) ve Mn(II) diğerlerine nazaran kullanılan izolatlara daha az toksik etki göstermiştir.

Yapılan metal toleransı çalışmasında *Pseudomonas stutzeri* türlerinin *Pseudomonas aeruginosa*'ya nazaran daha dirençli olduğu görülmüştür. *Pseudomonas stutzeri* bakterilerinin hücre duvarı yapısının metal dirençliliğine daha uygun olduğu düşünülmektedir.

Bakteriler ve siyanobakteriler çeşitli olumsuz çevresel şartlara karşı savunma mekanizması olarak ekzopolisakkarit (EPS) üretmektedirler [126,127]. EPS, terminolojide hücre dışı polimerik maddeler, ekzopolisakkaritler ya da ekzopolimerler terimlerinin karşılığı olarak da kullanılmaktadır [127]. Bu polisakkarit yapılar suda çözünebilen bir karaktere sahip olup birçok endüstri kollarında ham madde olarak kullanılmaktadır. Metal bağlayabilme yeteneğine sahip olan ekzopolisakkaritler, bakteri hücrelerini jelatinimsi bir madde ile kaplayarak, hücreyi kuruma ve toksik maddelerden koruduğu düşünülmektedir [128]. EPS kompozisyonu sabit olmayıp büyüme koşulları ve çevresel streslerce değişkenlik halindedir. Birçok izolat, izolata özgü tek bir EPS' den ziyade yaşamları boyunca kompozisyonlarında değişimlere uğrayabilen farklı EPS' ler de üretebilmektedir [129].

Bu çalışmada, 50 adet *Pseudomonas* spp. izolatının optimum gelişme koşullarında ürettikleri ekzopolisakkarit (EPS) miktarları belirlenmiştir. İzolatlar arasında *P. aeruginosa* S20 ve *P. stutzeri* S39' un 52,03 mg/L ile en yüksek EPS üretici olduğu, *P. stutzeri* S25' in 17,81 mg/L ve *P. stutzeri* S45' in 17,18 mg/L ile en düşük EPS üretici

izolat olduğu görülmüştür. Fett ve ark. (1995) *P. fluorescens* ve *P. putida* suşlarında EPS üretimini sırasıyla 30-79 mg/L ve 25-58 mg/L olarak bildirmişlerdir [130]. Bu çalışmada kullanılan *P. aeruginosa* izolatlarının EPS üretimlerinin 18-52 mg/L, *P. stutzeri* izolatlarının ise EPS üretimlerinin 17-48 mg/L aralığında olduğu belirlenmiştir. Burada görülmektedir ki EPS' si yüksek olan izolatlar metale dirençlilik bakımından paralellik göstermemektedir. Bu çalışmada metal direnci ve EPS üretimi arasında bir korelasyon bulunmamaktadır.

Panwichian ve ark 2011 yılında *Rhodobium marinum* NW16 ve *Rhodobacter sphaeroides* KMS24 ile yaptıkları çalışmada kadmiyum (Cd), bakır (Cu), kurşun (Pb), çinko (Zn)' ya dirençli olan bakterinin EPS miktarının düşük olduğunu rapor etmişlerdir [136]. Bu da bu çalışmayı doğrulamaktadır.

Birçok çalışmada belirtildiği üzere EPS miktarından ziyade EPS kompozisyonu metal gideriminde ön plana çıkmaktadır. Hatta metale maruz kalan bazı mikroorganizmaların EPS kompozisyonunda da metale bağlı değişiklikler olduğu bildirilmiştir. Priester ve arkadaşları 2006' da yaptıkları çalışmada Cr(VI)' ya maruz kalan *Pseudomonas putida*' dan elde edilen EPS' nin monosakkarit kompozisyonunda farklılıklar olduğunu tespit etmişlerdir [137].

Öztürk ve arkadaşlarının 2008' de siyanobakteriler ile yaptıkları çalışmada Cr(VI)' ya maruz bırakılan izolatların EPS kompozisyonunda farklılıklar olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada da dirençliliğin EPS kompozisyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir. Öztürk ve arkadaşlarının 2009' da yaptıkları bir çalışmada Cr(VI)' ya direnci olmayan *Synechocystis* sp. BASO672 izolatının direnci olan *Synechocystis* sp. BASO670 izolatına nazaran daha yüksek metal giderdiğini tespit etmişlerdir. Yine aynı çalışmada EPS üretimi ve Cr(VI) giderimi arasında negatif korelasyon olduğu belirtilmiş ve metal gideriminin EPS' deki şeker kompozisyonuna bağlı olduğu rapor edilmiştir [131].

Bu çalışmada % ölüm sonuçlarına göre dirençli olarak seçilen izolatlara 5, 7,5, 10 ve 15 ppm Cr(VI), 10, 20, 30 ve 40 ppm Cd(II), 10, 20, 40 ve 80 ppm Cu(II), 100, 200, 300 ve 400 ppm Mn(II) uygulanmış ve EPS miktarları ölçülmüştür. EPS miktarları ölçülmeden hemen önce tüm izolatların biyokütleleri eşitlenmiştir.

Krom(VI) konsantrasyonlarına maruz kalan izolatlarda *P. stutzeri* S46 izolatının 15 ppm' lik derişiminde en yüksek EPS değeri 74,68 mg/L, *P. stutzeri* S46 izolatının 5 ppm' lik derişiminde en düşük EPS değeri 25,31 mg/L olarak tespit edilmiştir. Kadmiyum(II) metaline maruz bırakılan izolatlarda *P. stutzeri* S23 izolatının 40 ppm' lik derişimde en yüksek EPS değeri 60,93 mg/L, *P. stutzeri* S32 izolatının 10 ppm' lik derişiminde en düşük EPS değeri 26,09 mg/L olarak tespit edilmiştir. Bakır(II) metalinde 80 ppm' de *P. stutzeri* S45 izolatında en yüksek EPS 74,06 mg/L, 10 ppm' de *P. stutzeri* S45 izolatında en düşük EPS değeri 17,5 mg/L olarak belirlenmiştir. Magnezyum(II) metalinde 400 ppm' de *P. stutzeri* S44 izolatında en yüksek EPS 46,40 mg/L, 100 ppm' de *P. stutzeri* S44 izolatında en düşük EPS miktarı 18,75 mg/L olarak tespit edilmiştir. Metale maruz bırakılan izolatlarda genel olarak metal derişimi arttıkça EPS miktarının da arttığı gözlemlenmiştir (P=0,01).

Metal toleranslarına göre seçilen izolatların değişik konsantrasyonlardaki EPS üretim kapasiteleri belirlenmiştir. En fazla EPS üretiminin 15 ppm Cr(VI)' da *Pseudomonas stutzeri* S46 izolatında olduğu (74,68 mg/L), en az EPS üretiminin ise 10 ppm Cu(II)' de *Pseudomonas stutzeri* S45 izolatında olduğu (17,5 mg/L) görülmüştür. Farklı ağır metal konsantrasyonlarına bağlı olarak EPS üretiminin arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Singh et al., 1999; Kazy et al., 2002; Kılıç ve Dönmez 2007; Öztürk ve Aslım 2008, Öztürk ve ark. 2010, Öztürk ve ark. 2014) [121,126,131,132,133,135]. İlk olarak Singh ve arkadaşlarının 1999' da siyanobakterilerle yaptığı çalışmada metal katyonlarının, EPS ve tiyol üretimini desteklediğini göstermişlerdir. *Pseudomonas aeruginosa* ile yapılan çalışmada ise ortamdaki Cu⁺² iyonlarının EPS üretimini 4 kat arttırdığı tespit edilmiştir [131]. Sharma ve arkadaşlarının 2008' de yaptığı çalışmada, *Gleocapsa* sp. ve *Nostoc* sp.' nin artan krom konsantrasyonlarına bağlı EPS üretimleri incelenmiş, 5 ppm ve 20 ppm aralığında uygulanan Cr⁺⁶ konsantrasyonlarında, 5 ppm' den sonra EPS üretiminin düştüğü gözlenmiştir [139]. Bu çalışmada ise *Pseudomonas* spp. izolatlarına 5 ppm ve 15 ppm aralığında uygulanan Cr⁺⁶ konsantrasyonlarındaki artış ile EPS üretiminin de arttığı gözlemlenmiştir.

Birçok farklı çevresel stres şartlarının mikroorganizmaların meydana getirdiği biyofilim tabakasında bulunan EPS yapısını arttırdığı bilinmektedir. Örneğin kuraklık

faktörünün *Pseudomonas* sp.' ın EPS üretimini arttırdığı belirlenmiştir [138]. Sülfat indirgeyen bakteriler Cr(III)' e maruz kaldıklarında biyofilimlerinde bulunan EPS yapısının % 82 arttığı gözlenmiştir [57]. Aynı zamanda sülfat indirgeyen bakterilerin karışık kültürleri Cd II' ye maruz kaldıklarında metal bağlayan polimerler ile birlikte EPS miktarlarında da artış olduğu tespit edilmiştir [56].

Birçok bakteri hücresi pH, kuraklık, sıcaklık değişimleri ve ağır metaller gibi stres şartlarında EPS üreterek yaşamlarını devam ettirmektedirler. Sentezlenen EPS kimi zaman bakteriyi ağır metaller gibi olumsuz çevre şartlarından korurken, kimi zaman da ortamda bulunan ağır metalleri tuttuğu bilinmektedir. Bu özellik bakterinin cinsine ve ağır metalin çeşidine göre değişmektedir [134]. Öztürk ve Aslım 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada tuz stresine maruz kalan siyanobacter izolatlarının EPS miktarlarını incelemiş tuz konsantrasyonunun arttıkça izolatların EPS miktarlarında da artış olduğunu tespit etmişlerdir [135].

Sonuç olarak endüstriyel ve tarım alanlarında kullanılan, su ve karasal ekosistemlerde risk oluşturan organik kirleticilerin mikroorganizmalar yoluyla biyodegradasyon ve biyoremediasyon çalışmaları son yıllarda önem kazanmış bir işlemdir. Bu alanda kullanılan mikroorganizmalar özellikle *Pseudomonas* spp.' ların yardımı ile hem çevrede sorun oluşturan kirletici ajanlar ortadan kaldırılarak çevre kirliliği azaltılması hemde biyoteknolojik açıdan önemli olan ve çok değişik endüstrilerde insanlara hizmet eden metabolitlerin eldesinin biyoteknoloji alanındaki araştırmalara yeni bir boyut getireceği düşünülmektedir.

Pseudomonas' lar yaygın mikroorganizmalar olup birçok metal dirençlilik çalışması bulunmaktadır. Ancak bu tezde çalışılan Cr(VI), Cd(II), Cu(II) ve Mn(II) metallerinin EPS üretimine etkisi ile ilgili çalışmalar bulunmamaktadır. Bu açıdan bakıldığında bu çalışma orijinal olup özgün değeri yüksektir. Bu sayede ekonomik öneme sahip EPS' nin daha ucuza üretilmesi mümkün olacaktır.

Çalışmada çevrede kirlilik yaratan ve canlılar üzerine toksik etkileri bakımından risk teşkil eden ağır metal iyonlarının, atık sularında yaygın olarak bulunan *Pseudomonas* cinsi bakteriler tarafından ortadan kaldırılmasına yönelik çalışmaları gerçekleştirilmiş

ve bu esnada çok değişik endüstrilerde önemli hammaddelerden olan ekzopolisakkaritin bakteriyal kaynaklardan eldesi araştırılmıştır.

EPS miktarları yüksek olan suşlar çeşitli sanayilerde kimyasal ürünlere alternatif doğal ürünlerin üretilmesinde kullanılabilirler. Aynı zamanda EPS miktarları yüksek olan suşların atıksularda bulunan ve toksiditesi yüksek olan çeşitli metallerin gideriminde kullanılması çevre açısından avantaj sağlayacaktır.

Yapılan deneysel ve istatistiksel çalışmalar sonucunda, EPS' nin izolatların ağır metal dirençliliğinde koruyucu bir rol oynadığı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçların, bu çalışmanın devamına ya da başka araştırmacıların çalışmalarına ışık tutacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. İleri, R., *Çevre Biyoteknolojisi*, 501-503, 2000.
2. Tefloncu A., “Biyoteknoloji”, *Ege Üniversitesi Yayınlar*,. Bornova, İzmir, 1995.
3. Meyer, J. M., “Pigment fluorescent et Métabolisme du fer chez *Pseudomonas fluorescens*”, *Thèse d’Etat*, Strasbourg, 328, 1977.
4. Sutherland, I.W., “Polysaccharases for microbial exopolysaccharides”, *Carbohydrate Polymers*, 38, 319-328, 1999.
5. Cerantola, S., Bounery, J. D., Segonds, C., Marty, N. and Montrozier, H., “Exopolysaccharide production by mucoid and non-mucoid strains of *Burkholderia cepacia*”, *FEMS Microbiol. Lett.*, 185: 243-246, 2000.
6. Cox, C. D., “Role of pyocyanin in the acquisition of iron from transferring”, *Infect. Immun.* 52: 263-270, 1986.
7. Desai, J. D. and Banat, I. M., “Microbial production of surfactants and their commercial potential”, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 47-64, 1997.
8. Essar, D. W., Eberly, L., Hadero, A., and Crawford, I. P., “Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: Interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications”, *J. Bacteriology*, 172: 884-900, 1990.
9. Nereus, W., Gunther I. V., Nunez, A. Fett, W., and Solaiman, K. Y., “Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 2288-2293, 2005.
10. Steinberger, R. E. and Holden P. A., “Macromolecular composition of unsaturated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with time and carbon source”, *Biofilms*, 1: 37-47, 2004.
11. Patterson, J. W., “Waste water treatment”, *Science Publishers Inc.*, U.S.A., 43-55, 59-67, 69-81, 1977.
12. Atımtay, A., Yetis, Ü., “Atıksu özellikleri ve analizleri, endüstriyel atıksu arıtımı”, (A. Tanyolaç, S. Çelebi), TMMOB Kimya Mühendisleri Odası Yayınları, Ankara, 3: 67-83, 1992.
13. Viel, P., Palacin, S., Descours, F., Bureau, C., Le Derf, F., Lyskawa, J., Salle, M., “Electropolymerized poly-4-vinylpyridine for removal of copper from wastewater”, *Appl. Surf. Sci.*, 212-213: 792-796, 2003.

14. Aksu, Z., “Atıksulardaki ağır metal iyonlarının yeşil alglerden *Chlorella vulgaris*’ e adsorpsiyonunun kesikli düzende karıştırılmalı ve akışkan yatak tepkime kaplarında incelenmesi”, Doktora tezi, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 1-190, 1988.
15. Sundstrom, D. W., Klei, H. E., “Wastewater treatment”, *Prentice Hall., Inc.*, U.S.A., 28-40, 1979.
16. Uslu, O., Türkman, A., “Su kirliliği ve kontrolü”, *T.C. Başbakanlık Çevre Genel Müdürlüğü Yayınları.*, Ankara, 1: 331-333, 336, 1987.
17. Gramion, F., “Analyses of microbial community structures and functions in heavy metal-contaminated soils using molecular methods”, Ph.D. thesis, *Swiss Federal Institute of Technology of Lausanne, Switzerland*, 1-107, 2003.
18. Prego, R., Cobelo-Garcia A, “Twentieth century overview of heavy metals in the Galician Rias, (NW Iberian Peninsula)”, *Environ. Pollut.*, 121: 425–452, 2003.
19. Edwards, K. A., Macklin, M. G., Miller, J. R., Lechler, P. J., “Sources, distribution and storage of heavy metals in the Rio Pilcomayo, Bolivia”, *J. Geochem. Explor.*, 72: 229-250, 2001.
20. Nies, D. H., “Microbial heavy-metal resistance”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51: 730-750, 1999.
21. Al-Asheh, S., Banat, F., Abu-Aitah, L., “Adsorption of phenol using different types of activated bentonites”, *Sep. Purif. Technol.*, 33 (1): 1-10, 2003.
22. Young, R. V., “World of Chemistry”, *Gale Group*, Michigan 48-77, 2000.
23. Zouboulis, A. I., Loukidou, M. X., Matis, K. A., “Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils”, *Process Biochem.*, 39: 909-916, 2004.
24. Arora, N. R., Pandey, G. N., “Heavy metal and health”, *J. Inst. Eng.*, 65: 1-6, 1984.
25. Thyagarajan, G., “Leather industry-in pursuit of better image”, *The Hindu Survey Environ.*, 143-145, 1992.
26. Sudha, B. R., Emilia, T. A., “Biosorption of Cr(VI) from aqueous solution by *Rhizopus nigricans*”, *Biores. Technol.*, 79: 73-81, 2001.

27. Carlos, C., Jesus, C. G., Silvia, D., Felix, G. C., Herminia, L. T., Juan Carlos, T. G., Rafael, M. S., “Interactions of chromium with microorganisms and plants”, *FEMS Microbiol. Rev.*, 25: 335-347, 2001.
28. Dakiky, M., Khamis, M., Manassra, A., Mer'eb, M., “Selective adsorption of chromium(VI) in industrial wastewater”, *Adv. Environ. Res.*, 6 (4): 553-540, 2002.
29. Förstner, U., Wittman, G. T. W., “Metal Pollution in the aquatic environment”, *Springer*, Berlin 197-230, 1983.
30. Kartal, G., Guven, A., Kahvecioğlu, O., Timur, S., “Metallerin Çevresel Etkileri-II, www.metalurji.org.tr/dergi/dergi137/d137_4651.pdf, Mart 2009
31. Cabuk A., “Sıkıştırılmış Yatak Biyoreaktörde Immobilize Bakteriyel Biyokütle Kullanılarak Atık Sulardan Ağır Metal Giderimi”, *Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, SF. 3-28, Eskişehir, 2001
32. Gokağaçlı, N, G., “*Microcystis sp.* ile Demir, Bakır ve Çinko Metallerinin Giderimi”, *Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, SF. 1-17, İstanbul, 2007
33. Morgan J.J., “Chemical Equilibria and Kinetic Properties of Manganese in Natural Waters”, S.D. Faust and J.V. Hunter, editors, *Principles and Applications of Water Chemistry*, Wiley and Sons Inc, Newyork, 1967
34. Davies S.H.R., Mn(II) Oxidation In The Presence of Metal Oxides, Thesis,(PHD), *California Institute of Technology*, 1985
35. Environmental and Workplace Health. Manganese, 1987
36. 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.
37. 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.
38. 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.

39. 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.
40. Malik, A., “Metal bioremediation through growing cells”, *Environ. Int.*, 30: 261-278, 2004.
41. 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.
42. Dursun, A. Y., Uslu, G., Cuci, Y., Aksu, Z., “Bioaccumulation of copper(II), lead(II) and chromium(IV) by growing *Aspergillus niger*”, *Process Biochem.*, 38: 1647-1651, 2003.
43. Andrade, L., Keim, C. N., Farina, M., Pfeiffer, W. C., “Zinc detoxification by a cyanobacterium from a metal contaminated bay in Brazil”, *Braz. Arch. Biol. Techn.*, 47 (1): 147-152, 2004.
44. Evangelou, M. W. H., Daghan, H., Schaeffer, A., “The influence of humic acids on the phytoextraction of cadmium from soil”, *Chemosphere*, 57: 207-213, 2004.
45. Bremner, J., Beattie, J. H., “Metallothionein and the trace metals”. *Ann. Rev. Nutr.*, 10: 63-83, 1990.
46. Floriańczyk, B., “Metallothioneins and its role in metal regulation, binding of reactive oxygen species, apoptosis and cell differentiation”, *J. Pre-Clin. Clin. Res.*, 1 (1): 16-18, 2005.
47. Pennella, M. A., “Metal specificity and the mechanism of allosteric regulation in metal sensing metal responsive transcriptional repressors *Staphylococcus aureus* C2rA and *Mycobacterium tuberculosis* NmtR”, PhD Thesis, Texas A&M University, 5-6, 2005.
48. Jensen, T. E., Baxter, M., Rachlin, J. W., Jani, V., “Uptake of heavy metals by *Plectonema boryanum* (Cyanophyceae) into cellular components, especially polyphosphate bodies: an X-ray energy dispersive study”, *Environ. Pollut.*, 27: 119- 127, 1982.
49. Daniels, M. J., Turner-Cavet, J. S., Selkirk, R., Sun, H., Parkinson, J. A., Sadler, P. J., Robinson, N. J. “Coordination of Zn²⁺ (and Cd²⁺) by prokaryotic

- metallothionein: involvement of hisimidazol”, *J. Biol. Chem.*, 273: 22957-22961, 1998.
50. Liu, Y., Lam, M. C., Fang, H. H. P., “Adsorption of heavy metals by EPS of activated sludge”, *Water Sci. Technol.*, 43: 59–66, 2001.
 51. Wang, J. L., Chen, C., “Biosorption of heavy metal by *Saccharomyces cerevisiae*: areview”, *Biotechnol. Adv.*, 24 (5): 427–451, 2006.
 52. Wingender, J., Neu, T. R., Flemming H. C., “Microbial extracellular polymeric substances: Characterization, structures and function”, *Springer-Verlag*, Heidelberg, 170-200, 1999.
 53. Liu, H., Fang, H. P., “Characterization of electrostatic binding sites of extracellular polymers by linear programming analysis of titration data”, *Biotechnol. Bioeng.*, 80: 806-811, 2002.
 54. Sponza, D. T., “Extracellular polymer substances and physicochemical properties of flocs in steady and unsteady-state activated sludge systems”, *Process Biochem.*, 37: 983-998, 2002.
 55. Vanhaverbeke, C., Heyraud, A., Mazeau, K., “Conformational analysis of the exopolysaccharide from *Burkholderia caribensis* strain MWAP71: Impact of the interaction with soils”, *Biopolymers*, 69: 480–497, 2003.
 56. White, C., Gadd, G. M., “Accumulation and effects of cadmium on sulphatereducing bacterial biofilms”, *Microbiology*, 144: 1407-1415, 1998.
 57. Fang, H. H. P., Xu, L. C., Chan, K. Y. “Effects of toxic metals and chemicals on biofilm and biocorrosion”, *Water Res.*, 36: 4709–4716, 2002.
 58. Kazy, S. K., Sar, P., Singh, S. P., Sen, A. K., D’Souza, S. F., “Extracellular polysaccharides of a copper-sensitive and copper-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain: synthesis, chemical nature and copper binding”, *World J. Microb. Biot.*, 18: 583-588, 2002.
 59. Priester, J. H., Olson, S. G., Webb, S. M., Neu, M. P., Hersman, L. E., Holden, P. A., “Enhanced exopolymer production and chromium stabilization in *Pseudomonas putida* unsaturated biofilms”, *Appl. Environ. Microb.*, 72 (3): 1988-1996, 2006.

60. Adarsh, V. K, Mishra, M., Chowdhury, S., Sudarshan, M., Thakur A. R., Chaudhuri, S. R., “Studies on metal microbe interaction of three bacterial isolates from east calcutta wetland”, *J. Biol. Sci.*, 7: 80-88, 2007.
61. Gürleyendağ B., “Polisakkarit üreten ekstremofillerin belirlenmesi ve ekzopolisakkarit üretimi”, *Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul, 2006.
62. Ruijsenaars, H.J. 2001. Enzymatic modification of bacterial exopolysaccharides - xanthan lyase as a tool for structural and functional modification of xanthan. Wageningen University, The Netherlands, Master Thesis.
63. Bhaskar, P.V., Bhosle, N.B., “Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical processes”, *Current Science*, 88, 45-53, 2005.
64. Bragadeeswaran, S. Jeevapriya, R., Prabhu, K., Rani, S.S., Priyadharsini, S., Balasubramanian T., “Exopolysaccharide production by *Bacillus cereus* GU812900, a fouling marine bacterium”, *African Journal of Microbiology Research*, 5(24), 4124-4132, 2011.
65. Singh, R.P. Shukla, M.K., Mishra, A., Kumari, P., Reddy, C.R.K., Jha B., “Isolation and characterization of exopolysaccharides from seaweed associated bacteria *Bacillus licheniformis*”, *Carbohydrate Polymers*, 84, 1019–1026, 2011.
66. Chen, Y.P. Zhang, P., Guo, J.S., Fang, F., Gao, X., Li, C., “Functional groups characteristics of EPS in biofilm growing on different carriers”, *Chemosphere*, 92, 633–638, 2013.
67. Liu, H. Fang, H.H.P., “Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges”, *Journal of Biotechnology*, 95, 249–256, 2002.
68. Çelik, G.Y. Aslım, B., Beyaztlı, Y., “Characterization and production of the exopolysaccharide (EPS) from *Pseudomonas aeruginosa* G1 and *Pseudomonas putida* G12 strains”, *Carbohydrate Polymers*, 73, 178–182, 2008.
69. Minervini, F. Angelis, M.D., Surico, R.F., Ganzle, M., Gobbetti, M., “Highly efficient synthesis of exopolysaccharides by *Lactobacillus curvatus* DPPMA10 during growth in hydrolyzed wheat flour agar”, *International Journal of Food Microbiology*, 141, 130–13, 2010.

70. Donot, F. Fontana, A., Baccou, J.C., Galindo, S.S., “Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction”, *Carbohydrate Polymers*, 87, 951–962, 2012.
71. Öner, E.T. Akbuğa, F.J., Genç, S., Sezer, A.D., “Yeni bir mikrobiyal biyopolimerin endüstriyel uygulama alanlarının araştırılması”, Proje No: 108M193, İstanbul, 2010.
72. Milci, S. Yaygın, H., “Laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkaritler ve süt ürünlerindeki fonksiyonları”, *Gıda*, 30 (2), 123-129, 2005.
73. Mishra, A. Jha, B., “Microbial exopolysaccharides”. *Applied Bacteriology and Biotechnology*, 5, 8-25, 2013.
74. Aslım, B. Beyatlı, Y., Soran, H., Mercan, N., Özkaya, F.D., Yüksekdağ, Z.N., Ediz, N., “Bazı laktik asit bakterilerinin ekzopolisakkarit üretimlerinin belirlenmesi”, TÜBİTAK Proje No: TBAG-2090 (101T129), 2005.
75. Staudt, A., “ Identification of environmental factors critical to the production of exopolysaccharides by *Rhizobium tropici*”, Notre Dame University, Civil Engineering and Geological Sciences, Master Thesis, 2009.
76. Öner, E.T., “Microbial production of extracellular polysaccharides from biomass”, *Green Energy and Technology*, 6, 35-56, 2013.
77. Sutherland, I.W., “Novel and established applications of microbial polysaccharides”, *Tietech January*, 16, 41-46, 1998.
78. Yılmaz, M., “Bazı *Bacillus* türlerinin ekzopolisakkarid (EPS) üretimi”, *Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, Niğde, 2006
79. Kumar, A.S. Mody, K., Jha, B., “Bacterial exopolysaccharides – a perception”, *Journal of Basic Microbiology*, 47, 103–117, 2007.
80. Okada, M. Nakamura, Y., Hayashi, S., Ozaki, K., Usami, S., “Chemical structure and biological activity of a quorum sensing pheromone from *Bacillus subtilis* subsp. *Natto*”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25, 4293–4296, 2015.
81. Onbaşılı, D., “Çevredeki organik kirleticilerden biyoteknolojik olarak bazı ikincil metabolitlerin üretimi” *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Doktora Tezi, Ankara, 2006.

82. Freitas, F. Alves, V.D., Reis, M.A.M., “Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications”, *Trends in Biotechnology*, 29, 388-398, 2011.
83. Sutherland, I.W., “Microbial exopolysaccharide synthesis, in extracellular microbial polysaccharide”, *American Chemical Society*, 7, 40-57, 1977.
84. Costerton J. W., Cheng K. J., Geesey G. G., Ladd T. I., Nickel J. C., Dasgupta M., et al., “Bacterial Biofilms in Nature and Disease”, *Annu Rev Microbiol.*, 41, 435-64, 1987.
85. Kumar C. G., Anand S. K., “Significance of Microbial Biofilms in Food Industry: a Review.”, *Int J Food Microbiol*, 42, 9-27, 1998.
86. Yalpani M., Sandford P. A., Commercial Polysaccharides: Recent Trends and Developments. In: Yalpani M., editor, Industrial Polysaccharides Genetic Engineering, Structure/Property Relations and Applications. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 311-35, 1987.
87. Sutherland I. W., “Novel and Established Applications of Microbial Polysaccharides”, *Trends Biotechnol*, 16, 41-46, 1998.
88. Becker A., Katzen A., Pühler and L., Ielpie. “Xanthan Gum Biosynthesis and Application: a Biochemical/Genetic Perspective”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 145-152, 1998.
89. Wolfaardt G., Lawrence J., Robarts R., Caldwell S., Caldwell D., “Multicellular Organization in a Degradative Biofilm Community”, *Appl. Env. Microbiol.*, 60, 434-446, 1994.
90. Costerton J., Lewandowski Z., Caldwell D., Korber D., Lappin-Scott H., “Microbial Biofilms”, *Annu. Rev. Microbiol*, 49, 711-745, 1995.
91. Davey M., O’Tool G., “Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics”, *Microbiol. Mol. Rev.*, 64, 847-867, 2000.
92. Stewart P., Costerton J. W., “Antibiotic Resistance in Biofilms”, *Lancet*, 358, 135-138, 2001.
93. Krylova T., Popova L., Pechurkin N., Kashperova T., Belyavskaya V., “Population Heterogeneity of Plasmidbearing and Plasmid-Free *Bacillus subtilis* Strains Under Different Environmental Conditions”, *Microbiologia*, 69, 220-224, 2000.

94. Moller S., Sternberg C., Andersen J., Christensen B., Ramos J., Givskov M., Molin, S., "Insituexpression in Mixed-Culture Biofilms: Evidence of Metabolic Interactions Between Community Members", *Appl. Environ. Microbiol*, 64, 721-732, 1998.
95. Kitazawa H., T. Toba T., Itoh N., Kumano S., Adachi and T., Yamaguchi, "Antitumoral Activity of Slime-Forming, Encapsulated *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Isolated from Scandinavian Ropy Sour Milk, "viili".", *Animal Sci. Technol.*, 62, 277-283, 1991.
96. Calazans G. M. T., Lopes C. E., Lima R. M. O. C., de Franc FP., "Antitumor Activities of Levans Produced by *Zymomonas mobilis* Strains", *Biotechnol Lett*, 19, 19-21, 1997.
97. Margaritis A., Pace G. W., Microbial Polysaccharides. In: Blanch H. W., Drew S., Wang D. I. C., editors, *Comprehensive Biotechnology*, vol. 3. The Practice of Biotechnology: Current Commodity Products. Oxford: Pergamon Pres., 1005-44, 1985.
98. Sutherland I.W., "Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides", Cambridge University Press, Cambridge, 1990.
99. Nakajima H., Y. Suzuki, H. Kaizu, and T. Hirota, "Cholesterol Lowering Activity Of Ropy Fermented Milk", *J. Food. Sci*, 57, 1327-1329, 1992.
100. Lee I.Y., Seo W. T., Kim G. J., Kim M. K., Ahn S. G., Kwon G. S., Park Y. H., "Optimization of Fermentation Conditions for Production of Exopolysaccharide by *Bacillus polymyxa*", *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 16/2, 71-75, 1997.
101. Boels, C.I. Kranenburg, R.V., Hugenholtz, J., Kleerebezem, M., Vos, W.M.D., "Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria", *International Dairy Journal*, 11, 723-732, 2001.
102. Sutherland I. W., p. Extracellular Polysaccharides. In: Rehm H. J., Reed G., editors. *Biotechnology*, Weinheim VCH., 6, 615-57, 1996.
103. Wasser S. P., "Medicinal Mushrooms as a Source of Antitumor and Immunomodulating Polysaccharides", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60, 258-274, 2002.

- 104.Hosono A. J., Lee A., Ametani M., Natsume M., Hirayama T., Adachi and S. Kaminogawa, “Characterization of a Water-Soluble Polysaccharide Fraction With Immunopotentiating Activity from *Bifidobacterium adolescentis* M101-4”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61, 312-316, 1997.
- 105.Kumar, T., “Microbial extracellular polymeric substances production, isolation and applications”, *IOSR Journal of Pharmacy*, 2 (2), 276-281, 2012.
- 106.Nandal, K. Sehwat, A.R., Yadav, A.S., Vashishat, R.K., Boora, K.S. “High temperature-induced changes in exopolysaccharides, lipopolysaccharides and protein profile of heat-resistant mutants of *Rhizobium* subsp. (Cajanus)”, *Microbiological Research*, 160, 367-373, 2005.
- 107.Murray, R.G.E., Holt, J. G., “Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., vol. 5”, Springer-Verlag, New York, 2001.
- 108.Dan Li, Jiayi Li, Feng Zhao, Guohong Wang, Qianqian Qin, Yanling Hao. “The influence of fermentation condition on production and molecular mass of EPS produced by *Streptococcus thermophilus* 05-34 in milk-based medium”, *Food Chemistry*, 197:367-372, 2016.
- 109.Wei Li, Mahinur Mutuvulla, Xiaohong Chen, Mei Jiang, Mingsheng Dong., “Isolation and identification of high viscosity-producing lactic acid bacteria from a traditional fermented milk in Xinjiang and its role in fermentation process”, *Eur Food Res Technol*, 235:497-505, 2012.
- 110.Chengcheng Li, Wei Li, Xiaohong Chen, Meiqin Feng, Xin Rui, Mei Jiang, Mingsheng Dong., “Microbiological, physicochemical and rheological properties of fermented soymilk produced with exopolysaccharide (EPS) producing lactic acid bacteria strains”, *LWT-Food Science and Technology*, 57: 477-485, 2014.
- 111.Petra Kson zekova, Peter Bystricky, Silvia Vlckova, Vladimir Patoprsty, Lucia Pulzova, Dagmar Mudronova, Terezia Kuboskova, Tomas Csank, Ludmila Tkacikova, “Exopolysaccharides of *Lactobacillus reuteri*: Their influence on adherence of *E. Coli* to epithelial cells and inflammatory response”, *Carbohydrate Polymers*, 141:10-19, 2016.
- 112.OECD (Organization for the Economic Cooperation and Development), ‘OECD Guideline for testing of chemical: Alga, growth inhibition test’, 1984.

113. APHA, AWWA, WPCF, "Standard Methods for the examination of water and wastewater", Washington, 1971.
- 114.115 . 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.
115. Collier, L., Balow, A., Sussman, M., "Topley & Wilson's Microbiology and Microbiol Infections", *Systematic Bacteriology*, 9th edition, 2: 1091-1118, 1998.
116. 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.
117. 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.
118. Schlegel, H. 'Produktion Sekundärer Metabolite', *Allgemeine Mikrobiologie, Georg-Thieme V. Erlags* 362-371, 1992.
119. 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.
120. Leisinger, T., and Margraff, R., "Secondary Metabolites of The Fluorescent Pseudomonads", *Microbiol. Rev.*, 43: 422-442, 1979.
121. Ozturk S., Aslim B., Suludere Z., Tan S., "Metal removal of cyanobacterial exopolysaccharides by uronic acid content and monosaccharide composition", *Carbohydrate Polymers* 101, 265-271, 2014.
122. Sutherland I. W., "Novel and Established Applications of Microbial Polysaccharides", *Trends Biotechnol.*, 16: 41-46, 1998.
123. Yurlova, N, A. and de Hoog, G, S., "A New Variety of *Aureobasidium pullulans* Characterized by Exopolysaccharide Structure, Nutritional Physiology and Molecular Features", *Antonie van Leeuwenhoek* 72: 141-147, 1997.
124. Saeed, A., Iqbal, M., "Immobilization of blue green microalgae on loofa sponge to biosorb cadmium in repeated shake flask batch and continuous flow fixed bed column reactor system", *World J. Microb. Biot.*, 22: 775-782, 2006.

- 125.Reddy, K.J., Soper, B.W., Tang, J., Bradley, R.L., “Phenotypic variation in exopolysaccharide production in the marine, aerobic nitrogen fixing unicellular cyanobacterium *Cyanothece* sp.”, *World J. Microb. Biot.*, 12, 311-318, 1996.
- 126.Singh, N., Asthana, R.K., Kayastha, A.M., Pandey, S., Chaudhary, A.K., Singh, S.P., “Thiol and exopolysaccharide production in a cyanobacterium under heavy metal stress”, *Process Biochem.*, 35, 63-68, 1999.
- 127.Zhang, X., Bishop, P.L., Kinkle, B.K., “Comparison of Extraction Methods for Quantifying Extracellular Polymers in Biofilms”, *Wat Sci Tech*, 39, 211-218, 1999.
- 128.Yılmaz, E., ‘‘Siyanobakterlerle ağır metal giderimi ve bunu etkileyen faktörlerin araştırılması’’, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Doktora Tezi, Ankara. 2009.
- 129.Philippis, R.D., Sili, C., Paperi, R., Vincenzini, M., “EPS-producing cyanobacteria and their possible exploitation: A review”, *J. of App. Phycology*, 13, 293-299, 2001.
- 130.Fett, W.F. Wells, J.M. Cescutti, P. and Wijey, C. “Identification of Exopolysaccharides Produced by Fluorescent Pseudomonads Associated with Commercial Mushroom (*Agaricus bisporus*) Production”, *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 513-517, 1995.
- 131.Öztürk, S., Aslim, B., “Relationship between chromium(VI) resistance and extracellular polymeric substances (EPS) concentration by some cyanobacterial isolates”, *Environ. Mic.*, 15, 478–480, 2008.
- 132.Kazy, S.K., Sar, P., Singh, S.P., Sen, A.K., D’Souza, S.F., “Extracellular polysaccharides of a copper-sensitive and copper-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain: synthesis, chemical nature and copper binding”, *World J. Microb. Biot.*, 18, 583-588, 2002.
- 133.Kılıç, N.K., Dönmez, G., “Environmental conditions affecting exopolysaccharide production by *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus* sp., and *Ochrobactrum* sp.”, *J of Hazardous Mat.*, 12, 154-160, 2007.
- 134.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”, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Doktora Tezi, Ankara, 2008.

- 135.Şahlan Öztürk, Belma Aslım, “Modification of exopolysaccharide (EPS) composition and production by three cyanobacterial isolates under salt stress”, *Environmental Science and Pollution Research* , Sayı:17, Sayfalar:595-602, 2010,
- 136.Panwichian S. , Kantachote D. , Wittayaweerasak B. , Mallavarapu M. , 2011, “Removal of heavy metals by exopolymeric substances produced by resistant purple nonsulfur bacteria isolated from contaminated shrimp ponds” , *Environmental Biotechnology*, Vol. 14 No. 4 , s.1-8, 2011.
- 137.Priester J. H. , Olson S. G., Webb S. M., Neu M., P., Hersman L., E., Holden P., A., “Enhanced Exopolymer Production and Chromium Stabilization in *Pseudomonas putida* Unsaturated Bifilms”, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72, No. 3 P. 1988-1996, 2006.
- 138.Roberson, E.B., Firestone, M.K., “Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp.”, *Appl. Environ. Microb.* 58: 1284–1291, 1992.
- 139.Sharma, M., Kaushik, A., Somvir, Bala., K., Karma, A., “Sequestration of chromium by exopolysaccharides of *Nostoc* and *Gleocapsa* from dilute aqueous solutions”, *J. of Hazard. Mat.*, 157, 315-318, 2008.
- 140.Kalantari, N., “Evaluation of toxicity of iron, chromium and cadmium on *Bacillus cereus* growth”, *Iranian J. Basic Med. Sci.*, 10 (4): 222-228, 2008.
- 141.Yamini, H., Shrivastava, S., Devaraj, N., Balachandran, U. N., “A schiff base complex of chromium(III): an efficient inhibitor for the pathogenic and invasive potential of *Shigella dysenteriae*”, *J. Inorg. Biochem.*, 98: 387-392, 2004.
- 142.Simonet, M., Berche, P., Fauchere, J. L., Veron, M., “Impaired resistance to *Listeria monocytogenes* in mice chronically exposed to cadmium”, *Immunology*, 53: 155-163, 1984.
- 143.Solioz, M., Nakamura, R., Pan-Hou, H., Sato, M. H., Itoh, T., Kiyono, M., “Response of Gram-positive bacteria to copper stress”, *J Biol Inorg Chem*, 15, 3-14, 2010.

144. Gaetke, L. M., Chow, C. K., "Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients", *Toxicology*, 189, 147-163, 2003.
145. German, N., Doyscher, D., Rensing, C., "Bacterial killing in macrophages and amoeba: do they all use a brass dagger?", *Future Microbial*, 8, 1257-1264, 2013.
146. Brouwers, G. J., E., Vijgenboom, P. L. A. M., Corstjens, J. P. M., de Vrind, and E. W. de Vrind-de Jong, "Bacterial Mn²⁺ oxidizing systems and multicopper oxidases: an overview of mechanisms and functions", *Geomicrobiology*, 17:1-24, 2000.

ÖZGEÇMİŞ

Süleyman YALÇIN 1988 yılında Giresun'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Ordu'da tamamladı. 2005'de kazandığı Konya Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2009 yılında mezun oldu. 2015 yılında Nevşehir Halk Sağlığı Laboratuvarına biyolog olarak atandı. Halen aynı görevine devam etmektedir

Adres: Nevşehir Halk Sağlığı Laboratuvarı 15 Temmuz Mahallesi Devlet Hastanesi
yanı Merkez/NEVŞEHİR

Telefon: 0 530 388 11 01

e-posta : slymn_yalcin@hotmail.com