

**Metal Tolerant Aktinomiset İzolatlarının
Eldesi, Karakterizasyonu ve
Ağır Metal Giderimi**

Ayşe Betül Karaduman

YÜKSEK LİSANS

Biyoloji Anabilim Dalı

Mart 2008

**Isolation, Characterization and
Metal Biosorption of
Metal Tolerant Actinomycetes**

Ayşe Betül Karaduman

**Master of Science Thesis
Department of Biology**

March 2008

**Metal Tolerant Aktinomiset İzolatlarının
Eldesi, Karakterizasyonu ve
Ağır Metal Giderimi**

Ayşe Betül Karaduman

**Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.**

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ

Mart 2008

Ayşe Betül Karaduman' ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Metal Tolerant Aktinomiset İzolatlarının Eldesi, Karakterizasyonu ve Ağır Metal Giderimi” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

03 / 03 / 2008

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ

Üye : Prof. Dr. A. Üsame TAMER

Üye : Doç. Dr. Semra İLHAN

Üye : Doç. Dr. Tamer AKAR

Üye : Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun/...../..... gün ve
...../..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Abdurrahman KARAMANCIOĞLU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu çalışmada metal ile kirletilmiş ortamlardan izole edilen aktinomiset izolatlarının metal tolerans ve biyosorpsiyon yeteneği belirlenmiştir. Daha sonra istatistiksel hesaplarla tolerans ve biyosorpsiyon arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. Farklı tolerans yeteneğine sahip izolatların nümerik taksonomik, en iyi biyosorpsiyon yeteneğine sahip izolatın ise kemotaksonomik sınıflandırılması yapılmıştır.

Çalışmamızda toplam 42 lokalite olmak üzere metal ile kirletilmiş toprak ve sediment örneklerinden 135 aktinomiset izolatı elde edilmiştir. Bu izolatlar 8 ağır metalin (nikel, kobalt, çinko, bakır, demir, kadmiyum, kurşun, civa) 5' er konsantrasyonuna karşı kalitatif, yarı kantitatif ve kantitatif yöntemler kullanılarak metal toleransı açısından test edilmiştir. Daha sonra farklı derecede tolerant olan 18 izolat seçilip kurşuna karşı biyosorpsiyon yetenekleri araştırılmış ve tolerans ile biyosorpsiyon arasında bir ilişki olup olmadığına bakılmıştır. Aktinomiset izolatlarının metal toleransı ile biyosorpsiyon arasında bir ilişkinin olmadığı kanısına varılmıştır. Biyosorpsiyon aşamasında en iyi sonuç veren 723 kodlu izolatın biyosorpsiyon yeteneğinin kesikli ve sürekli sistemlerde optimum koşulları belirlenmiştir. Belirlenen optimum koşullar göz önüne alınarak 723 kodlu izolat, daha büyük ölçekte biyosorpsiyon performansı belirlenmesi amacıyla akışkan reaktör sisteminde test edilmiştir. Bu aşamada 723 kodlu izolatın biyosorpsiyon kapasitesi ve uzun süre kararlı kalması dikkat çekicidir. Çalışma sonunda ise farklı tolerans yeteneğine sahip 16 izolatın nümerik taksonomik, 723 kodlu izolatın aynı zamanda kemotaksonomik özellikleri de belirlenmiştir. Çalışmamızda yeni tür olabilecek *Streptomyces* izolatları elde edilmiş ve biyoremediasyon amacıyla kullanılacak aktinomiset izolatları tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Aktinomiset, Metal toleransı, Biyosorpsiyon

SUMMARY

In this study, metal tolerance and biosorption ability of actinomycetes strains from environment polluted with metal is determined. After that, whether there is a relation between tolerance and biosorption or not is investigated via statistical calculations. The strains having different tolerance ability are classified as numeric taxonomic and strains having the best biosorption ability was chemotaxonomically classified.

In this research, 135 actinomycetes strains were isolated from soil and sediment samples polluted with metals. These strains were tested in terms of metal tolerant in solid and liquid media with 5 concentrations of 8 heavy metals (nickel, cobalt, zinc, copper, iron, cadmium, lead, mercury). Then, biosorption ability researches were performed 18 metal tolerant having different degrees and whether there is a connection between tolerance and biosorption was examined. Actinomycetes strains do not have any relation with biosorption, which is obtained result from that experiment. Optimum conditions of strain with the 723 code which have the best performance on the process of biosorption ability are determined in batch and packed-bed columns. Considering the optimum conditions determined, strain 723 was tested in continuous-flow stirred reactors to determine the biosorption performance in bigger volume. In this process, biosorption capacity and stability of strain 723 was remarkable. At the end of the study, 16 strains having different tolerant ability are determined numeric taxonomic and strain 723 has not only numeric taxonomic but it has also chemotaxonomic features. As a result, *Streptomyces* strains can be new species were isolated and actinomycetes strains which can be used for the aim of bioremediation were determined.

Keywords: Actinomycetes, Metal tolerance, Biosorption

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince hiçbir zaman desteğini benden esirgemeyen ve değerli bilgileriyle çalışmama yön veren danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ' a sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim.

Lisans ve yüksek lisans süresince bana sürekli destek olan ve yardıma ihtiyacım olduğunda beni hiç yalnız bırakmayan hocalarım Dr. Gökhan BAYRAMOĞLU ve Dr. Hakan ŞENTÜRK' e teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca maddi ve manevi desteğini bana hissettiren hocalarım Dr. Sevil PİLATİN ve Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU' na, biyosorpsiyon aşamasındaki yardımlarından ötürü Doç. Dr. Sibel AKAR, Doç. Dr. Tamer AKAR ve Yrd. Doç. Dr. Ahmet ÇABUK' a, yardımlarından ötürü Dr. İsmühan POTOĞLU ERKARA ve Doç. Dr. Semra İLHAN' a teşekkür ederim.

Çalışmamın deneysel sürecinde sonsuz iyilik anlayışıyla beni yalnız bırakmayan ve her yönden göstermiş oldukları ilgi için arkadaşlarım Nagehan TEKNECİ, Burcu ALTINAY ve Zerrin KAYNAK' a, deneylerime gece-gündüz demeden ellerinden geldiğince katılan diğer bütün çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Biyosorpsiyon ve tolerans arasında bir ilişki olup olmadığını istatistiksel hesaplamalarla bir sonuca bağlayan Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, İstatistik Bölümü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Zeki YILDIZ' a, nümerik taksonomi çalışması sonucunda elde edilen verileri ilgili bilgisayar programlarını kullanarak değerlendiren Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Nevzat ŞAHİN ve Yrd. Doç. Dr. Kamil IŞIK' a yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Son olarak hayatımın başlangıcından bugüne gelmemi sağlayan, benden hiçbir şekilde desteğini esirgemeyen ve her ne olursa olsun sonsuz hoşgörü ve özverileriyle hep yanımda olan, bütün başarılarımın mimarı sevgili annem, babam ve kardeşime teşekkürü borç bilirim.

Bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenen 200419014 kodlu “Porsuk Nehir Sistemi’nden ve Çevredeki Kirli Topraklardan Metal Tolerant Aktinomiset İzolatlarının Eldesi, Karakterizasyonu ve Ağır Metal Giderimi” konulu araştırma projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Ayşe Betül KARADUMAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Ağır Metaller ve Kurşun.....	4
1.2. Metallerin Ekosistem ve Canlılar Üzerine Etkileri	5
1.3. Biyosorpsiyon.....	8
1.3.1. Biyosorpsiyon mekanizmaları.....	9
1.3.2. Biyosorpsiyon amacı ile kullanılan mikroorganizmalar.....	10
1.3.3. Aktinomisetler ve metal biyosorpsiyonu	10
2. MATERYAL ve METODLAR	14
2.1. Materyal	14
2.1.1. Besiyerleri.....	14
2.1.2. Çözeltiler ve diğer kimyasal maddeler.....	24
2.2. Metodlar	27
2.2.1. Metale dirençli aktinomiset izolatlarının eldesi	27
2.2.1.1. Örnekleme için lokalite seçimi.....	27
2.2.1.2. İzolasyon çalışmaları.....	32
2.2.1.3. Aktinomiset izolatlarının korunması.....	32
2.2.2. İzolatların çeşitli metallere olan direncinin katı ve sıvı besi ortamlarında belirlenmesi.....	33
2.2.2.1. Metal direncinin kalitatif tayini.....	33
2.2.2.2. Metal direncinin yarı kantitatif tayini.....	34
2.2.2.3. Metal direncinin kantitatif tayini.....	34
2.2.3. Metal direncinin biyosorpsiyon ile ilişkisinin belirlenmesi.....	35
2.2.4. Seçilen bir aktinomiset izolatı ile kurşun biyosorpsiyonunun optimizasyonu	36
2.2.4.1. Biyosorbentin ve metal çözeltilerinin hazırlanması.....	36
2.2.4.2. Batch (Kesikli sistem) kurşun (Pb ²⁺) biyosorpsiyonu.....	37
2.2.4.3. Sıkıştırılmış yatak kolonda (Sürekli sistem) kurşun (Pb ²⁺) biyosorpsiyonu.....	39

İÇİNDEKİLER (devam)

	Sayfa No
2.2.4.4. Akışkan reaktör sisteminde (CFST) kurşun (Pb^{2+}) biyosorpsiyonu.....	40
2.2.5. Metal direncine ve/veya yüksek biyosorpsiyon kapasitesine sahip izolatların kemotaksonomik ve nümerik metodlarla identifikasyonu.....	41
2.2.5.1. Aktinomiset izolatlarının kemotaksonomik özellikleri.....	41
2.2.5.1.1. Hücrelerin çoğaltılması ve analize hazırlanması.....	42
2.2.5.1.2. İnce tabaka kromatografisi (İTK).....	42
2.2.5.2. Aktinomiset izolatlarının nümerik taksonomisi.....	43
2.2.5.2.1. İzolatların renk gruplarının belirlenmesi.....	43
2.2.5.2.2. Nümerik taksonomi testleri.....	43
1. Degradasyon testleri.....	44
2. Biyokimyasal testler.....	48
3. Beslenme testleri.....	51
4. Fizyolojik testler.....	54
5. Antimikrobiyal aktivite testleri.....	58
6. Morfoloji ve pigmentasyon.....	59
2.2.5.2.3. Nümerik testlerden elde edilen verilerin istatistiksel analizi.....	62
3. BULGULAR.....	63
3.1. Metale Dirençli Aktinomiset İzolatlarının Eldesi	63
3.2. İzolatların Çeşitli Metallere Olan Direncinin Katı ve Sıvı Besi Ortamlarında Belirlenmesi.....	67
3.2.1. Metal direncinin kalitatif tayini.....	67
3.2.2. Metal direncinin yarı kantitatif tayini	81
3.2.3. Metal direncinin kantitatif tayini.....	89
3.3. Metal Direncinin Biyosorpsiyon ile İlişkisinin Belirlenmesi.....	91
3.4. Seçilen Bir Aktinomiset İzolatının Biyosorpsiyonda Kullanımı.....	92
3.4.1. Batch (Kesikli sistem) kurşun (Pb^{2+}) biyosorpsiyonu.....	92
3.4.2. Sıkıştırılmış yatak kolonda (Sürekli sistem) kurşun (Pb^{2+}) biyosorpsiyonu.....	95
3.4.3. Akışkan reaktör sisteminde (CFST) kurşun (Pb^{2+}) biyosorpsiyonu.....	100
3.5. Metal Direncine ve/veya Yüksek Biyosorpsiyon Kapasitesine Sahip İzolatların Kemotaksonomik ve Nümerik Metodlarla İdentifikasyonu.....	101
3.5.1. Aktinomiset izolatlarının kemotaksonomik özellikleri.....	101
3.5.2. Aktinomiset izolatlarının nümerik taksonomisi.....	102

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa No

3.5.2.1. İzolatların renk gruplarının belirlenmesi.....	102
3.5.2.2. Nümerik testlerden elde edilen verilerin istatistiksel analizi.....	110
4. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	113
4.1. Metale Dirençli Aktinomiset İzolatlarının Eldesi.....	114
4.2. İzolatların Çeşitli Metallere Olan Direncinin Katı ve Sıvı Besi Ortamlarında Belirlenmesi.....	115
4.2.1. Kalitatif metal direnç tayini.....	115
4.2.2. Yarı kantitatif metal direnç tayini.....	116
4.2.3. Kantitatif metal direnç tayini.....	117
4.3. Metal Direncinin Biyosorpsiyon İle İlişkinin Belirlenmesi.....	118
4.4. Seçilen Bir Aktinomiset İzolatının Biyosorpsiyonda Kullanımı.....	119
4.4.1. Batch (Kesikli Sistem) kurşun (Pb^{2+}) biyosorpsiyonu.....	120
4.4.1.1. Biyosorpsiyona pH etkisi.....	120
4.4.1.2. Biyosorpsiyona biyosorbent konsantrasyonunun etkisi.....	120
4.4.1.3. Biyosorpsiyona temas süresinin etkisi.....	121
4.4.1.4. Biyosorpsiyona başlangıç Pb^{2+} iyonu konsantrasyonunun etkisi.....	121
4.4.2. Sıkıştırılmış yatak kolonda (Sürekli Sistem kurşun (Pb^{++}) biyosorpsiyonu.....	121
4.4.3. Akışkan reaktör sisteminde (CFST) kurşun (Pb^{2+}) biyosorpsiyonu.....	123
4.5. Metal Direncine ve/veya Yüksek Biyosorpsiyon Kapasitesine Sahip İzolatların Kemotaksonomik ve Nümerik Metodlarla İdentifikasyonu.....	124
4.5.1. Aktinomiset izolatlarının kemotaksonomik özellikleri.....	124
4.5.2. Aktinomiset izolatlarının nümerik taksonomisi.....	124
4.6. Sonuç.....	125
5. KAYNAKLAR.....	127

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Aktinomiset izolatları ile batch sistemde kurşun (Pb ²⁺) biyosorpsiyonu.....	38
Şekil 2.2. 723 kodlu izolat ile sıkıştırılmış yatak kolonda kurşun (Pb ²⁺) biyosorpsiyonu.....	40
Şekil 2.3. Aktinomiset izolatları ile reaktörde kurşun (Pb ²⁺) biyosorpsiyonu.....	41
Şekil 2.4. Multipoint inokülatör ile çoklu ekim yöntemi.....	45
Şekil 2.5. Hipoksantin degradasyonu sonucu koloni çevresinde oluşan renk açılımı.....	46
Şekil 2.6. İyot solüsyonu ilavesi ile belirlenen nişasta degradasyonu.....	47
Şekil 2.7. Koloni çevresinde oluşan opak zon ile belirlenen lesitinaz aktivitesi.....	48
Şekil 2.8. Nitrat redüksiyonu testi.....	50
Şekil 2.9. Hidrojen sülfür oluşumu testi.....	50
Şekil 2.10. Üre hidrolizi testi.....	51
Şekil 2.11. Aynı test suşlarının 2 farklı karbon kaynağında büyüme özellikleri.....	53
Şekil 2.12. Aynı test suşlarının azot kaynağı olarak Serin' i kullanma özellikleri.....	54
Şekil 2.13. Test suşlarının pH 9 da büyüme özellikleri.....	56
Şekil 2.14. Test suşlarının besi ortamında fenol varlığında büyüme özellikleri.....	56
Şekil 2.15. Test suşlarının besi ortamında potasyum tellürit varlığında büyüme özellikleri.....	57
Şekil 2.16. Aynı test suşlarının 2 farklı antibiyotik varlığında büyüme özellikleri.....	57
Şekil 2.17. Çeşitli test suşlarının <i>Micrococcus luteus</i> ' a karşı antimikrobiyal aktivitesi.....	59
Şekil 2.18. Bir aktinomiset izolatının İnorganik Tuz – Nişasta Agar (ISP 4) ortamında 14 günlük büyümesinde substrat ve havasal misel renkleri.....	60
Şekil 3.1. 1000 mg / l konsantrasyonda nikel içeren besi ortamında tolerans denemesi.....	67
Şekil 3.2. Nikel içeren besi ortamında MİK değerinin belirlenmesi.....	76
Şekil 3.3. Farklı kadmiyum (5–200 mg/l) ve bakır (10–1000 mg/l) konsantrasyonlarına karşı yarı kantitatif metal toleransı	82
Şekil 3.4. Kurşun (100 mg/l) varlığında 236 kodlu aktinomiset izolatının kantitatif metal toleransı.....	89
Şekil 3.5. 723 kodlu izolat ile Pb ²⁺ biyosorpsiyonuna başlangıç pH' ının etkisi ve biyosorpsiyon süresince pH değişimi.....	92
Şekil 3.6. pH'a bağlı olarak ortama salınan Na ⁺ ve K ⁺ iyonu derişimleri.....	93
Şekil 3.7. 723 kodlu izolat ile Pb ²⁺ biyosorpsiyonuna biyokütle konsantrasyonunun etkisi.....	93
Şekil 3.8. Zamanın fonksiyonu olarak 723 kodlu izolat ile Pb ²⁺ biyosorpsiyonu.....	94

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

	Sayfa No
Şekil 3.9. 723 kodlu izolat ile Pb ²⁺ biyosorpsiyonuna başlangıç metal iyonu konsantrasyonunun etkisi.....	94
Şekil 3.10. Sıkıştırılmış yatak kolonda 723 kodlu izolat ile Pb ²⁺ biyosorpsiyonuna kolon çapının etkisi.....	95
Şekil 3.11. Sıkıştırılmış yatak kolonda 723 kodlu izolat ile Pb ²⁺ biyosorpsiyonuna akış hızının etkisi.....	95
Şekil 3.12. Sıkıştırılmış yatak kolonda 723 kodlu izolat ile Pb ²⁺ biyosorpsiyonunun başlangıç metal iyonunun etkisi.....	96
Şekil 3.13. Kesikli sistem ve sıkıştırılmış yatak kolonda 723 kodlu izolat ile Pb ²⁺ biyosorpsiyonu için Freundlich izoterm grafiği.....	97
Şekil 3.14. Kesikli sistem ve sıkıştırılmış yatak kolonda 723 kodlu izolat ile Pb ²⁺ biyosorpsiyonu için Langmuir izoterm grafiği.....	97
Şekil 3.15. Kesikli sistem ve sıkıştırılmış yatak kolonda yaş ve kuru 723 kodlu izolatu ile Pb ²⁺ biyosorpsiyonu.....	98
Şekil 3.16. İmmobilize sistemlerin biyosorpsiyon kapasiteleri.....	99
Şekil 3.17. Farklı eluent çözeltileri ile Pb ²⁺ 'nin desorpsiyon verimleri.....	99
Şekil 3.18. İmmobilize biyosorbent sisteminin biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüsü.....	100
Şekil 3.19.. Akışkan reaktör sisteminde immobilize biyokütlenin Pb ²⁺ biyosorpsiyon verimi.....	101
Şekil 3.20. 723 kodlu aktinomiset izolatatının hücre çeperi DAP analiz sonucu.....	102
Şekil 3.21. Nümerik verilerin Simple matching coefficient (S _{SM}) ve Complete algorithm analizlerine göre, metaller ile kirlenmiş toprak örneklerinden izole edilen <i>Streptomyces</i> suşları ile tip türler arasındaki ilişkiyi gösteren dendrogram.....	112

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 1.1. Bazı enzimlerin kofaktör olarak ihtiyaç duydukları metal iyonları	3
Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan bazı kimyasal maddeler ve kullanım amaçları.....	26
Çizelge 2.2. Porsuk nehrinde örnek alınacak lokalitelerden alınan sediment örneklerinde varlığı belirlenen metaller ve miktarları.....	28
Çizelge 2.3. Örneklenen maden yataklarının lokaliteleri ve içerdiği bazı metallerin miktarı.....	29
Çizelge 2.4. Aktinomiset izolatların katı besiyerinde metal toleranslarının belirlenmesi amacı ile kullanılan metaller ve konsantrasyonları.....	34
Çizelge 2.5. Degradasyon testlerinde kullanılan substratlar ve konsantrasyonları.....	44
Çizelge 2.6. Karbon kaynağı testlerinde kullanılan substratlar ve konsantrasyonları.....	52
Çizelge 2.7. Azot kaynağı testlerinde kullanılan substratlar.....	53
Çizelge 2.8. Fizyolojik testlerde kullanılan inhibitör ve antibiyotikler ile konsantrasyonları.....	55
Çizelge 2.9. Test suşlarının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan test mikroorganizmaları.....	58
Çizelge 2.10. Aktinomiset izolatların tanılanması amacı ile kullanılan tip türler.....	61
Çizelge 2.11. Test hatasını belirlemek için kullanılan duplikatlar	62
Çizelge 3.1. Metalik madenler açısından zengin örneklerden elde edilen aktinomiset izolatları.....	64
Çizelge 3.2. Metal ile kirletilmiş ortamlardan izole edilen aktinomiset izolatlarının metal içeren katı besi ortamlarında büyüme durumları.....	68
Çizelge 3.3. Çeşitli metallerin metal ile kirletilmiş toprak/sediment örneklerinden elde edilen aktinomiset izolatlarına karşı minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri (mg/l).....	77
Çizelge 3.4. Aktinomiset izolatlarının kullanılan en yüksek metal konsantrasyonuna direnç oranları.....	81
Çizelge 3.5. Aktinomiset izolatlarının kullanılan ikinci en yüksek metal konsantrasyonuna direnç oranları.....	81
Çizelge 3.6. Metal ile kirletilmiş toprak/sediment örneklerinden elde edilen aktinomiset izolatlarına karşı çeşitli metallerin oluşturduğu inhibisyon zonları(mm).....	83
Çizelge 3.7. Aktinomiset izolatlarının metal içeren büyüme ortamında 7 günlük inkübasyon sırasında sağladıkları kuru hücre ağırlığı (mg).....	90
Çizelge 3.8. Aktinomiset izolatlarının metal içeren büyüme ortamında 7 günlük inkübasyon sırasında kontrole göre hücresel kitle artışı (%).....	90
Çizelge 3.9. Farklı metal toleransına sahip izolatların metal biyosorpsiyon kapasiteleri.....	91

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

	Sayfa No
Çizelge 3.10. Batch ve kolon sistemlerinde 723 kodlu izolat ile Pb ²⁺ biyosorpsiyonu için Langmuir ve Freundlich izoterm sabitleri.....	98
Çizelge 3.11. Nümerik taksonomik çalışmalarda kullanılmak üzere seçilen izolatların izole edildikleri lokalitelere göre dağılım.....	103
Çizelge 3 12. İzolatların Oat Meal Agar (ISP 3) besiyerinde oluşturdukları renk grupları.....	104
Çizelge 3 13. İzolatların İnorganik Tuz – Nişasta Agar (ISP 4) besiyerinde oluşturdukları renk grupları.....	107
Çizelge 3.14. İzole edilen aktinomiset izolatlarının ISP 4 besiyerlerinde spor zincir morfolojileri.....	110

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simge</u>	<u>Açıklama</u>
K_F	Freundlich adsorpsiyon izotermi katsayısı (l/g)
K_L	Langmuir izoterm sabiti (l/mol)
n	Freundlich izoterm sabiti
r^2	Regresyon katsayısı
R_L	Boyutsuz ayırma faktörü
rpm	Revaluation per minute (dakikadaki devir sayısı)
q	Adsorpsiyon kapasitesi(mg/g)
q_{max}	Maksimum tek tabakalı adsorpsiyon kapasitesi (mol/g)

1. GİRİŞ

Günümüzde Dünya nüfusunun hızlı artışı çeşitli çevre sorunlarının oluşmasına yol açmakta ve nüfus artışına bağlı olarak artan ihtiyaç ve talepler doğal kaynakların hızla tükenmesine neden olmaktadır. Bunun sonucunda doğal kaynakların insanlar tarafından işletilmesi ve düzenlenmesi bir süre sonra var olan doğal dengenin bozulmasına yol açmakta ve çeşitli çevre sorunları ortaya çıkmaktadır.

Canlılar ve çevre arasındaki etkileşim 4 aşamada özetlenmiştir. Bu aşamalar;

1. Çeşitli kirleticilerin doğal ortamlara veya ekosistemlere alım gücünden fazla yüklenerek çevre kirliliğinin oluşturulması,
2. Yaşam ortamlarındaki kirleticilerden etkilenerek canlıların çeşitli hastalıklara yakalanması ve bir kısım bireyin ölmesi,
3. Kirliliğin aşırı ilerlemesi halinde hassas canlı türlerinin yok olarak nesillerinin tükenmesi,
4. Ekosistemleri oluşturan birçok canlı türünün neslinin tükenmesiyle, ekosistemlerin fonksiyonel gerilemesi ve zamanla yok olması, şeklinde sıralanabilir (Sağ, 2002).

Ekosistemdeki denge için en çok tehlike oluşturan unsur; çevre kirliliğidir. Kirliliğe neden olan zararlı maddeleri bazı araştırmacılar 3 grup altında toplamışlardır:

1. Biyolojik bakımdan ayrıştırılabilenler; kanalizasyon suları ve organik maddelerden oluşan çöpler.
2. Ayrıştırılmayan maddeler; çöplerdeki metaller, cam maddeler, sentetik maddeler ve deterjanlar.
3. Zehirler; gazlar, ağır metaller, pestisitler, radyoaktif maddeler (Sağ, 2002).

Bu kirleticilerden en önem kazananları ise doğada uzun süre bozunmadan kalabilen ve canlılara doğrudan veya besin zinciri aracılığıyla zarar verenlerdir. Ağır metal kirliliği, canlılarda hem doğrudan hem de besin zinciri aracılığıyla telafisi neredeyse imkansız tahribat yaratan bir kirlilik tipidir. Ağır metaller endüstrilemiş ülkelerde toprak ve suların önemli ölçüde kirlenmesine neden olmaktadır. Yoğun endüstriyel kullanım, kadmiyum, kurşun, civa, bakır, nikel, krom ve demir gibi yüksek toksisiteye sahip metallerin çevrede doğal jeokimyasal döngülerin tolere edebileceğinden yüksek oranda birikmesine neden olmaktadır.

Metaller zaman zaman bazı sorunlar teşkil etseler de doğanın bir parçasıdır. Çeşitli nedenlerle, doğal veya doğal olmayan yollarla buldukları ortamlarda yüksek konsantrasyonlara ulaşabilirler. Canlılar için metallerin yüksek konsantrasyonları toksik etkilere yol açarken, bazılarının düşük konsantrasyonları mikroorganizmalar ve tüm canlılık için hayati önem taşır.

Metaller, birçok biyokimyasal tepkime için kritik bileşenlerdirler. Sodyum (Na^+), potasyum (K^+), kalsiyum (Ca^{2+}) ve magnezyum (Mg^{2+}) gibi daha hafif metaller enzimlerin kofaktörleri olarak kullanılmanın yanı sıra oksidatif fosforilasyon ve osmotik denge sağlanması gibi olaylarda hücre için büyük önem taşırlar. Biyolojik sistemler bazı ağır metallerin düşük konsantrasyonlarına da büyüme ve metabolik fonksiyonları için gereksinim duyarlar. Örneğin, mikroorganizmalar gelişimleri sırasında çevrelerinden bakır (Cu), çinko (Zn), demir (Fe), nikel (Ni), mangan (Mn) ve kobalt (Co) gibi metalleri alarak bünyelerinde biriktirirler. Esansiyel miktardaki bu metaller birçok proteinin prostetik grubu olarak ve enzimlerin aktif kısımlarının yapımında, bazı enzimatik reaksiyonlarda kofaktör olarak, porfirinlerde merkez olarak ve hücre içinde önemli redoks tepkimelerinde iş görürler (Çizelge 1.1) (Mills, 1997).

Yaşam standartlarının giderek yükselmesi nedeniyle insanların gereksinimleri artmıştır. Teknolojinin hızlı ilerlemesi bu gereksinimlerin daha kolay karşılanmasını sağlarken aynı zamanda bazı çevre sorunlarını da beraberinde getirmiştir. Bu nedenle metaller doğal bulunma nedenlerinin dışında farklı sebeplerle de karşımıza çıkmakta ve daha yüksek konsantrasyonlara ulaşmaktadırlar. Önemli derecede toksisiteye sahip olan bazı metaller ve kullanım alanlarına örnek verecek olursak, Arsenik; bakır, çinko, kurşun gibi madenlerin arıtımı, cam yapımı ve pestisit üretimi sırasında, boyalarda, fare zehirlerinde, fungusitlerde, ahşap koruyucularda bulunmaktadır. Kurşun; pestisitlerde, kurşun kalemlerde ve pillerde kullanılmaktadır. Civa; pestisitlerde katalizör olarak ve yosun öldürücülerde kullanılır, volkanik emisyonların yerküre kabuğundan buharlaşması ile doğal olarak çevreye yayılır. Bakteriler civayı organometalik civa kompleksleri haline dönüştürür ki metil-Hg oldukça yüksek toksisiteye sahiptir (<http://www.atal.tubitak.gov.tr/istanbul/DenizSarica.pdf>).

Çizelge 1.1. Bazı enzimlerin kofaktör olarak ihtiyaç duydukları metal iyonları (Lehninger, 1993)

İyon	Enzim adı
Zn ²⁺	Alkol dehidrogenaz
	Karbonik anhidraz
	Karboksipeptidaz
Mg ²⁺	Fosfohidrolaz
	Fosfotransferaz
	Hekzokinaz
Mn ²⁺	Arjinaz
	Fosfotransferaz
Fe ²⁺ ya da Fe ³⁺	Sitokromlar
	Peroksidaz
	Katalaz
	Ferrodoksin
Cu ²⁺ (Cu ⁺)	Tirozinaz
	Sitokrom oksidaz
K ⁺	Pirüvat fosfokinaz (aynı zamanda Mg ²⁺ a da ihtiyaç duyar)
Na ⁺	Membrana bağlı ATPaz (aynı zamanda Mg ²⁺ ve K ⁺ a da gereksinim duyar)
Co ²⁺ (Co ⁺)	Kobalamin (Vitamin B ₁₂)
Mo ⁴⁺ (Mo ⁵⁺)	Azot fiksasyonu
	Nitrat redüksiyonu

Kadmiyum endüstride, koruyucu çelik levha yapımında, PVC stabilizasyonunda, plastik ve camların içinde pigment olarak, nikel-kadmiyum bataryalarında elektrot malzemeleri olarak ve çeşitli alaşımların bileşiminde kullanılır (Akar, 2001).

Kobaltın kullanım alanları; seramik ve cam sanayilerinde (kobalt silikat), boyacılıkta kurutma maddesi olarak, sırlamada, sırrın daha iyi yapışması için (kobalt oksit), yüksek sıcaklığa dayanıklı alaşımların, yarı iletkenlerin, manyetik alaşımların yapımı gibi amaçlar için gerekli olması nedeniyle oldukça geniştir. Kobalt tuzları

yüksek oranda renk potansiyeline sahip olduklarından eski zamanlardan beri pigment üretiminde kullanılmaktadır (Akar, 2001).

Nikel, paslanmaz çelik üretimi, çimento imalatı, nikel alaşımları ve nikel levhalar, taşıtlar, makineler, silahlar, el aletleri, elektrik malzemeleri, ev cihazları ve madeni para üretiminde, nikel bileşikleri ise pillerde kullanılır (Akar, 2001).

Ağır metal kirliliği içeren atık su kaynakları başlıca üç endüstriden gelir: Maden endüstrisi, metal endüstrileri ve sanayi kuruluşları. Zehirleyici özelliklerine rağmen taşıdıkları teknolojik önem nedeniyle ağır metaller, endüstride geniş ölçüde kullanılmakta ve endüstriyel atıklardan belli miktarlar besin zincirine girmektedir (Kılıçarslan, 1999).

1.1. Ağır Metaller ve Kurşun

Metaller kimyasal olarak periyodik tablonun sol kısmında bulunan alkali ve toprak alkali grupları (1A ve 2A) ve geçiş metalleri (2B ve 3B) içerir. Aynı periyot içinde kıyaslandığında daha ağır metaller 3A ve 6A grupları arasında yer alır ve bu kısım özellikle alüminyum (Al), germanyum (Ge), antimon (Sb) ve polonyum (Po)' a da izin verir. Tablonun daha sağında yer alan elementler metal olarak değerlendirilmez. Bu kısımda çevrede az miktarda bulunan selenyum (Se) ve arsenik (As) ise metal olmamalarına rağmen sıklıkla ağır metallere birlikte düşünülür. Çevreyi olumsuz biçimde etkileyen genel ağır metallere örnek olarak; kadmiyum (Cd), krom (Cr), kobalt (Co), bakır (Cu), kurşun (Pb), civa (Hg), nikel (Ni), gümüş (Ag), kalay (Sn), çinko (Zn) verilebilir (Mills, 1997).

Kurşunun atom ağırlığı 207.19 g/mol, atom numarası 82, kaynama noktası 1750 °C, erime noktası 327.5 °C ve yoğunluğu 11.4 g/ml' dir. İzotopları ilk keşfedilen elementtir. Büyük ölçüde uranyumun radyoaktif bozulma ürünü olarak oluşur.

Kurşun mavimsi gri renkte bir ağır metaldir. Anorganik kurşun tuzlarının bir kısmı (asetat, nitrat tuzları gibi) suda çözüldüğü halde, bir kısmı (kurşun sülfat) suda çözünmez. Organik kurşun bileşiklerinden, alkil kurşun bileşikleri lipofilik olup toksikolojik açıdan önem taşırlar (Döner Dedeoğlu, 2000).

Kurşunun endüstrideki kullanım alanı oldukça geniştir. Başlıca otomobil endüstrisinde ve otomobil akümülatörlerinin yapımında, kablo kaplanmasında, matbaa

harflerinin dökümünde, lehim yapımında, yatak metalleri dökümünde, silah yapımında, metalik levha yapımında, kimyasal madde elde edilmesinde, porselen ve seramik sanayisinde kullanılır (Kılıçarslan, 1999).

Kurşun madenleri ve metal endüstrileri, akü ve pil fabrikaları, petrol rafinerileri, boya endüstrisi ve patlayıcı sanayi atıksularında da istenmeyen derişimlerde kurşun kirliliğine rastlanır. Pil fabrikası atıksularında 5-66 mg/l, asidik maden drenajlarında 0.02-2.5 mg/l, tetra etil kurşun üreten fabrika atık sularında 125-150 mg/l organik, 66-85 mg/l inorganik kurşun kirliliğine rastlanmıştır. Kurşun hava, su, toprak yoluyla, solunumla ve besinlere karışarak biyolojik sistemleri etkiler (Kılıçarslan, 1999).

Kurşun zehirlenmesinde en çok etkilenen organlar beyin, periferik sinir sistemi, böbrekler ve kemik iliğidir. Kurşunun en önemli toksik etkisi “hematopoitik sistem” (kan hücrelerinin oluşmasıyla ilgili sistem) üzerinedir. Kurşun eritrositlerle ekstrasellüler sıvı arasındaki su-elektrolit alış-verişini bozarak eritrositlerin su ve K⁺ kaybetmesine neden olur. Eritrositlerin zar bütünlüğü bozulur, parçalanması kolaylaşır ve hemoliz anemi oluşur. Kurşun ayrıca hem biyosentezini etkiler (Çabuk, 2001).

1.2. Metallerin Ekosistem ve Canlılar Üzerine Etkileri

Ağır metal kirliliği, endüstriyel aktivitenin yoğunluğuna bağlı olarak dünya çapında sorun olduğu düşünölen bir kirlilik tipidir. Yoğun endüstriyel kullanım, kadmiyum, kurşun, civa, bakır, nikel, krom ve demir gibi yüksek toksisiteye sahip metallerin doğal jeokimyasal döngülerin tolere edebileceğinden yüksek oranda birikmesine neden olmaktadır (Nriagu and Pacyma, 1988). Metaller ekosistemde yüksek konsantrasyonlara ulaştıklarında enzim inhibisyonuna neden olduklarından dolayı tüm canlılık için büyük bir tehlikedir ve kontrol altında tutulması gerekir. İnsanda metaller normal dozu aşacak olursa doku ve organ harabiyeti (özellikle böbrek, karaciğer ve beyin), genetik olarak bir sonraki nesilde ortaya çıkabilecek veya Menkes ve Wilson sendromları gibi metabolizma bozukluklarına neden olur (Silver and Phung, 1996). Bunun yanında küçük yaştaki çocukların uzun süre kurşun kirliliğine maruz kalması sonucu nörolojik kusurlar oluşması, morfolojik kalıtsal bozuklukların ortaya çıkması gibi sorunlarla karşılaşılabilir. Deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalarda doğmamış ceninin, doğanlar ve çocuk beyinlerine oranla daha da hassas olduğu belirlenmiştir (Döner Dedeoğlu, 2000).

Çeşitli sebeplerle karşımıza çıkan metal kirliliği sorunu genel olarak ekosistem için bir tehdit unsurudur. Ağır metaller, besin zincirine dahil olarak sadece metal ile kirlenmiş ortamda yaşayan canlılar için değil zincirdeki tüm canlılar için de tehlike arz eder. Ekosistemde metal konsantrasyonu artışının önüne geçilemezse madde döngüsü tehlikeye girer. Sadece metal tolerant canlılar tarafından sürdürülmeye çalışılan madde döngüsü ise metal konsantrasyonunun gittikçe artması durumunda bu canlıların, canlılık özelliklerini yitirdikleri anda son bulur. Acil olarak bu ortamların ıslahı yapılmalıdır. Madde döngüsünün devamı için metal tolerant canlıların o ortama dahil edilmesinin yanında, ortamdaki metali absorblama yeteneğine sahip ajanlar da ıslah amacıyla ortama ilave edilmelidir.

Yoğun endüstriyel kullanıma sahip metaller otoepürasyonun ve biyolojik süreçlerin inhibisyonu gibi çok ciddi çevre sorunlarına neden olmaktadır. Metal kirliliği içeren suların evsel kullanıma sunulduğu örneklerde ise, insan ve hayvanlarda metal toksisitesi ile karşılaşıldığı bilinmektedir (Volesky and Holan, 1995; Bal et al., 2003). Ağır metal kirliliği önlenmediği takdirde madde döngüsü tehlikeye girer ve canlılık için tehlike söz konusu olur. Bu nedenlerle, metal içeren endüstriyel atık suların, içerdiği metal düşük konsantrasyonda olsa bile alıcı su kaynağına iletilmeden önce içerdiği metallerden arındırılmaları önemli ve gerekli bir uygulamadır.

Atık suların toksik metallerden arındırılmasını kolaylaştırmak için metaller beslemede çoğunlukla süspansiyon ve çözelti halinde bulunmaktadır. İyon değişimi, çökeltme ve elektrokimyasal prosesler, metallerin sulardan ve endüstriyel atıklardan uzaklaştırılması amacı ile yaygın olarak kullanılan kimyasal yöntemler arasındadır (Veglio and Beolchini, 1997). Ancak teknik ve/veya ekonomik nedenler, bu yöntemlerin kullanımını bazen sınırlayabilmektedir. Bu amaçla mikroorganizmaların kullanılmaları, geleneksel yöntemlerle rekabet edebilecek düzeyde ucuz ve kolay uygulanabilen yöntemlerdir. Literatürde bu amaçla canlı ve ölü mikrobiyal hücrelerin kullanımına yönelik çok sayıda çalışma göze çarpmaktadır. Mikroorganizmaların metal işleme kapasiteleri, tatlı su çevrelerinden metallerin konsantrasyonuna göre edilmeleri, uzaklaştırılmaları ya da geri alınmalarına yönelik olarak kullanılabilmesi gibi atık su arıtım sürecinin etkinliğini de arttırabilir.

Metal gideriminde kullanılan arıtma yöntemleri 4 esasa dayanır:

1. İndirgenme – Çökeltme Yöntemi

Bu yöntem özellikle kromlu atıkların arıtımında kullanılır. Yüksek değerlikli metal, çökebilene bir şekline indirgendiikten sonra nötrale edilir ve reaktif fazlası metal çökeltilir. Böylece ortam metalden arındırılmış olur.

2. Yükseltgenme – Çökeltme Yöntemi

Özellikle demir ve mangan içeren atıkların arındırılması için tercih edilen bir yöntemdir. Bu yöntemde birbirini izleyen 3 basamak vardır; havalandırma, sedimentasyon, filtrasyon. Çöktürme havuzunda, yükseltgenmenin tamamlanması için gereken sürede tutulduktan sonra yükseltgenmiş metal, filtre ile sudan ayrılır. Kolayca yükseltgenmeyen metaller için yalnızca havalandırma genel olarak etkisizdir. Bu durumda prosese kimyasal yükseltgenme basamağını da eklemek gerekmektedir.

3. Nötralizasyon – Çökeltme Yöntemi

Bakır, çinko, nikel, demir içeren suları arındırmak için önce atık nötrale edilir ve sonra çökme ile bu metaller ayrılır. Nötralizasyon derecesi, pH derecesinin ölçülmesi ile tayin edilir. Sulu çözelti içerisindeki aktif H iyonu derişiminin negatif logaritması nötralizasyon derecesine karşılık gelir.

4. İyon Değişimi

İyon değişimi yöntemi ağır metal iyonlarının, elektrostatik kuvvet ile fonksiyonel grup halinde katı yüzeyinde tutularak, ortamdaki, farklı türdeki iyonlarla değiştirilme ilkesine dayalı bir yöntemdir. Bu amaçla iyon değiştirici reçineler kullanılır (Kılıçarslan, 1999).

Metal ile kirlenmiş ortamların ıslahı ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Metalle kirlenmiş ortamların yeniden bitkilendirilmesi ve dolayısıyla madde döngüsünün devamı amacıyla metal içeren toprağa mikorizal mantar, bakteriyel endospor, aktinomiset ve diğer heterotrofik bakteriler dahil edilerek ortamın ıslahı amaçlanmıştır (Gannon et al., 2002; Giasson et al.; 2006; Lin et al., 2007). Bazı çalışmalar ise metal tolerant olmayan canlıların biyoteknolojik yöntemler kullanılarak genetik yapısının değiştirilmesi ve bunun sonucunda canlıya metal toleransı kazandırılması amacıyla gerçekleştirilmiştir (Zhang et al., 2006).

Bazı mikroorganizmalar toksik elementlere yüksek konsantrasyonlarda direnç gösterme yeteneğindedirler (Wood and Wang, 1983). Mikroorganizmalar metal kirliliği

olan ortamlarda bazı direnç mekanizmaları geliştirerek ağır metal toksisitelerini belirli bir seviyeye kadar indirgeyebilir veya ortadan kaldıracırlar. Bu mekanizmalar kısaca: oksidasyon ve redüksiyon, metal iyonlarını solüsyondan uzaklaştıran intraselüler polimerler sentezleme, hücre yüzeylerinde metal iyonlarını tutabilen proteinler bulundurma, hücre yüzeylerinde metal iyonlarını çözülemeyen metal kompleksleri halinde çöktüren mekanizmalar bulundurma, biyometilasyon sonrasında difüzyon mekanizmasını kullanarak metal bileşiklerini hücre dışına atma olarak özetlenebilir. Yapılan bir kısım çalışmalar metal tolerant olan mikroorganizmaların ekstrakromozomal DNA moleküllerine (plazmid) sahip olduğunu ortaya koymuştur (Silver and Phung, 1996).

1.3. Biyosorpsiyon

Adsorpsiyon, bir maddenin diğer bir madde yüzeyinde veya iki faz arasındaki ara yüzeyde konsantrasyonunun artması ya da başka bir ifade ile moleküllerin, etkileştikleri yüzeydeki çekim kuvvetlerine bağlı olarak o yüzeyle birleşmesini olarak tanımlamaktadırlar. Diğer bir tanıma göre ise, adsorpsiyon gaz buhar ya da sıvı fazında veya herhangi bir çözeltilde bulunan çözünmüş maddelere ait molekül, atom veya iyonların, katı bir maddenin yüzeyinde tutunması olayıdır. Adsorpsiyonda adsorbe edilen maddeye adsorplanan, adsorbe eden katı maddeye adsorban denilmektedir (Akar, 2005).

Biyosorpsiyon sulu çözeltilerden metal, boya vb. kirleticilerin arındırılmasında canlı, ölü veya bunların türevleri olan biyokütlelerin kullanılarak uzaklaştırılması olayıdır. Biyosorpsiyonda kullanılan adsorbanlar biyolojik materyallerdir.

Canlı, cansız veya işlem görmüş biyokütlelerin biyosorpsiyonda kullanılabilmesinin yanında cansız formların kullanımının diğer formlara göre bazı avantajları vardır. Canlılığını koruyabilmesi için besin kaynağına ihtiyaç duyan hücrelerin biyosorpsiyon süresince canlı kalabilmesi çok zordur ve ortamdaki toksisiteden korunması gerekir. Oysa cansız hücrelerin biyosorpsiyon amacıyla kullanılması önemli avantajlar sunmaktadır. Bunlar şöyle sıralanabilir;

1. Toksik maddelerden etkilenmezler,
2. Besin kaynağı gerekmez,
3. Geri kazanımları kolay olup defalarca kullanılabilirler,

4. Yapılarında herhangi bir bozulma olmadan uzun süre saklanabilirler (Akar, 2005).

Metal ile kirletilmiş sucul bir ekosistemin veya atık suların arındırılmasının en doğal yolu biyosorpsiyon yeteneği olan biyolojik ajanların o ortama dahil edilmesinden geçmektedir.

1.3.1. Biyosorpsiyon mekanizmaları

Biyosorpsiyon, adsorpsiyon esasına dayanan bir mekanizmadır. Adsorpsiyon, adsorbentin yüzeyindeki moleküller arasındaki kuvvetlerin denkleşmemiş olmasından ileri gelir. Adsorpsiyonda rol oynayan kuvvetler, katı yüzey ile diğer fazlar arasında adsorplanan maddenin derişim, basınç ve elektrostatik yüklerinin farklı olmasından meydana gelen kuvvetlerdir. Katı yüzeyindeki atom ya da moleküller denkleşmemiş kuvvetler tarafından çözümlenmiş maddelerin katı yüzeyine doğru çekilir, bu yüzey kuvvetleri dengelenmiş olur ve sonuç olarak çözümlenmiş maddenin adsorpsiyonunun gerçekleşir.

Adsorpsiyon türleri 3 grup altında incelemiştir. Adsorpsiyon olaylarının çoğu adsorpsiyonun bu üç şeklinin bileşimidir. Yani adsorpsiyonun değişik tiplerini etkileyen farklı kuvvetler ara yüzeyde özel bir çözümlenmenin birikimine neden olmak için birlikte etkiler. Bu adsorpsiyon tipleri şunlardır;

1. Yer değiştirme adsorpsiyonu

Çözümlenilen ile sorbent arasında elektriksel etkileşme sonucu oluşan adsorpsiyon tipidir. Bu adsorpsiyon yüzeydeki yüklü bölgelere elektrostatik kuvvetler ile çözümlenilendeki iyonik karakterde adsorblananların çekilmesi sonucu oluşur. Bu tür adsorpsiyonda sorbent ve adsorplananın iyonik güçleri önemlidir. Eşit yüklü iyonlar için moleküler büyüklük adsorpsiyonun tercih derecesini belirler ve daha küçük iyon tercih edilir.

2. Fiziksel adsorpsiyon

Adsorpsiyon ısısı -20 kJ/mol civarında olan etkileşimler sonundaki tutunmalara fiziksel adsorpsiyon denir. Fiziksel adsorpsiyon sırasında atom, molekül ya da iyon şeklinde olabilen adsorblanan tanecikler ile katı yüzeyi arasında uzun mesafeli, fakat zayıf olan Van der Waals çekim kuvvetleri etkindir. Fiziksel adsorpsiyon bir tabakalı ya da çok tabakalı olabilir. Tüm fiziksel adsorpsiyonlar ekzotermik ve tersinirdir.

3. Kimyasal adsorpsiyon

Adsorpsiyon ısısı -200 kJ/mol civarında olan etkileşmeler sonundaki tutunmalara kimyasal adsorpsiyon denir. Kimyasal adsorpsiyon sırasında ise tanecikler ile yüzey arasında bir kimyasal bağ ve genellikle de kovalent bağ oluşmaktadır. Kimyasal adsorpsiyon yalnızca bir tabakalıdır. Bu adsorpsiyon tipi ekzotermik ya da endotermik olabilir ve tersinir değildir (Kılıçarslan, 1999).

1.3.2 Biyosorpsiyon amacı ile kullanılan mikroorganizmalar

Aralarında krom, kobalt, nikel, bakır, çinko, kadmiyum, kurşun, altın ve toryum'un da bulunduğu birçok metalin mikroorganizmalar ile biosorpsiyonuna yönelik çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu araştırmalarda alg ve bakteri türleri ile maya, küf ve makrofungus formunda çeşitli mantar türleri yoğun olarak çalışılmıştır (Gadd, 1990; Tobin et al., 1990; Aksu et al., 1992, 1999; Muraleedharan et al., 1995; Sağ et al., 1995, 2000a, 2000b; Volesky and Holan, 1995; Leyval et al., 1997; Chang et al., 1998; Sing, and Yu, 1998; Yetiş et al., 1998; Arıca et al., 2001; Gabriel et al., 2001; Sağ and Aktay, 2001; Yalçınkaya et al., 2002; Özcan ve Özcengiz, 2003). Bu çalışmalarda, söz konusu mikroorganizmaların, canlı ve ölü formlarının kullanımı ile atıksularda bulunan çeşitli metallerin giderimi çalışılmış ve biyosorpsiyon koşulları kaydedilmiştir. Ancak çeşitli literatürlerde metallere yüksek tolerans gösterdikleri vurgulanan aktinomiset türleri ile gerçekleştirilen biyosorpsiyon çalışmalarının nispeten az sayıda olduğu görülmektedir.

1.3.3. Aktinomisetler ve metal biyosorpsiyonu

Aktinomisetler bakteriler içinde incelenen ancak birçok özellikleriyle funguslara da benzeyen, dallanmış filament yapısı oluşturan, başarılı büyümenin ve dallanmanın sonucunda miselyum adı verilen kollara ayrılmış ağsı yapılar sayesinde spor oluşturabilen, gram pozitif bakterilerdir.

1875' de Ferdinand Chon insan gözyaşı kanalında ipliksi bir organizma tespit etmiş ve onu "*Streptothrix foersteri*" olarak isimlendirmiştir. 1890' da Gasperini ve Lanchner-Sandoval bu organizma grubuna "actinomyces" ismini ilk defa vermiştir (Yücel, 2007).

Aktinomisetlerin morfolojileri; organizmanın yapısına, ortamın yapısına, büyüme şartlarına, özellikle de havalanma ve büyümeyi teşvik edici ve inhibe edici maddelere bağlıdır.

Toprakta bol miktarda bulunurlar. Özellikle alkali ve nötral topraklarda bol miktarda bulunurlar, daha düşük su potansiyeline gereksinim duyarlar. Laboratuvar ortamında petri kaplarında aktinomiset kolonileri diğer mikroorganizmalardan ayrılabilirler. Kompakt kuru yüzeyli koloniler oluştururlar ve genelde havasal miselle kaplanırlar. Şekerler, alkoller, organik asitler, aminoasitler ve bazı aromatik bileşikleri karbon kaynağı olarak, kazein ve nitratı azot kaynağı olarak kullanırlar.

Streptomyces oldukça fazla sayıda ve çeşitte türden oluşan geniş bir cinstir. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology' de beş yüzün üzerinde *Streptomyces* türü tanımlanmaktadır. İpliksi yapıdaki bu organizmalarda büyüme, ipliklerin uç noktalarında gerçekleşir ve buna genellikle dallanma eşlik eder. Sonuçta oluşan koloninin aldığı şekle miselyum denir. Koloni yaşlandıkça bu canlılara özgü olan, kolonin üzerine doğru oluşan çıkıntılar görülür ve bunlara sporofor adı verilir. Bu yapılar spor oluştururlar. *Streptomyces* sporlarına konidya adı verilir ve bu sporlar *Bacillus'* ta ya da *Clostridium'* da görülen sporlardan farklıdır. Konidya ve sporoforlar genellikle pigment içerir ve bu pigmentler olgun kolonilere karakteristik bir renk verir. Olgun kolonilerin aynı zamanda pudramsı bir görünümü de vardır ve bu da *Streptomyces'* in tanımlanmasını oldukça kolaylaştırır (Yücel, 2007).

Az sayıda suda yaşayan tür içermesine rağmen *Streptomyces* türleri esas olarak toprakta yaşar. Hatta "toprak kokusu" dediğimiz kokunun sebebi bu canlıların geosmin adı verilen metabolik ürünleridir.

Streptomyces cinsine ait türler zorunlu aeroblardır ve çok çeşitli maddelerle beslenebilirler. Bu grubun en önemli özelliklerinin başında antibiyotik üretme ve metal toleransı özellikleri gelir. Beş yüzün üzerinde antibiyotik maddenin *Streptomyces* tarafından üretildiği saptanmıştır ve bu durum ekonomi ve sağlık açısından bu canlıları oldukça önemli kılmaktadır. 50' den fazla *Streptomyces* antibiyotiği günümüzde tıp, veterinerlik, tarım ve endüstri alanlarında kullanılmaktadır.

Aktinomiset grubu bakterilerin metaller ile ilişkisini konu alan çeşitli çalışmalarda, bu bakterilerin metallere tolerant izolatları, toprak (Amoroso et al., 2000; Mengoni et al., 2001), tatlı su (Amoroso et al., 1998) ve deniz (Ravel et al., 1998)

ortamlarından izole edilmiştir. Bazı aktinomiset izolatlarından metallerin hücre içine alınmasından sorumlu genlerin (Amoroso et al., 2000) ve bazılarında da metal toleransı ile ilişkilendirilen plazmidlerin varlığı (Ravel et al., 1998; Amoroso et al., 2001) belirlenmiştir. Bu nitelikteki izolatların bioremediasyon amacı ile kullanımını öneren çalışmalar (Endo et al., 1996) konunun önemini vurgulamaktadır. Literatürde, aktinomiset grubu bakterilerin kitlesel büyümeleri ile elde edilen biyokütlenin cansız formda kullanımı ile metal giderimini örnekleyen çalışmalara da rastlanmaktadır. Bu yolla başarılı sonuçlar alınmış metaller arasında gümüş (Ag) (Mattuschka and Straube, 1993), Bizmut (Bi) (Bal et al., 2003), Kobalt (Co) (Mattuschka and Straube, 1993), krom (Cr) (Mattuschka and Straube, 1993), çinko (Zn) (Bal et al., 2003), nikel (Ni) (Mattuschka and Straube, 1993; Öztürk et al., 2004), bakır (Cu) (Mattuschka and Straube, 1993; Golab et al., 1995; Öztürk et al., 2004), kadmiyum (Cd) (Mattuschka and Straube, 1993; Puranik et al., 1995; Kefala et al., 1999), kurşun (Pb) (Golab et al., 1991; Mattuschka and Straube, 1993) ve uranyum (U) (Golab et al., 1991) bulunmaktadır. Ancak gerek ülkemizde gerekse dünya çapında metal tolerant aktinomiset izolatları ile gerçekleştirilmiş biyosorpsiyon çalışmalarının eksikliği hissedilmektedir.

Bir canlı ağır metallere karşı sadece tolerant ise; yalnız madde döngüsünün devamı ve kendi yaşamını sürdürmek adına yarar sağlayacaktır. Oysa canlı tolerant olmasının yanında, metal biyosorpsiyonu yapabilme yeteneğine de sahip ise bu yararlarının yanında metal ile kirletilmiş ortamlarda metal tolerant olmayan canlıların da bulunmasını sağlayabilecektir. Bu durumda akla metal toleransına sahip bir canlının aynı zamanda biyosorpsiyon yeteneği olup olmadığı gelmektedir. Rho ve Kim (2002) *Streptomyces* cinsine ait birkaç türün kurşun toleransını ve çinko, bakır, kurşun, kadmiyumu adsorblama yeteneğini çalışmış ve bu çalışma sonucunda tolerans ve biyosorpsiyon arasında bir ilişki olmadığını savunmuşlardır. Oysa bunun aksi sonuçlar elde edilen çalışmalar da vardır. Çeşitli küflerle yapılan bir çalışmada kobalt, krom, bakır, kadmiyum ve nikelin izolatlar üzerindeki minimal inhibisyon konsantrasyonları belirlenmiş ve birden fazla metale karşı tolerans gösterilen 3 örneğin kadmiyum ve kroma karşı biyosorpsiyon yetenekleri belirlenmiştir. Sonuç olarak tolerans ile biyosorpsiyon arasında doğrusal bir ilişki olduğu gözlemlenmiştir (Zafar et al., 2007).

Bu çalışma, Porsuk nehir sisteminden ve metaller ile kirletilmiş olduğu belirlenen toprak örneklerinden metallere dirençli aktinomiset izolatlarının elde

edilmesi ve karakterizasyonu ile bu izolatların ağır metal giderimi konusunda kullanım olanaklarının araştırılmasını amaçlamaktadır. Ayrıca bu çalışma ile ülkemizde sucül çevrelerde bulunan aktinomiset izolatlarına yönelik bilgi birikimine katkıda bulunmak da hedeflenmiştir.

2. MATERYAL VE METODLAR

2.1. Materyal

Çalışma süresince çok sayıda besiyeri ve çözelti kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan diğer kimyasal maddeler Çizelge 2.1' de verilmiştir.

2.1.1. Besiyerleri

Besiyeri 1: Nişasta Kazein Agar

Çözünür nişasta	10.00	g
Vitamin free casein (Difco)	0.30	g
KNO ₃	2.00	g
NaCl	2.00	g
K ₂ HPO ₄	2.00	g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0.05	g
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0.01	g
CaCO ₃	0.02	g
Agar	18.00	g
Distile su	1000	ml
pH	7.2	

Besiyeri içeriğinde bulunan, K₂HPO₄ dışındaki diğer malzemeler distile su içerisinde çözülüp, steril edildikten sonra, daha önceden hazırlanıp, otoklavlanmış K₂HPO₄ çözeltisi besiyerine ilave edilmiştir.

Sterilizasyondan sonra 50 şer µg/ml sikloheksimid ve nistatin içerecek biçimde antibiyotik ilave edilen ortam (Williams and Cross, 1971; Goodfellow and Williams, 1983; Mc Carthy and Williams, 1990), aktinomisetlerin topraktan izolasyonunda büyüme ortamı olarak kullanılmıştır (Küster and Williams, 1964).

Besiyeri 2: İnorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4)

Çözünür Nişasta	10.00	g
K ₂ HPO ₄	1.00	g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1.00	g
NaCl	1.00	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.00	g
CaCO ₃	2.00	g
Shirling and Gottlieb iz element çözeltisi*	1.00	ml
Agar	15.00	g
Distile su	1000	ml
pH	7.0-7.4	

Nişasta, bir miktar soğuk distile su ile çözüldükten sonra, hacim 1000 ml' ye tamamlanarak üzerine iz element çözeltisi dışındaki diğer besiyeri bileşenleri ilave edilmiştir. Besiyeri pH' sı ayarlandıktan sonra, 1.1 atm. basınç altında 121 °C sıcaklıkta, 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrası besiyerine gerektiği kadar iz element çözeltisi ilave edilmiştir (Shirling and Gottlieb, 1966; Korn-Wendish and Kutzner, 1992).

*** İz element çözeltisi**

FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.10	g
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0.10	g
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.10	g
Distile su	100	ml

İz element çözeltisi hazırlandıktan sonra 1.1 atm. basınç altında 121 °C sıcaklıkta, 15 dakika süre ile steril edilmiştir.

Besiyeri 3: Nütrient Agar

Ticari olarak alınan besiyerinden 23 g/l oranında tartılarak hazırlanmıştır.

Besiyeri 4: Yeast Extract - Malt Extract Agar (ISP 2)

Yeast Extract	4.00	g
Malt Extract	10.00	g
Glukoz	4.00	g
Agar	20.00	g
Distile su	1000	ml
pH	7.3	

Besiyeri içeriği distile suda çözülüp, pH ayarlaması yapıldıktan sonra, otoklavda, 1.1 atmosfer basınç ve 121 °C sıcaklıkta, 15 dakika süre ile steril edilmiştir. İzolasyondan sonra aktinomiset kültürleri ISP2 besiyerinde geliştirilip 4 °C' de muhafaza edilmiştir.

Besiyeri 5: Yeast Extract - Malt Extract Broth

Yeast Extract	4.00	g
Malt Extract	10.00	g
Glukoz	4.00	g
Distile su	1000	ml
pH	7.3	

Besiyeri içeriği distile suda çözülüp, pH ayarlaması yapıldıktan sonra, otoklavda, 1.1 atmosfer basınç ve 121 °C sıcaklıkta, 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Biyosorpsiyon aşamasında hücre geliştirmek amacıyla kullanılmıştır.

Besiyeri 6: Tryptone-Yeast Extract Broth (ISP 1)

Tripton	5.00	g
Yeast Extract	3.00	g
Distile su	1000	ml
pH	7.0-7.2	

Besiyeri içeriği distile suda çözülp, pH ayarlaması yapıldıktan sonra, otoklavda, 1.1 atmosfer basınç ve 121 °C sıcaklıkta, 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Diaminopimelik asit profili belirlenecek olan izolatlar için büyüme ortamı olarak kullanılmıştır.

Besiyeri 7: Katı Minimal Medium (MM)

Glukoz	10.0	g
L-asparagine	0.50	g
K ₂ HPO ₄	0.20	g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.10	g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.01	g
Agar	20.00	g
Distile su	1000	ml

Besiyeri içeriği distile suda çözülp, pH ayarlaması yapıldıktan sonra, otoklavda, 1.1 atmosfer basınç ve 121 °C sıcaklıkta, 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Kalitatif ve yarı kantitatif metal direnç tayininde kullanılmıştır.

Besiyeri 8: Sıvı Minimal Medium (MM)

Glukoz	10.00	g
L-asparagine	0.50	g
K ₂ HPO ₄	0.20	g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.10	g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.01	g
Distile su	1000	ml

Besiyeri içeriği distile suda çözülp, pH ayarlaması yapıldıktan sonra, otoklavda, 1.1 atmosfer basınç ve 121 °C sıcaklıkta, 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Kantitatif metal direnç tayini amacıyla kullanılmıştır.

Besiyeri 9: Pepton – Yeast Extract – Iron Agar (ISP 6)

Bacto Pepton	15.00 g
Protease Pepton	5.00 g
Yeast Extract	1.00 g
Ferrik Amonyum Sitrat	0.50 g
K ₂ HPO ₄	1.00 g
Na Tiyosülfat	0.08 g
Agar	15.00 g
Distile su	1000 ml
pH	7.0-7.2

Besiyeri içeriği distile suda çözülüp, pH ayarlaması yapıldıktan sonra, otoklavda, 1.1 atmosfer basınç ve 121 °C sıcaklıkta, 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Bu besiyeri aktinomiset izolatlarının melanin pigment üretim özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Shirling and Gottlieb, 1966).

Besiyeri 10: Oatmeal Agar (ISP 3)

Yulaf unu (Oat Meal)	20.00 g
Shirling and Gottlieb iz element çözeltisi	1.00 ml
Agar	15.00 g
Distile su	1000 ml

Ortamın hazırlanması için, 20.00 g yulaf unu, 1000 ml distile suda 20 dakika kaynatıldıktan sonra, bir tülbent ile filtre edilmiştir. Filtratın kalan hacmi, distile su ile, 1000 ml' ye tamamlandıktan sonra 1ml iz element çözeltisi ilave edilmiştir. Besiyeri, pH' sı 7.2' ye ayarlandıktan sonra, 100 °C' de, buhar altında tutularak sterilize edilmiştir.

Besiyeri 11: Tirozin Agar (ISP7)

Gliserol	15.00 g
L-Tirozin	0.50 g
L-asparagine	1.00 g
K ₂ HPO ₄	0.50 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.50 g
NaCl	0.50 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.01 g
Agar	20.00 g
Pridham and Gottlieb iz element çözeltisi*	1.00 ml
Distile su	1000 ml
pH	7.0-7.4

Besiyeri içeriği distile suda çözülüp, pH ayarlaması yapıldıktan sonra, otoklavda, 1.1 atmosfer basınç ve 121 °C sıcaklıkta, 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrasında besiyerine gerektiği kadar iz element çözeltisi ilave edilmiştir. Bu besiyeri aktinomiset izolatlarının melanin pigment üretim özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Shirling and Gottlieb, 1966).

*** Pridham and Gottlieb iz element çözeltisi**

CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.64 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.11 g
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0.79 g
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.15 g
Distile su	100 ml

İz element çözeltisi hazırlandıktan sonra 1.1 atm. basınç altında 121 °C sıcaklıkta, 15 dakika süre ile steril edilmiştir.

Besiyeri 12: Modifiye Bennett's Agar

Gliserol	20.00	g
L-Alanin	2.50	g
NaCl	1.00	g
CaCO ₃	0.10	g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.10	g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.10	g
Agar	15.00	g
Distile su	1000	ml
pH	7.0	

Besiyeri içeriği distile suda çözülüp, pH ayarlaması yapıldıktan sonra, otoklavda, 1.1 atmosfer basınç ve 121 °C sıcaklıkta, 15 dakika süre ile steril edilmiştir. İzolatların büyüme, yıkım ve direnç gibi özellikleri ile ilgili çalışmalarda, bu ortamdan yararlanılmıştır (Locci, 1989).

Besiyeri 13: Esculin Redüksiyon Ortamı

Yeast Extract	3	g
Ferik amonyum sitrat	0.5	g
Esculin	1	g
Agar	7.5	g
Distile su	1000	ml
pH	7.2	

Besiyeri 14: Arbutin Redüksiyon Ortamı

Yeast Extract	3	g
Ferik amonyum sitrat	0.5	g
Arbutin	1	g
Agar	7.5	g
Distile su	1000	ml
pH	7.2	

Besiyeri 15: DNase Test Agar

DNase Agar	39.00	g
Distile su	1000	ml
pH	7.3	

Besiyeri içeriği distile suda çözülüp, otoklavda, 1.1 atmosfer basınç ve 121 °C sıcaklıkta, 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Bu ortamdan, izolatların DNA yıkım özelliklerinin belirlenmesi için yararlanılmıştır (Locci, 1989).

Besiyeri 16: Üre Redüksiyon Ortamı

KH ₂ PO ₄	9.10	g
Na ₂ HPO ₄	9.50	g
Fenol kırmızısı	0.01	g
Yeast Extract	0.10	g
Distile su	1000	ml
Üre solüsyonu (% 15; g/ml)	133.0	ml
pH	7.2	

Üre filtreden geçirilerek steril edilmiş ve besiyerine daha sonra eklenmiştir.

Besiyeri 17: Allantoin Redüksiyon Ortamı

Allantoin	3.33	g
KH ₂ PO ₄	9.10	g
Na ₂ HPO ₄	9.50	g
Fenol kırmızısı	0.01	g
Yeast Extract	0.10	g
Distile su	1000	ml
pH	7.2	

Besiyeri 18: Egg Yolk Medium

Bacto – Pepton	10.00 g
Glukoz	1.00 g
NaCl	10.00 g
Yeast Extract	5.00 g
Agar	12.00 g
Egg Yolk Emülsiyonu	50.00 ml
Distile su	1000 ml
pH	7.0

Egg Yolk dışındaki besiyeri içeriği distile suda çözülüp, otoklavda, 1.1 atmosfer basınç ve 121 °C sıcaklıkta, 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Egg Yolk besiyerine daha sonra steril koşullarda eklenmiştir.

Besiyeri 19: Basal Mineral Tuz Ortamı

Karbon kaynağı	1.00 ya da 10.00 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.64 g
KH ₂ PO ₄	2.38 g
K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	5.65 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1.00 g
Pridham and Gottlieb iz element çözeltisi*	1.00 ml
Agar	15.00 g
Distile su	1000 ml
pH	6.8 - 7.0

Bu besiyeri karbon kaynağı kullanım ortamı olarak kullanılmıştır. Karbon kaynağı dışındaki besiyeri içeriği distile suda çözülüp, pH ayarlaması yapıldıktan sonra, otoklavda, 1.1 atmosfer basınç ve 121 °C sıcaklıkta, 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Karbon kaynakları ise tinalizasyon yöntemi kullanılarak steril edilmiş ve besiyerine daha sonra iz element çözeltisi ile birlikte eklenmiştir.

* Pridham and Gottlieb iz element çözeltisi

CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.64	g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.11	g
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0.79	g
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.15	g
Distile su	100	ml

İz element çözeltisi hazırlandıktan sonra 1.1 atm. basınç altında 121 °C sıcaklıkta, 15 dakika süre ile steril edilmiştir.

Besiyeri 20: Nitrat Redüksiyon Ortamı

Nutrient Broth	13.00	g
KNO ₃	2.00	g
Agar	6.00	g
Distile su	1000	ml

İzolatların nitrat redüksiyonu ve H₂S üretim aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Locci, 1989).

Besiyeri 21: Basal Medium

Azot kaynağı	1.00	g
D-Glukoz	10.00	g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.50	g
NaCl	0.50	g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.01	g
K ₂ HPO ₄	1.00	g
Agar	15.00	g
Distile su	1000	ml

Bu besiyeri azot kaynağı kullanım ortamı olarak kullanılmıştır. Azot kaynağı dışındaki besiyeri içeriği distile suda çözülüp, pH ayarlaması yapıldıktan sonra,

otoklavda, 1.1 atmosfer basınç ve 121 °C sıcaklıkta, 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Azot kaynakları ise tindalizasyon yöntemi kullanılarak steril edilmiş ve besiyerine daha sonra eklenmiştir.

Besiyeri 22: Yumuşak Agar

Nutrient Broth	13.00 g
Agar	7.00 g
Distile su	1000 ml

İzolatların test organizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır (Williams et al., 1983a).

2.1.2. Çözeltiler ve diğer kimyasal maddeler

Çözelti 1: Ringer Çözeltisi

Ringer tablet	1 adet
Distile su	500ml

1 adet ringer tableti 500ml distile su içerisinde çözülmüştür. Elde edilen çözelti bir izotonik çözelti olarak iş görür.

Çözelti 2: Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)

9 g NaCl 1000 ml' ye distile su ile tamamlanarak çözülmüştür.

Çözelti 3: %20' lik Gliserol Çözeltisi

20 ml gliserol, 100 ml' ye distile su ile tamamlanılarak hazırlanmıştır.

Çözelti 4: 1M NaOH Çözeltisi

4.1237 g NaOH (Merck), 100 ml' ye distile su ile tamamlanıp çözülerek hazırlanmıştır.

Çözelti 5: 1M HCl Çözeltisi

8,2898 ml HCl (Merck, %37, d=1.19 kg/l), 100 ml' ye distile su ile tamamlanarak hazırlanmıştır.

Çözelti 6: 1M HNO₃ Çözeltisi

6.9743 ml HNO₃ (Merck, %65, d=1.39 kg/l), 100 ml' ye distile su ile tamamlanarak hazırlanmıştır.

Çözelti 7: 1000 mg/l' lik Nikel Çözeltisi

5.0032 g Ni(NO₃)₂.6H₂O (Acros Organics, %99) 1000 ml' ye distile suyla tamamlanarak çözülmüştür.

Çözelti 8: 1000 mg/l' lik Kadmiyum Çözeltisi

1.6465 g CdCl₂ (Merck, %99) 1000 ml' ye distile suyla tamamlanarak çözülmüştür.

Çözelti 9: 1000 mg/l' lik Kobalt Çözeltisi

4.0374 g CoCl₂ (Merck) 1000 ml' ye distile suyla tamamlanarak çözülmüştür.

Çözelti 10: 1000 mg/l' lik Kurşun Çözeltisi

1.5985 g Pb(NO₃)₂ (Merck) 1000 ml' ye distile suyla tamamlanarak çözülmüştür.

Çözelti 11: 1000 mg/l' lik Civa Çözeltisi

1.3535 g HgCl₂ (Fluka) 1000 ml' ye distile suyla tamamlanarak çözülmüştür.

Çözelti 12: 1000 mg/l' lik Çinko Çözeltisi

2.0848 g ZnCl₂ (Merck) 1000 ml' ye distile suyla tamamlanarak çözülmüştür.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan bazı kimyasal maddeler ve kullanım amaçları

Kimyasal Maddenin Adı	Kullanım Amacı
Cycloheximide	İzolasyon
Rifampicin	
HCL (6 ve 10 N)	Hücre çeperi DAP analizi
Mikrokristal selüloz	
DL- α - ϵ -diaminopimelik asit	
Metanol	
Piridin	
Asetonik ninhidrin (% 0.2)	
% 3 (v/v) lük Trikloroasetik asit (TCA)	
İyot solüsyonu	
1 M HCl	
Griess-Iloslav Reaktifi A (0.8 ml sülfanilik asit, 100 ml 5 N Asetik asitte çözülür)	
Griess-Iloslav Reaktifi B (0.6 ml dimetil- α - naftilamin, 100 ml 5 N Asetik asitte çözülür)	
Kurşun asetat	
Fenol red	
Kloroform	

Çözelti 13: 1000 mg/l' lik Bakır Çözeltisi

3.9295 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck) 1000 ml' ye distile suyla tamamlanarak çözülmüştür.

Çözelti 14: 1000 mg/l' lik Demir Çözeltisi

4.9773 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck) 1000 ml' ye distile suyla tamamlanarak çözülmüştür.

Hazırlanan metal çözeltileri stok olarak kullanılmış, kullanılan konsantrasyonlar bu çözeltilerden belirli miktarlar alınarak bunların seyreltilmesiyle elde edilmiştir.

Çözelti 15: Tris-EDTA Tamponu (25 mM, pH-8)

25 mM'lık Tris HCl çözeltisi hazırlanıp, bu çözelti içerisinde gereken miktarda EDTA çözülerek hazırlanmıştır.

2.2. Metodlar

2.2.1. Metale dirençli aktinomiset izolatlarının eldesi

2.2.1.1. Örnekleme için lokalite seçimi

Bu çalışmada kullanılan aktinomisetlerin izole edildiği toprak örneklerinin seçilmesinde ortamda metal kirliliği olmasına özen gösterilmiştir. Metal kirliliği olan sucul ekosistemlerden de sediment örnekleri alınmıştır. Porsuk nehir sisteminin sedimentinden aktinomiset izolasyonu amacı ile lokalite seçimi için, Güney ve Koyuncu (2002) tarafından gerçekleştirilen önceki bir çalışmanın verilerinden yararlanılmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarından yoğun metal birikimi olduğu belirlenen ve sediment örneklerinin alınacağı lokaliteler ile bu ortamlarda bulunan metal miktarları, Çizelge 2.2' de özetlenmiştir.

Toprak örnekleri ise, yoğun miktarda metal içeren sediment örneklerinin civarında yer alan tarım toprakları, çimento fabrikası gibi endüstriyel üretimin sürdürüldüğü alanlar ile ulaşılabilen metalik maden yatakları civarındaki alanlardan örneklenmiştir.

İzolasyon çalışması, öncelikle Porsuk nehir sisteminin sedimentinden ve yakın çevresindeki metal ile kirletilmiş diğer toprak örneklerinden aktinomiset izolatlarının eldesini içermektedir. Çalışmanın bu aşamasında ekonomik olarak işletilen metalik maden yataklarında doğal olarak bulunan aktinomiset izolatlarının metal toleransının yüksek olacağı düşünülerek, örnekleme yapılması süreci öngörüldüğü biçiminden daha genişletilerek sürdürülmüştür. Bu amaçla, Maden Tetkik ve Arama Genel Müdürlüğü'nün ilgili birimi olan Maden Etüt ve Arama Dairesi ile bağlantı kurularak ülkemizde

bulunan çeşitli metalik maden yatakları belirlenmiş ve örneklenmiştir. Aktinomiset izolatlarının eldesi amacı ile, Porsuk nehir sistemi' nin yanı sıra Uluabat Gölü (Mustafa Kemal Paşa–Bursa) sedimenti de örneklenerek izolasyon çalışmaları sürdürülmüştür. Elde edilen tüm örneklerde var olan metal içerikleri, Hitachi 180-70 model alevli atomik absorpsiyon cihazı ile belirlenmiştir. Örneklenen maden yatakları ve sediment lokaliteleri ve içerdiği bazı metallerin miktarı Çizelge 2.3' de sunulmuştur.

Çizelge 2.2. Porsuk nehrinde örnek alınacak lokalitelerden alınan sediment örneklerinde varlığı belirlenen metaller ve miktarları (Güney ve Koyuncu, 2002).

Lokalite adı	Belirlenen Metal Miktarı (mg/kg kuru madde)						
	Pb	Zn	Cu	Ni	Cd	Cr	Mn
Çalça	314	2448	66	102	3	102	125
Beşdeğirmen	329	1670	61	179	2	94	214
Sabuncu	188	1704	48	188	-	125	339
Porsuk Barajı	67	106	18	247	-	64	265
Adalar	221	129	23	157	-	124	283

Örnekleme aşamasında, Türkiye' nin Eskişehir, Bilecik, Bursa, Balıkesir, Bartın, Karabük, Kastamonu gibi illerimizde bulunan metalik maden yatakları ve çeşitli atık metallerin alıcı su kaynağı olan sucul ortamlardan örnekleme yapılmıştır. İzolasyon çalışmaları için örnekleme yapılırken, lokalitelerin farklı kısımlarının örneklenmesine önem verilmiştir.

Çizelge 2.3. Örneklenen maden yataklarının lokaliteleri ve içerdiği bazı metallerin miktarı

Lokalite İsmi ve Özelliği	İlçe - İl	Sıra No	Kod ve Kaynak	Lokalite Özelliği	(mg/kg)									
					Pb ²⁺	Cu ²⁺	Cr _{top.}	Ni ²⁺	Cd ²⁺	Co ²⁺	Mn ²⁺	Fe _{top.}		
Çimento Fabrikası	İnönü - Eskişehir	1	1.1.	Fabrikadan 50 metre	34,295	14,998	138,481	175,775	5,399	38,195	154,078	2399,25		
			1.2.	Fabrikadan 100 metre	113,389	14,399	45,095	84,992	3,699	19,898	149,985	2255,15		
			1.3.	Fabrikadan 150 metre	15,867	5,089	27,842	82,327	1,696	15,966	390,181	2217,08		
			1.4.	Hammadde (Klinker)	15,374	8,985	17,770	70,581	1,398	13,078	199,664	2134,86		
			2.1.	Ocak (Fe-Ni)	0,40	13,74	171,54	957,66	-	40,98	39,55	2144,43		
Karaçam Köyü (Nikel-Demir Ocak)	Sivrihisar - Eskişehir	2	2.2.	Tepe - Yüzey	-	4,53	88,25	1212,50	-	164,58	207,20	1887,14		
			2.3.	Etek - Yüzey	4,78	12,12	57,14	708,73	-	80,03	209,51	2351,34		
			2.4.	Yol	14,44	16,60	119,32	1420,80	-	116,16	199,37	2517,86		
			2.5.	Köy	6,51	7,67	113,04	1586,11	-	116,98	176,39	2561,25		
			3.1.	Ormaniçi Yol	10,39	39,36	61,74	852,2	-	46,16	192,43	2457,79		
Türkmenbaba Dağı	Eskişehir	3	4.1.	Ocak (Cu)	16,69	452,11	-	-	-	13,71	172,42	2542,61		
			4.2.	Ocak (Cu)	5,95	653,04	-	-	-	11,90	46,19	3013,42		
			4.3.	Su ile taşınmış metal	-	-	-	-	-	-	-	-		
Muratdere Köyü (Bakır Ocak)	İnegöl - Bursa	5	5.1.	Ocak (Cu)	1,40	4351,3	-	-	-	8,0	121,18	2619,58		
			5.2.	Ocak (Cu)	7,97	2573,04	-	-	-	14,95	295,17	2810,22		
			5.3.	Ocak (Cu)	-	-	-	-	-	-	-	-		
Tüfekçikonak Köyü (Bakır Ocak)	Sarıcakaya - Eskişehir	6	6.1.	Ayıldut Deresi, Silisli toprak yüzeyi	234,76	38,83	-	-	-	12,54	287,53	2946,97		
			6.2.	Silisli ve limonitli toprak (K.Ü.)	51,68	44,30	-	316,89	-	30,33	2388,65	2454,50		
			6.3.	Silisli ve limonitli toprak (K.A.)	54,15	35,90	-	225,54	-	28,57	1725,81	2539,13		

Çizelge 2.3. Örneklenen maden yataklarının lokaliteleri ve içerdiği bazı metallerin miktarı (devam)

Lokalite İsmi ve Özellikleri	İlçe - İl	Sıra No	Kod ve Kaynak	Lokalite Özelliği	(mg/kg)									
					Pb ²⁺	Cu ²⁺	C _{top.}	Ni ²⁺	Cd ²⁺	Co ²⁺	Mn ²⁺	Fe _{top.}		
Mayıslar Köyü (Krom Ocağı)	Sarıcakaya - Eskişehir	6	6.4.	MTA 6 no' lu Sondaj Bölgesi, Polimetal	7,32	31,45	-	36,0	-	9,30	392,64	1087,92		
			6.5.	MTA 6 no' lu Sondaj Bölgesi, Krom	12,39	34,76	78,11	1159,26	-	70,32	507,61	2437,17		
			6.6.	Ayırdü Deresi, Sülfürlü bozulmuş kayacı	904,58	6,72	-	3,95	10,66	9,98	94,80	2488,59		
			7.1	Bakıbaça Ocağı Limonitli toprak	9,78	258,33	-	3,99	-	105,59	175,68	2784,93		
			7.2	Bakıbaça Ocağı Limonitli toprak	7,17	115,15	-	1,99	-	31,88	57,78	265171		
			7.3	Aşıköy Ocağı	0,60	72,76	-	3,99	-	25,99	181,91	2738,63		
Karadeniz Bakır İşletmeleri Bakır Ocağı	Karabük	7	7.4	Aşıköy Ocağı	0,59	94,96	-	5,90	-	33,42	267,37	2669,75		
			7.5	Curuf - Polimetal bölgesi	5,72	5428,80	-	3,94	-	687,82	59,16	2733,13		
			8.1.	Fabrikadan 100 metre	8,99	22,19	-	19,9	-	29,98	199,88	2572,51		
Balya Kurşun Ocağı	Balya - Balıkesir	10	9.1.	Polimetal bölgesi	-	3,18	-	1,99	-	9,94	176,90	1460,94		
			10.1.	Ocak atık alanı (yüzey bölgesi)	585,6	7875,9	79,9	5,5	21,4	38,3	43,3	237989,2		
			10.2.	Ocak atık alanı (dip bölgesi)	12115,2	119,5	70,7	-	76,3	27,3	110,7	252477,7		
			10.3.	Ocak atık alanı (Curuf)	23767,2	1999,1	243,6	238,9	14,9	37,4	23711,7	155486,4		
			10.4.	Ocak alanı	4243,9	15,8	14,1	-	-	2,0	37,2	61156,4		
10.5.	Çökeltme havuzu	13868,4	1962,3	25,3	-	135,5	12,1	1867,9	62266,5					

Çizelge 2.3. Örneklenen maden yataklarının lokaliteleri ve içerdiği bazı metallerin miktarı (devam)

Lokalite İsmi ve Özellikleri	İlçe - İl	Sıra No	Kod ve Kaynak	Lokalite Özelliği	Pb ²⁺	Cu ²⁺	Cr _{top.}	Ni ²⁺	Cd ²⁺	Co ²⁺	Mn ²⁺	Fe _{top.}		
													(mg/kg)	
Porsuk Nehir Sistemi	Eskişehir	11	11.1.	Sinerköy köprüsü (Kıtahya girişi)	1155	19,6	-	52,0	-	25,0	111,2	2156		
			11.2.	Sabuncupınar köprüsü (Porsuk barajı girişi)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			11.3.	Satılmışoğlu köyü	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			11.4.	Alpu yolu, Arıtma tesisi girişi	16,2	29,8	1,8	172,1	-	25,8	204,4	2434		
Ulubat Gölü	M.Kemal Paşa – Bursa	12	12.1.	6. istasyon	9,2	16,2	-	226,2	-	30,8	302,6	2674		
			12.2.	8. istasyon	21,8	18,6	-	163,4	-	25,2	345,6	2680		
			12.3.	9. istasyon	17,2	27,2	-	154,6	-	24,2	296,4	2702		
			12.4.	12. istasyon	2,2	18,0	-	107,6	-	20,6	251,8	2620		

2.2.1.2. İzolasyon çalışmaları

Sediment ve toprak örneklerinden aktinomiset izolasyonu, Ravel ve arkadaşları (1998), Amoroso ve arkadaşları (1998, 2000) ile Mengoni ve arkadaşları (2001) tarafından da önerilen klasik yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Buna göre, sediment örnekleyicisi ile alınan örnekler, belirli oranlarda seyreltilerek izolasyon amacı ile kullanılan seçici besi ortamlarının bulunduğu petrilere inoküle edilmişlerdir.

Metalik maden yataklarından alınan toprak örneklerinden aktinomiset izolatlarının eldesi, seyreltme plaka tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Toprak örnekleri kurutulduktan sonra 10 g toprak örneğinin steril FTS kullanılarak seyreltilmesi ile hazırlanan 10^3 - 10^6 oranlarındaki seyreltme serisi izolasyon amacı ile kullanılmıştır. İzolasyon çalışması öncesi gerçekleştirilen bazı ön işlemler ve besiyeri bileşimi, izolasyon ortamındaki aktinomiset koloni sayısını arttırdığı gibi, kontaminant bakteri ve fungusların sayısını düşürmektedir. Çalışmada, bu amaca hizmet eden yöntemlerden yararlanılmıştır. Bu amaçla kullanılan yöntemlerden ilki, seyreltme plaka yöntemi uygulanırken, kontaminant mikroorganizmaların sayısını azaltabilmek için ilk dilüsyonların 65 °C lik su banyosunda 10 dakika bekletilmesi olmuştur. Bu yolla içerdiği spor oluşturmeyen bakterilerin sayıları düşürülen seyreltmeler, aktinomiset izolasyonu amacı ile kullanılmışlardır. İzolasyon amacı ile inoküle edilen petrilere 25 °C de 2–3 hafta süre inkübe edilmiştir. Tüm izolasyon çalışmalarında besiyeri olarak Yeast Extract Malt Extract Agar, İnorganik Tuz Nişasta Agar (ISP 4) ve Küster ve Williams (1964) tarafından seçici besiyeri olarak önerilen Nişasta Kazein Agar kullanılmıştır.

İnkübasyon sırasında ve sonrasında, izolasyon petrilere aktinomiset görüntüsü veren koloniler cycloheximide (50 µg/ml) içeren İnorganik Tuz Nişasta Agar (ISP 4) petrilere inoküle edilmiştir. Bu işlem renk ve morfolojik özelliklerine göre temsilci örnekler seçilerek saf aktinomiset kolonileri elde edilinceye kadar tekrarlanmıştır.

2.2.1.3. Aktinomiset izolatlarının korunması

Elde edilen aktinomiset izolatları, izole edildikleri lokaliteler ve lokalitedeki izolat numarasını içerecek biçimde kodlanarak Yeast Extract Malt Extract Agar içeren tüplerde sporlanmış kültürler halinde korunmuşlardır. Buzdolabında, 4 °C’ de korunan

kültürler, 2-10 hafta aralıklarla yenilenmişlerdir. Ayrıca %20' lik gliserol süspansiyonuna aktarılan spor ve/veya misel süspansiyonları da -20°C ' de korunmuşlardır.

2.2.2. İzolatların çeşitli metallere olan direncinin katı ve sıvı besi ortamlarında belirlenmesi

Saflaştırma işleminden sonra elde edilen aktinomiset izolatlarının çeşitli metallere karşı dirençleri; kalitatif, yarı kantitatif ve kantitatif olmak üzere üç farklı yöntemle ve ardışık üç aşamada belirlenmiştir. Direnç seviyesi belirlenecek olan izolatlar, her üç yöntem için spor süspansiyonu halinde inoküle edilmişlerdir. Spor süspansiyonlarının hazırlanması amacı ile stok kültürlerden yeast extract – malt extract petrilere ekim yapılarak 7 gün boyunca 25°C ' de inkübasyona bırakılmışlardır. Inkübasyon süresi sonunda steril ringer çözeltileri kullanılarak spor solüsyonları hazırlanmıştır. Elde edilen spor süspansiyonları her üç yöntem ile metal direncinin tayininde inokülant olarak kullanılmışlardır.

2.2.2.1. Metal direncinin kalitatif tayini

İzolatların metal direncinin ilk tayini, metal içeren katı minimal mediumda (MM) büyümenin olma ya da olmama durumlarına göre belirlenmiştir. Bu amaçla petrinin ortasında açılan 25 mm' lik çukur, 300 μl metal solüsyonu ile doldurulmuştur. Bu çukura dik çizgiler biçimde 10' ar μl spor solüsyonu inoküle edilmiştir. İnokülasyon sonunda 7 gün süresince 25°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnokülasyon sonunda inokülasyonun yapıldığı hat boyunca bir gelişim gözlenmesi, metale olan dirençlerinin göstergesi olarak değerlendirilmiştir (Ravel et al., 1998). Bu amaçla Pb, Zn, Fe, Ni, Cd, Hg, Co ve Cu gibi metallerin belirli konsantrasyonları kullanılmıştır (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4. Aktinomiset izolatların katı besiyerinde metal toleranslarının belirlenmesi amacı ile kullanılan metaller ve konsantrasyonları

Metal	Kullanılan Bileşik formu	Kullanılan konsantrasyon (mg/l)
Nikel	Ni(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	10, 50, 100, 200, 1000
Kobalt	CoCl ₂	
Çinko	ZnCl ₂	
Bakır	CuSO ₄ .5H ₂ O	
Demir	FeSO ₄ .7H ₂ O	
Kadmium	CdCl ₂	5, 10, 50, 100, 200
Civa	HgCl ₂	
Kurşun	Pb(NO ₃) ₂	

Her deneme, 3 paralel halinde çalışılmış olup, izolatların metal içeren besi ortamında büyüme özellikleri metal içermeyen besi ortamındaki büyüme oranları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Bu çalışma sonucunda birden fazla metalin varlığında büyüme gösteren izolatlar bir sonraki aşamada kullanılmışlardır.

2.2.2.2. Metal direncinin yarı kantitatif tayini

Çalışmanın bu aşamasında kalitatif tayin yöntemi ile dirençli olduğu belirlenen izolatlar, spor süspansiyonu halinde katı haldeki büyüme ortamına inoküle edilmiş ve tüm yüzeye yayılmıştır. Bu petrinin yüzeyine, farklı konsantrasyonlarda metal solüsyonu emdirilmiş 6 mm çapındaki filtre kağıtları (S&S) yerleştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonrasında (25 °C sıcaklık, 7 gün) disk çevresinde oluşan inhibisyon çapları ölçülerek, diğerlerinden dirençli olan izolatlar seçilmiştir (Mills, 1997; Amoroso et al., 1998).

2.2.2.3. Metal direncinin kantitatif tayini

Bu aşamada, önceki aşamalar ile seçilen 7 aktinomiset izolatı (112, 113, 206, 227, 234, 236, 723) kullanılmıştır. Hazırlanmış spor süspansiyonları, belirli konsantrasyonlarda çeşitli metalleri (Ni, Zn, Pb) içeren sıvı MM mediuma % 4 oranında inoküle edilmişlerdir.

Kültürler 27 °C' de, 100 rpm çalkalama hızında 4 gün inkübe edildikten sonra bir süzme kağıdı yardımıyla hücreler besiyerinden süzülerek ayrılmıştır. 25 mM Tris-EDTA tamponu ile (pH 8.0) yıkanmışlardır. Elde edilen biyokütle 70 °C de sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutularak kuru ağırlığı belirlenmiştir (Amoroso et al., 1998). Toleransın ifadesi olarak, metal içeren ve içermeyen ortamlar arasındaki büyüme oran farkı sunulan formül ile hesaplanmıştır. Böylece metal varlığında büyümeye devam etme özelliği, denenen aktinomiset izolatlarının metal toleransını sayısal olarak ifade eden bir özellik olarak değerlendirilebilmiştir.

Formül 2.1. Ağır metal içeren ortamda kütlece gelişim yüzdesinin hesaplanması

$$\text{Kütlece gelişim yüzdesi (\%)} = \frac{\text{Metal bulunan ortamda gelişen hücre kütlesi (g)}}{\text{Metal bulunmayan ortamda gelişen hücre kütlesi (g)}} \times 100$$

2.2.3. Metal direncinin biyosorpsiyon ile ilişkisinin belirlenmesi

Çalışmanın bu aşamasında üç farklı metal toleransı seviyesinde yer alan aktinomiset izolatları kurşun biyosorpsiyon kapasiteleri açısından karşılaştırılarak, metal toleransı ile biyosorpsiyon kapasitesi arasında bir ilişkinin varlığı sorgulanmıştır. Bu amaçla kalitatif, yarı kantitatif ve kantitatif metal toleransı çalışmalarında kullanılan toplam 20 adet aktinomiset izolatı karşılaştırılmıştır. Bu izolatların metal toleranslarının giderek arttığı öngörülerek bu 3 farklı gruptan temsilci örnekler seçilerek kurşun biyosorpsiyon kapasitesi açısından karşılaştırılmış ve sonuçlar istatistiksel yöntemler ile değerlendirilmiştir.

Çalışılacak olan izolatların spor solüsyonları hazırlanmıştır. 100 ml Yeast Extract Malt Extract Broth besiyeri %4 spor solüsyonu ile inoküle edilerek 125 rpm' de 27 °C sıcaklıkta 1 hafta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda besiyerindeki hücreler santrifüjlenerek çöktürülmüş ve 25 mM' lık Tris-EDTA (pH 8) tamponu ile yıkanarak 60 °C' de kurutulmuştur.

Elde edilen kuru hücreler öğütülerek 212 µ çapında partiküller haline getirilmiştir. Öğütülen hücrelerden 100 mg alınıp, 50 ml hacminde 100 mg/l Pb²⁺ (pH

5.0) çözeltilisine eklenerek 60 dakika boyunca 200 rpm' de karıştırılmıştır. Uygulama süresinin bitiminde, hücreler santrifüjlenerek ayrılmış, çözeltide kalan Pb^{2+} miktarı atomik absorpsiyon spektrofotometre yardımıyla belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, aşağıdaki genel eşitlik kullanılarak izolatların gramı başına biyosorpsiyon kapasitesi (mg metal/g hücre) değerinin (q) elde edilmesinde kullanılmıştır.

Kurşun biyosorpsiyon kapasitesi açısından karşılaştırılan 20 aktinomiset örneği arasında en yüksek kapasiteye sahip olduğu belirlenen bir izolat sonraki biyosorpsiyon çalışmaları için seçilmiştir. Seçilen izolat ile çeşitli yöntemler kullanılarak kurşun biyosorpsiyonu optimize edilmiştir.

Formül 2.2. Biyokütlenin biyosorpsiyon kapasitesinin hesaplanması

$$q \text{ (mg } Pb^{2+}/\text{g kuru biyokütle)} = \frac{V (C_i - C_e)}{M}$$

- q : Biyosorpsiyon kapasitesi (mg/g)
V : Örnek hacmi (l)
 C_i : Başlangıç metal iyonu konsantrasyonu (mg/l)
 C_e : Denge metal iyonu konsantrasyonu (mg/l)
M : Biyosorbent miktarı (g)

2.2.4. Seçilen bir aktinomiset izolatı ile kurşun biyosorpsiyonunun optimizasyonu

2.2.4.1. Biyosorbentin ve metal çözeltilerinin hazırlanması

Seçilen izolatın (723 kodlu izolat) batch (kesikli sistem), kolon (sürekli sistem) ve reaktörde kurşun (Pb^{2+}) biyosorpsiyonu çalışmaları, farklı özellikte biyosorbent tiplerini de kapsayacak biçimde araştırılmıştır. Kesikli ve sürekli sistemde kuru ve yaş biyosorbent tipleri kullanıldığı gibi, kolon sistemde agar ve sodyum alginat ile immobilize edilmiş hücreler de çalışmaya dahil edilmiştir.

Yaş ve kuru biyosorbentlerin hazırlanması için seçilen izolatın büyütülmesinde Yeast Extract Malt Extract Broth besiyeri kullanılmıştır. 125 rpm' de 27 °C sıcaklıkta 1 hafta süresince uygulanan inkübasyon işlemi sonrasında bakteriyal biyokütle sıvı

besiyerinden santrifüjleme işlemi ile ayrıldıktan sonra biyokütlenin bir kısmı doğrudan biyosorpsiyon işleminde kullanılmak üzere ayrılmış (yaş hücre) ve diğer kısım ise 60°C de kurutularak kuru biyosorbent olarak hazırlanmıştır (kuru hücre).

Hücrelerin agarda immobilizasyonu amacı ile sıcaklığı 50 °C ye getirilmiş 45 ml agar solüsyonu (FTS ile hazırlanmış) üzerine 5 ml hücre süspansiyonu (10-30 mg kuru hücre/ml FTS) ilave edilerek iyice karıştırılmış, 9 cm çapında petri kaplarına dökülerek donması sağlanmıştır. Agar iyice donduktan sonra elekten geçirilmiş, serbest hücrelerin uzaklaştırılması amacı ile % 0.9' luk NaCl çözeltisinde iyice yıkanmıştır. Elde edilen immobilize hücreler % 0.9' luk NaCl çözeltisi ile yıkanarak 60 °C' de kurutulmuştur.

Hücrelerin sodyum alginatta immobilizasyonu amacı ile hücre süspansiyonu (10 g yaş hücre/100 ml distile su) 1:1 oranında % 2 sodyum alginat ile karıştırılmıştır. Sodyum alginat karışımı yine 1:1 oranında 0.7 M CaCl₂ çözeltisi içine damlatılarak hücrelerin tutuklandığı boncuklar elde edilmiştir. Immobilizasyon sonucunda boncuklar bol distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra bu boncuklar, 60 °C' de kurutulduktan sonra öğütülerek 150 µ' luk partiküller haline getirilmiştir. Her iki immobilizasyon tipinde hücre içermeyen kontroller de çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmada kullanılan Pb²⁺ iyonu çözeltileri Pb(NO₃)₂' dan hazırlanan 1000 mg/l' lik stok çözelti kullanılarak gerekli konsantrasyonlara, seyreltme yoluyla hazırlanmıştır. Çözeltilerin istenen pH değerlerine ayarlanması amacı ile 0,1 M HNO₃ ve 0,1 M NaOH çözeltileri kullanılmıştır.

2.2.4.2. Batch (Kesikli sistem) kurşun (Pb²⁺) biyosorpsiyonu

723 kodlu izolatın kuru biyomasının sulu çözeltilerden Pb²⁺ iyonlarının gideriminde kullanılabilirliğini incelemek amacıyla öncelikle kesikli sistem için optimum koşullar araştırılmıştır. Biyosorpsiyon çalışmalarında deneysel aşamalar sonunda biyokütle biyosorpsiyon ortamından santrifüjlenerek ayrılmış ve sıvı fazdaki metal iyonu konsantrasyonları Hitachi 180-70 model Alevli Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi (AAS) kullanılarak tayin edilmiştir. AAS de kurşun tayinleri 283.3 nm dalga boyunda, 1.3 nm spektral slit genişliği kullanılarak, 7.5 mA lamba akımı ile gerçekleştirilmiştir. Cihazın kalibrasyonu belli aralıklarla standart Pb²⁺ iyonu çözeltileri

ile kontrol edilmiştir. Biyokütlenin gramı başına biyosorpsiyon kapasitesi Bölüm 2.2.3' te sunulan genel eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

Biyosorpsiyon koşullarının optimizasyon çalışmaları 50 ml hacminde çözeltiler kullanılarak dijital kontrollü manyetik karıştırıcı ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.1). Biyosorpsiyona ortam pH' sının etkisi başlangıç pH' sı 1.0-5.0 aralığında çalışılarak incelenmiştir. Biyosorpsiyon deneyleri süresince ortam pH' sı ölçülerek pH değişimi izlenmiştir. Ayrıca bu sırada çözeltilere geçen Na^+ ve K^+ iyonlarının derişimleri tayin edilmiştir. Pb^{2+} iyonlarının biyosorpsiyonuna biyosorbent konsantrasyonunun etkisi 0.4-6.0 g/l aralığında incelenmiş ve en yüksek biyosorpsiyon kapasitesinin elde edildiği değer optimum biyosorbent konsantrasyonu olarak kabul edilmiştir. Biyosorpsiyon denge süresi ise 5-120 dk zaman aralığında incelenerek değerlendirilmiştir. Başlangıç metal iyonu konsantrasyonunun biyosorpsiyon kapasitesine etkisi 100-500 mg/l aralığında incelenmiş ve elde edilen denge verileri Langmuir ve Freundlich izoterm modellerine uygulanarak biyosorpsiyonun bu modellere uygunluğu araştırılmıştır.



Şekil 2.1. Aktinomiset izolatları ile batch sistemde kurşun (Pb^{2+}) biyosorpsiyonu

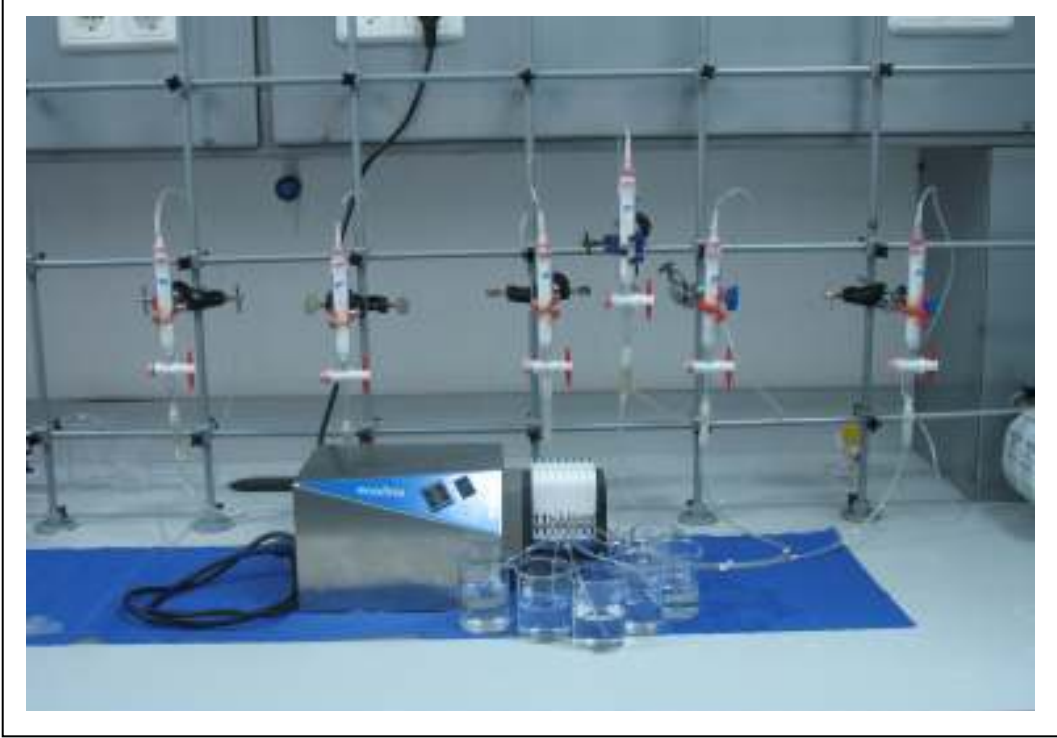
2.2.4.3. Sıkıştırılmış yatak kolonda (Sürekli sistem) kurşun (Pb^{2+}) biyosorpsiyonu

Çalışmada kullanılan bakteriyal izolatın kolon performansını değerlendirmek amacıyla, farklı kolon çapı, akış hızı, biyokütle tipi (yaş, kuru, immobilize) ve başlangıç metal konsantrasyonları gibi değişkenlerin seçilen izolatın sıkıştırılmış yatak kolondaki metal giderim potansiyeline etkisi belirlenmiştir (Şekil 2.2).

Kolon çapının biyosorpsiyon kapasitesine etkisi 9, 11, 13, 19 mm çaplı kolonlar kullanılarak incelenmiştir. Bu amaçla 0.1 g kuru biyokütle farklı çaptaki kolonlara doldurulmuş, 100 mg/l, 50 ml Pb^{2+} çözeltisinin pH' ı 3.0' e ayarlandıktan sonra peristaltik pompa (Ismatec ecoline) yardımıyla 3 ml/dk akış hızında kolondan geçirilmiş ve elde edilen eluentteki Pb^{2+} miktarı Alevli-AAS cihazı ile tayin edilmiştir. En uygun kolon çapı belirlendikten sonra diğer parametreler sabit tutularak çözelti akış hızı 1-15 ml/dk aralığında değiştirilmiş ve en yüksek biyosorpsiyon kapasitesinin elde edildiği değer optimum akış hızı olarak belirlenmiştir. Başlangıç Pb^{2+} iyonu derişimi 100-500 mg/l aralığında değiştirilerek elde edilen verilerin Langmuir ve Freundlich izoterm modellerine ve kesikli sistemde elde edilen verilere uygunluğu değerlendirilmiştir.

Biyosorpsiyon kapasitesine biyokütle türünün etkisini incelemek amacıyla kuru biyokütle Na-alginat ve agar ile immobilize edilmiş ve immobilize sistemler optimum kolon koşullarında biyosorpsiyon kapasitesi açısından karşılaştırılmıştır. En yüksek biyosorpsiyon kapasitesine sahip immobilize biyokütle ile Pb^{2+} iyonlarının desorpsiyonu incelenmiştir.

Metal giderimi için optimum koşulların belirlenmesinden sonra, desorpsiyon ve kolonun tekrar tekrar kullanım etkinliğine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon için en uygun eluenti belirlemek amacıyla 0.1 M HCl, 0.1 M HNO_3 ve 0.1 M EDTA çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltiler ile Pb^{2+} iyonlarının desorpsiyon verimi incelenmiştir. Immobilize sistemin tekrar kullanılabilirliği, biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüsünün ardışık 5 kez tekrarlanması ile araştırılmıştır.



Şekil 2.2. 723 kodlu izolat ile sıkıştırılmış yatak kolonda kurşun (Pb^{2+}) biyosorpsiyonu

2.2.4.4. Akışkan reaktör Sisteminde (CFST) kurşun (Pb^{2+}) biyosorpsiyonu

Daha büyük ölçekte biyosorpsiyon performansını değerlendirmek amacıyla, en yüksek biyosorpsiyon kapasitesine sahip Na-alginate ile immobilize edilen biyokütle ile Pb^{2+} giderimi belirlenen optimum koşullarda CFST sisteminde incelenmiştir (Şekil 2.3). Bu amaçla, 2.0 g kuru biyokütle 400 mg/l konsantrasyonunda 1000 ml Pb^{2+} çözeltisi ile CFST sisteminde 200 rpm hızında karıştırılarak, 1 ml/dk akış hızında muamele edilmiş ve belirli zaman aralıklarında sistemden örnek alınarak Pb^{2+} konsantrasyonları belirlenmiştir (Sağ et al., 2003).



Şekil 2.3. Aktinomiset izolatları ile reaktörde kurşun (Pb^{2+}) biyosorpsiyonu

2.2.5. Metal direncine ve/veya yüksek biyosorpsiyon kapasitesine sahip izolatların kemotaksonomik ve nümerik metodlarla identifikasyonu

Seçilen izolatların identifikasyonu amacı ile kemotaksonomik, nümerik ve moleküler metodlar uygulanmıştır. Bu amaçla, konu ile ilgili ana kaynak olan Bergey's Manual of Systematic Bacteriology' den yararlanılmıştır (Locci, 1989).

2.2.5.1. Aktinomiset izolatlarının kemotaksonomik özellikleri

İzolatlarımızın cins seviyesinde tanılanması için, kemotaksonomik çalışmalar ile bakterilerin hücre çeperinde bulunan diaminopimelikasit tipi belirlenmiştir (Becker et al., 1965; Stanek and Roberts, 1974). Bu amaçla, izolatlar, çoğaltılıp analiz için hazırlandıktan sonra, ince tabaka kromatografisi ile standarda karşı incelenmiştir.

2.2.5.1.1. Hücrelerin çoğaltılması ve analize hazırlanması

Hücre çeperi diaminopimelik asit tipi belirlenecek olan izolat, Tryptone-Yeast Extract Broth (ISP 1) içeren erlenlerde, 25 °C' de, 100 rpm çalkalama hızında 1-2 hafta süre ile çoğaltılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda MSE Mistral 2000 tip santrifüjde, 1600 gx' de santrifüjleme yolu ile toplanan hücreler, hatalı sonuca neden olabilecek partiküllerin uzaklaştırılması amacı ile, steril distile su ile yıkanarak tekrar santrifüjlenmiştir. Süpernatantın uzaklaştırılması ile elde edilen hücreler, kurutularak hidroliz aşamasında kullanılmıştır.

Hücrelerin hidrolizi amacı ile, kurutulmuş hücrelerden 50 mg kadarının aktarıldığı cam tüplere, 1 ml 6 N HCl ilave edilerek tüpün ağzı alev ile eritilerek kapatılmıştır. Hücreler, 100 °C' de, 18 saat süre hidrolizlendikten sonra, hidrolizat Schiecher & Schuell 589 filtre kağıdı ile filtre edilmiş ve iki kez 1ml distile su ile yıkanmıştır. Bu yolla elde edilen filtrat, 40 °C' de, rotary evaporatörde, vakum altında kurutulmuş ve elde edilen kuru ekstrakt, tekrar 1ml distile suda çözülmüştür. Bu işlemin HCl kokusu uzaklaşmaya kadar tekrarlanması ile elde edilen kuru ekstrakt, 0.3 ml distile suda çözülerek eppendorf tüplerine aktarılmış ve hidrolizat, partiküllerinin uzaklaştırılması için 5000 rpm' de 10 dakika süre ile santrifüjlenerek analize hazır hale getirilmiştir.

2.2.5.1.2. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Örneklerin diaminopimelik asit tipi, ince tabaka kromatografisi kullanılarak, standart ile karşılaştırılma yolu ile belirlenmiştir. Bu amaçla, analize hazırlanan örneklerden 5 µl kadarı, mikrokristal sellüloz (Merck 2330) ile 0.3 mm kalınlığında 20x20 cm boyutlarında hazırlanan tabakalara emdirilmiştir. Referans olarak, 5 µl DL- α - ϵ -diaminopimelik asit (Sigma 1377) kullanılmıştır. Çözücü olarak, metanol: su: 10 N HCl: piridin (80: 17.5: 2.5: 10; ml/ml) kullanılarak, tabakalar 3-4 saat gelişmeye bırakılmıştır. Süre sonunda kurutulan plakalar, %0.2' lik asetonik ninhidrin ile spreylenecek 100 °C' de 5 dakika süre ile kurutulmuştur. Diaminopimelik asitler, diğer aminoasitlerden, oluşan grimsi yeşil renk ve bu rengin 24 saat sonra sarıya dönüşümü ile ayırt edilmiştir.

2.2.5.2. Aktinomiset izolatlarının nümerik taksonomisi

Elde edilen aktinomiset izolatlarının nümerik taksonomisine yönelik olarak gerçekleştirilen çalışmalar, izolatların renk gruplarının belirlenmesi, nümerik testlerin uygulanması ve nümerik testlerden elde edilen verilerin istatistiksel analizi olmak üzere üç alt başlıkta değerlendirilebilir.

2.2.5.2.1. İzolatların renk gruplarının belirlenmesi

İzolatların renk gruplaması, oatmeal agar (ISP 3), İnorganik Tuz–Nişasta Agar (ISP 4), Pepton–Yeast Extract–İron Agar (ISP 6) ve Tirozin Agar (ISP7) besiyerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzolasyon çalışmaları ile elde edilen tüm aktinomiset izolatları, cycloheximide (50 µg/ml) ilave edilen besiyerlerine inoküle edilmiş ve 25 °C’ de 2 hafta süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, ISP 3 ve 4 besiyerlerinde büyüyen kolonilerin, havasal misel, substrat miseli ve çözünür pigment renkleri; ISP 6 ve ISP 7 besiyerinde ise, melanin pigmenti üretme özellikleri belirlenmiştir. İzolatların oluşturdukları pigment renkleri, Inter-Society Colour Council National Bureau of Standarts (ISCC-NBS) Colour Name Charts (Unated States Department of Commerce, Gaithersberg, Maryland, U.S.A.) katalogu kullanılarak saptanmıştır. İzolatlar, ilgili besiyerinde oluşturdukları renklere göre gruplandırılmıştır. Daha sonra, nümerik taksonomik çalışmalarda kullanılmak üzere test organizması olarak renk gruplarından temsilci izolatlar seçilmiştir.

2.2.5.2.2. Nümerik Taksonomi testleri

Nümerik taksonomik çalışmalar aksi belirtilmedikçe konu hakkındaki temel literatürler olan Williams et al. (1983a, b) ve Langham et al. (1989) da belirlenen yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İnokülant olarak İnorganik Tuz Nişasta Agar (ISP 4) besiyerinde 14 gün büyütülmüş test organizmalarının ringer çözeltisinde hazırlanan spor süspansiyonları kullanılmıştır. Test organizmaları multipoint inokülatör kullanılarak steril plastik petri kaplarında bulunan besi ortamlarına aktarılarak testin gerektirdiği süre inkübe edilmiş ve uygun yöntemler kullanılarak testlerin sonuçları alınmıştır (Şekil 2.4).

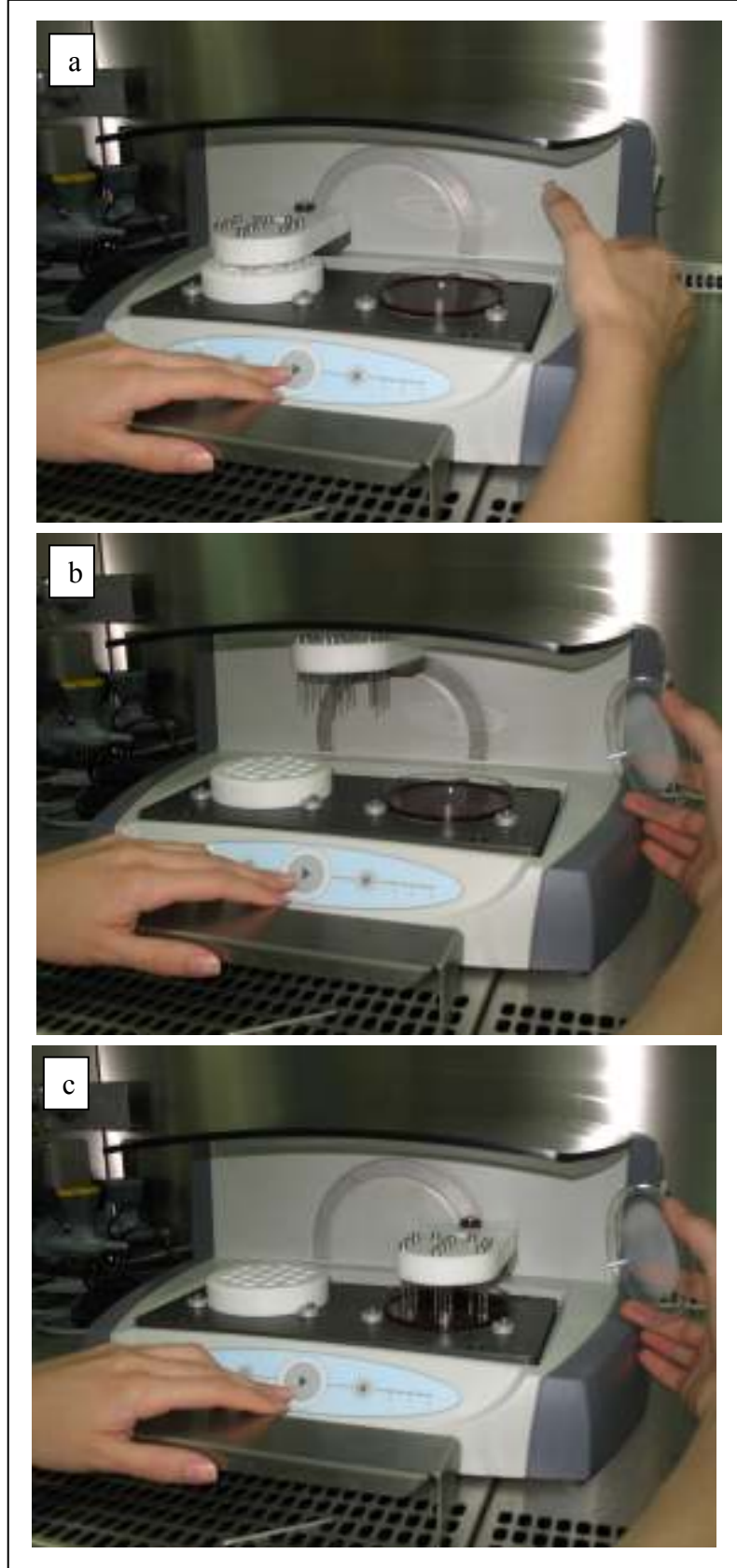
Streptomyces türlerinin nümerik metodlarla sınıflandırma/identifikasyonlarını içeren bu literatürlerde önerilen kültürel, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal karakterler kullanılmıştır. Bu amaçla, denemeye alınan tüm test suşları toplam olarak 138 birim karakter açısından değerlendirilmiştir.

1. Degradasyon testleri

Degradasyon testlerine konu olan toplam 13 substrat ve substratların kullanılan konsantrasyonları Çizelge 2.5’ de sunulmuştur. Tirozin, Adenin, Xylan, Xanthine, Hipoksantin ve Guanine degradasyonu için basal ortam olarak Modifiye Bennett Agar ortamı kullanılmıştır. İnkübasyonlar, 25 °C’ de 14 gün gerçekleştirilmiş, koloninin çevresinde ya da altında oluşan renk açılımı, pozitif sonuç olarak belirlenmiştir (Şekil 2.5).

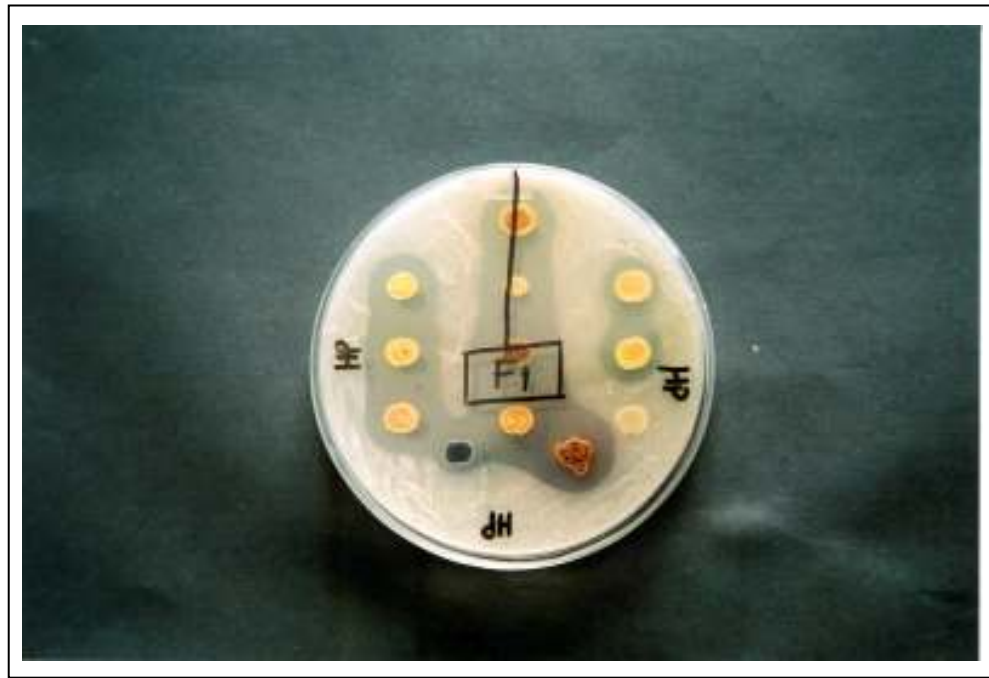
Çizelge 2.5. Degradasyon testlerinde kullanılan substratlar ve konsantrasyonları

Substrat	İnkübasyon (Gün)	Konsantrasyon (%, w/v)
Nişasta	7	1
Kazein (% 15 Skim milk’ te)	7	1
Tirozin	14	0.5
Adenin	14	
Jelatin	7	0.4
Xylan	14	
Xanthin	14	
Hypoxanthine	14	
DNA	14	0.2
Esculin	14	0.1
Arbutin	14	
Tween 80	14	
Guanine	14	0.05



Şekil 2.4. Multipoint inokülatör ile çoklu ekim yöntemi a. Spor süspansiyonlarından örnek alınması, b. İnokülanın aktarılması, c. Spor süspansiyonlarının petriye inokülasyonu.

Jelatin degradasyonu için, Modifiye Bennett Agar besisi ortamında 25 °C' de 7 gün inkübasyondan sonra %3 (w/v)' lük trikloroasetik asit (TCA) ilavesi ile saptanmıştır. Protein denatürasyonu sonucu oluşan opak renk jelatin varlığını göstermektedir. Bu nedenle, koloni çevresinde oluşan açık renkli zon, pozitif (+) değer olarak kabul edilmiştir.



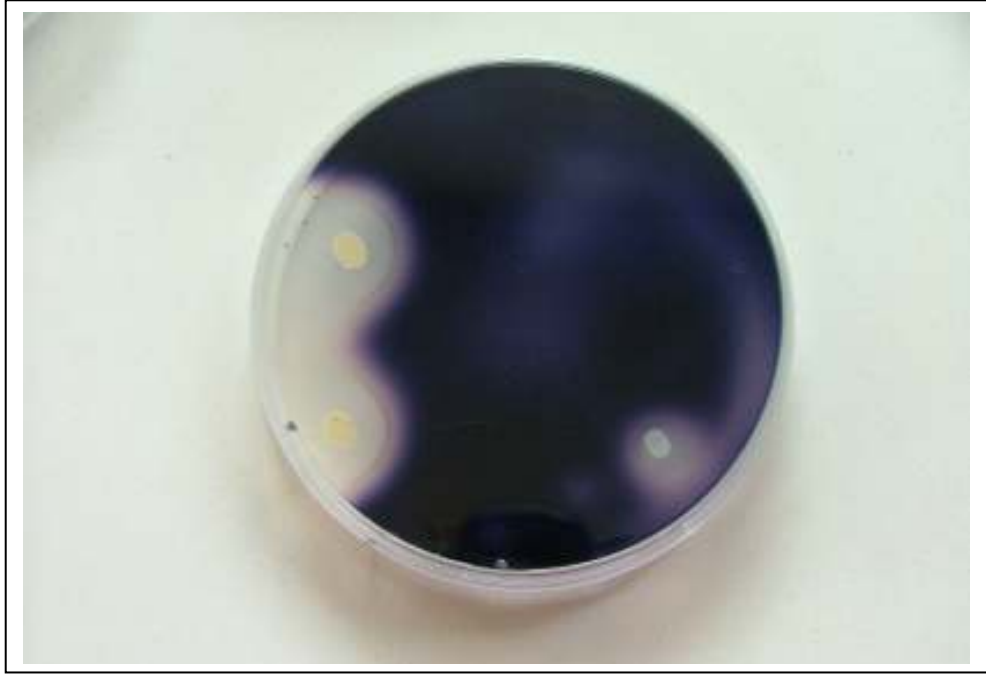
Şekil 2.5. Hipoksantin degradasyonu sonucu koloni çevresinde oluşan renk açılımı

Nişasta degradasyonu, aynı ortamda 7 gün inkübasyondan sonra besiyeri yüzeyine iyot solüsyonu ilavesi ile belirlenmiştir. Çevresinde açık renkli zon oluşan test organizmaları pozitif (+), açık renkli zon oluşmayanlar ise negatif (-) olarak değerlendirilmiştir (Şekil 2.6).

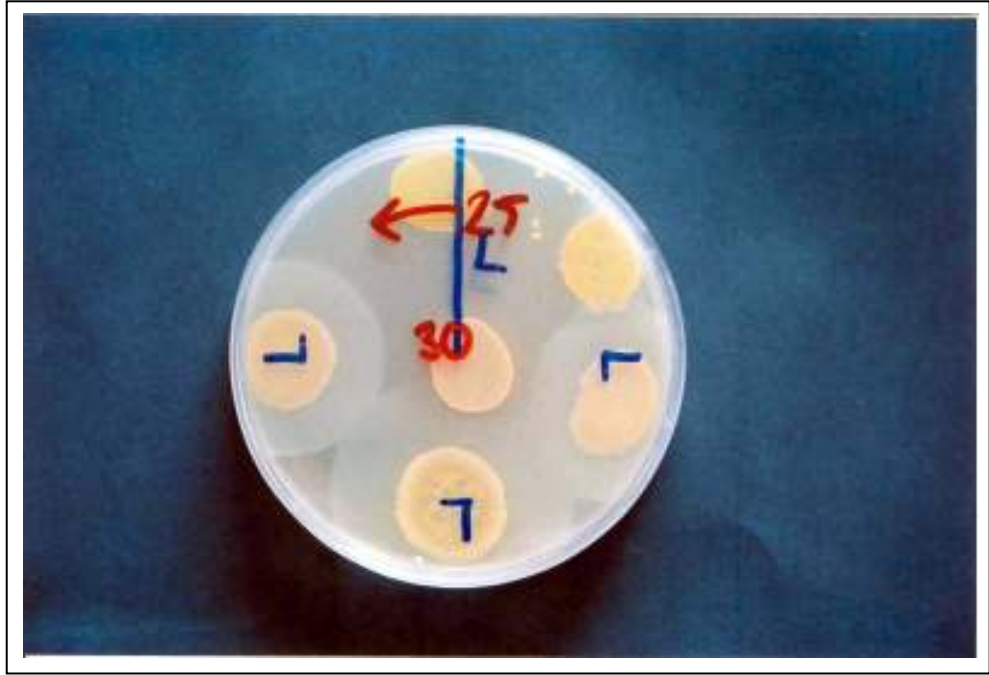
Esculin ve arbutin degradasyonu deney tüplerinde gerçekleştirilmiş olup, bu substratları içermeyen ortam negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Test organizmaları substrat içeren ve içermeyen her iki tüpe de inoküle edilerek 25 °C' de 2 hafta inkübe

edilmişlerdir. İnkübasyon süresinin sonunda negatif kontrolden farklı olarak oluşan koyu kahverengi-siyah renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

DNA hidrolizi, DNase test agar da 25 °C' de 7 gün inkübasyondan sonra 1 M HCl ilavesi ile belirlenmiştir. Koloni çevresinde oluşan açık renkli zon pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir.



şekil 2.6. İyot solüsyonu ilavesi ile belirlenen nişasta degradasyonu



Şekil 2.7. Koloni çevresinde oluşan opak zon ile belirlenen lesitinaz aktivitesi

Lesitinaz testi, Nitsch ve Kutzner (1969) tarafından belirlenen yöntem ile egg yolk medium da belirlenmiştir. Test organizmaları her petriye 6 adet olacak biçimde inoküle edilerek 25 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. Aktivite, inkübasyonun 2, 4 ve 6. günlerinde göz ile belirlenmiştir. Lesitinaz aktivitesi, yansıtılmış güçlü ışıktaki koloni çevresinde oluşan 5-10 mm çapında opak zon ile belirlenmiştir (Şekil 2.7).

Kazein ve Tween 80 degradasyonu için Modifiye Bennett Agar besi ortamı kullanılmıştır. Kazein için pozitif sonuç 25 °C' de 7, 14, 21 gün sonucunda oluşan şeffaf zon iken tween 80 için 3, 7 veya 14 gün sonucunda koloni etrafında oluşan opaklıktır.

2. Biyokimyasal testler

Nitrat redüksiyonu deney tüplerinde dondurulmuş nitrat agar besiyerinde belirlenmiştir. İnkübasyon, 25 °C' de gerçekleştirilir. İnokülasyondan 7 ve 14 gün

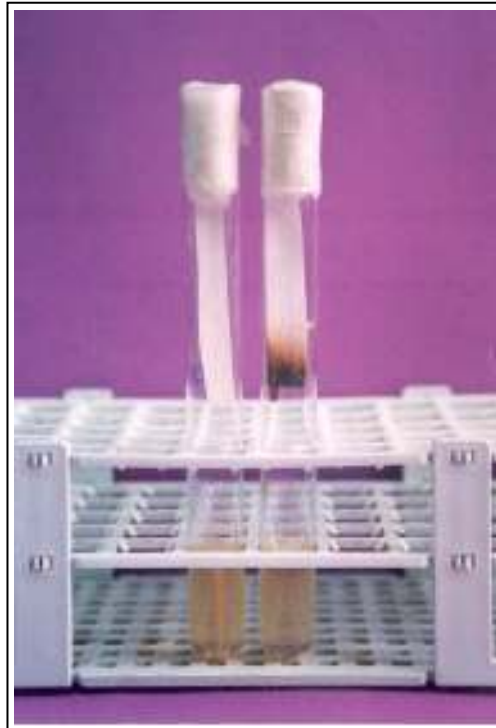
sonra ortama 0.2 ml Griess-Iloslav Reaktifi A (0.8 ml sülfanilik asit, 100 ml 5 N asetik asitte çözülür) ve 0.2 ml Griess-Iloslav Reaktifi B (0.6 ml dimetil- ∞ -naftilamin, 100 ml 5 N asetik asitte çözülür) ilavesi ile belirlenmiştir. B reaktifi ilavesinden sonra kırmızı renk oluşumu pozitif sonuç olarak kaydedilmiştir. Negatif olan tüplere çok az çinko tozu ilave edilmiştir. Çinko ilavesi ile oluşan kırmızı renk, ortamda halen var olan nitratın nitrite redüksiyonu nedeniyledir. Bu sonuç ise negatif olarak kaydedilmiştir (Şekil 2.8).

Hidrojen sülfür oluşumunu belirlemek için, nitrat redüksiyonunu belirlemede kullanılan kültür tüplerinin ağız kısmına, kurşun asetat spreyleme yoluyla hazırlanan kılavuz asetat şeritleri takılmıştır. İnokülasyon sonrası tüplerin ağzı parafilm ile kapatılmış, 25 °C' de 7 gün inkübasyondan sonra kağıt şeritlerde siyah renk oluşumu pozitif sonuçtur (Şekil 2.9).

Allantoin ve üre hidrolizi, besiyerinin pH değişimi ilkesine bağlı olarak belirlenir. Deney tüplerinde hazırlanan besiyerleri indikatör olarak fenol red içermektedir. İnokülasyon süresi sonunda, alkali ortam oluşumu nedeniyle besiyerinde oluşan koyu kırmızı-mor renge dönüşüm pozitif sonuçtur (Şekil 2.10).



Şekil 2.8. Nitrat redüksiyonu testi. Solda (4 numaralı tüp) pozitif sonuç, sağda (103 numaralı tüp) negatif sonuç, ortada kontrol (K)



Şekil 2.9. Hidrojen sülfür oluşumu testi. Pozitif (+) sonuç (sağda) , negatif (-) sonuç (solda)



Şekil 2.10. Üre hidrolizi testi. Pozitif sonuç (solda, 94 numaralı tüp) , negatif sonuç (sağda, 93 numaralı tüp), kontrol (ortada, K)

3. Beslenme testleri

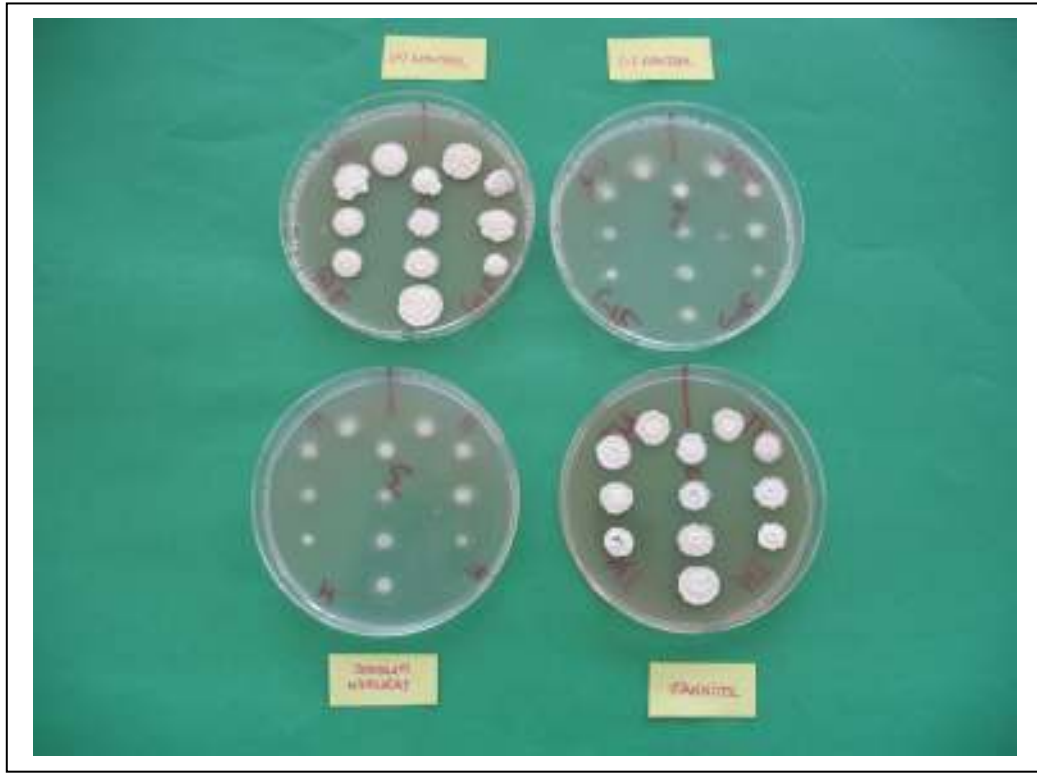
Test suşları, beslenme testleri kapsamında, çeşitli karbon ve azot kaynaklarını kullanabilme yetenekleri açısından incelenmiştir. Test mikroorganizmaları tarafından kullanılabilme özellikleri araştırılan karbon ve azot kaynakları ile kullanılan substrat konsantrasyonları, sırası ile çizelge 2.6 ve 2.7' de sunulmuştur.

Test suşlarının enerji ve büyüme gereksinimleri için 28 farklı karbon kaynağını kullanabilme yetenekleri, Shirling ve Gottlieb tarafından önerilen biçimde (1966) denenmiştir. Tindalizasyon ile steril edilen karbon kaynakları, bazal mediauma uygun konsantrasyonda ilave edilmiştir (Çizelge 2.6). Herhangi bir test maddesi içermeyen basal medium negatif kontrol; D-Glukoz (%1) içeren basal medium ise pozitif kontrol olarak denemeye dahil edilmiştir.

Çizelge 2.6. Karbon kaynağı testlerinde kullanılan substratlar ve konsantrasyonları

Substrat	Konsantrasyon (%, w/v)	Substrat	Konsantrasyon (%, w/v)
Adonitol	1	Trehaloz	1
D-Fruktoz		Sellobioz	
D-Galaktoz		D-melibiose	
D-Ksiloz		Dekstran	
Laktöz monohidrat		Xylitol	
Maltoz		D-melezitoz	
D-Mannoz			0.1
İnulin		Sodyum Asetat	
L-Arabinoz		Sodyum Piruvat	
L-Ramnoz		Sodyum Sitrat	
D-Mannitol		Sodyum Hıppurat	
Meso-İnositol		Sodyum Tiyosülfat	
Raffinoz		Sodyum Propionat	
Salisin		L-tartarik asit	
Sukroz			

Sonuçlar, 25 °C’ de gerçekleştirilen inkübasyonun 7. ve 14. gününde test maddesi içeren mediumdaki büyüme ile pozitif ve negatif kontrollerdeki büyüme karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Negatif kontrolden daha fazla veya pozitif kontrole benzer büyümenin gerçekleşmesi pozitif sonuç olarak kaydedilmiştir. Negatif kontrol ile eşit ya da daha az büyüme ise, negatif sonuç olarak belirtilmiştir (Şekil 2.11).



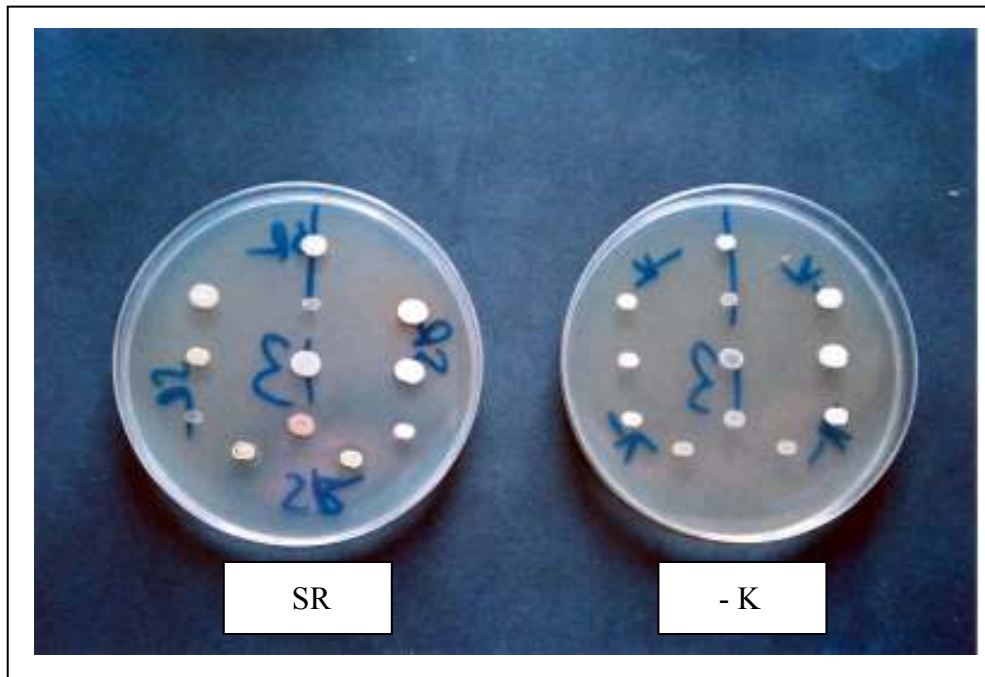
Şekil 2.11. Aynı test suşlarının 2 farklı karbon kaynağında büyüme özellikleri. -K: Karbon kaynağı içermeyen bazal medium, +K: Karbon kaynağı olarak D- glukoz içeren bazal medium

Test suşlarının 16 farklı azot kaynağını kullanabilme yetenekleri, Williams ve arkadaşları tarafından önerilen biçimde (1983a) denenmiştir (Çizelge 2.7). Azot kaynakları tinalizasyon ile sterilize edildikten sonra basal mediauma ilave edilmiştir. Basal mediauma %0.1 (w/v) oranında test edilen azot kaynağı ilavesi ile hazırlanan test ortamı, test suşları ile multipoint inokülatör kullanılarak inoküle edilmiştir.

Çizelge 2.7. Azot kaynağı testlerinde kullanılan substratlar

Substrat			
L-Arginin	L-Treonin	L-metionin	L-hidroksiprolin
Potasyum Nitrat	L-Serin	L-Histidin	L-tirozin
L-Sistein	L-Fenilalanin	Hipoksantin	Safranin
L-Valin	L-alanin	L-izolösin	DL- α -Aminobutirikasit

Herhangi bir test maddesi içermeyen bazal medium, negatif kontrol; L-Asparagin içeren bazal medium ise pozitif kontrol olarak denemeye dahil edilmiştir. Sonuçlar, inkübasyonun 7. ve 15. gününde, test maddesi içeren mediumdaki büyüme ile pozitif ve negatif kontrollerdeki büyüme karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Pozitif sonuç, negatif kontrolden daha fazla büyümenin gerçekleşmesidir. Negatif kontrol ile eşit ya da daha az büyüme negatif sonuç olarak kaydedilir (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Aynı test suşlarının azot kaynağı olarak Serin' i kullanma özellikleri. -K: Azot kaynağı içermeyen bazal medium, SR: Serin

4. Fizyolojik testler

İzolatların farklı sıcaklık (4, 10, 37 ve 45 °C), pH (4, 5, 9 ve 10) koşullarında ve çeşitli kimyasal inhibitör ve antibiyotiklerin varlığında büyüme özellikleri Modifiye Bennett's Agar' da incelenmiştir. Test edilecek kimyasal inhibitör ve antibiyotikler, Modifiye Bennett's Agar' a uygun konsantrasyonda ilave edilmiştir (Çizelge 2.8). Herhangi bir test maddesi içermeyen medium pozitif kontrol olarak denemeye dahil edilmiştir.

İzolaların 4 ve 10 °C’ de büyüme özellikleri 4 haftalık, belirtilen diğer testler için ise 2 haftalık inkübasyon süreci sonunda kaydedilmiştir. Bu koşullarda büyümenin gözlenmesi pozitif sonuç büyümenin gözlenmemesi ise negatif sonuç olarak kaydedilmiştir (Şekil 2.13–2.16).

Çizelge 2.8. Fizyolojik testlerde kullanılan inhibitör ve antibiyotikler ile konsantrasyonları

İnhibitör	Konsantrasyon (%, g/ml)	Antibiyotik	Konsantrasyon (µg/ml)
Sodyum Klorid	10	Oleandomisin	100
	13		50
Sodyum Azid	0.01	Streptomisin sülfat	100
	0.02		50
Feniletanol	0.1	Neomisin sülfat	50
	0.3		25
Potasyum Tellürit	0.001	Rifampicin	50
	0.01		25
Sodyum Biselenit	0.001	Penicillin G	10 i.u.*
	0.005		5 i.u
Çinko klorid	0.01	Nalidixic acid	10
Fenol	0.1	Chloramphenicol	20
Kristal Violet	0.001		10
		Ampicillin	50
			25

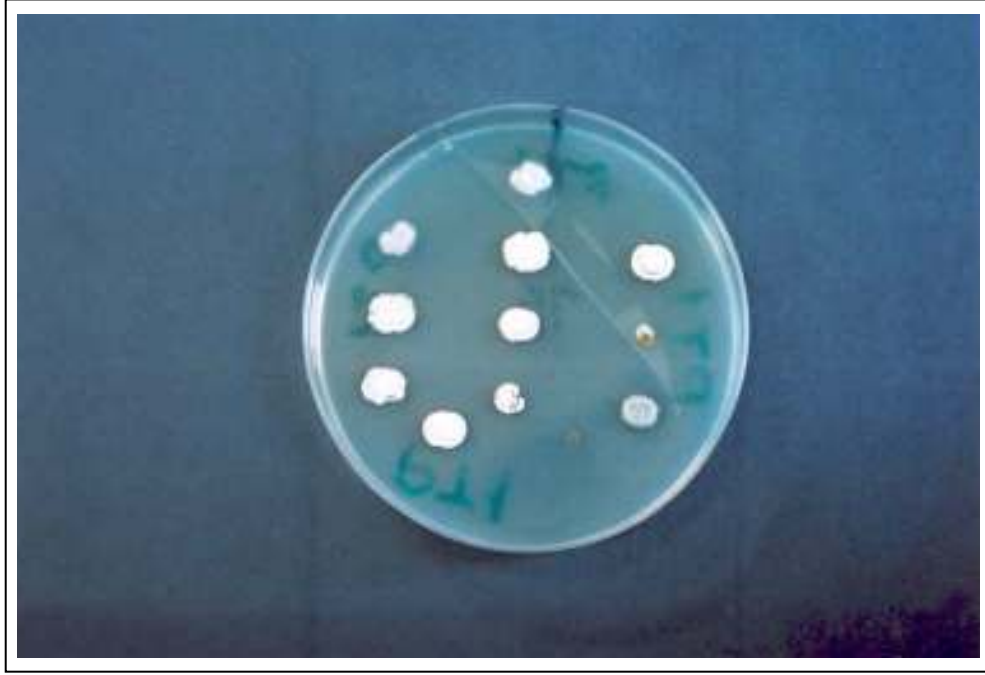
* 1 mg: 1667 unit



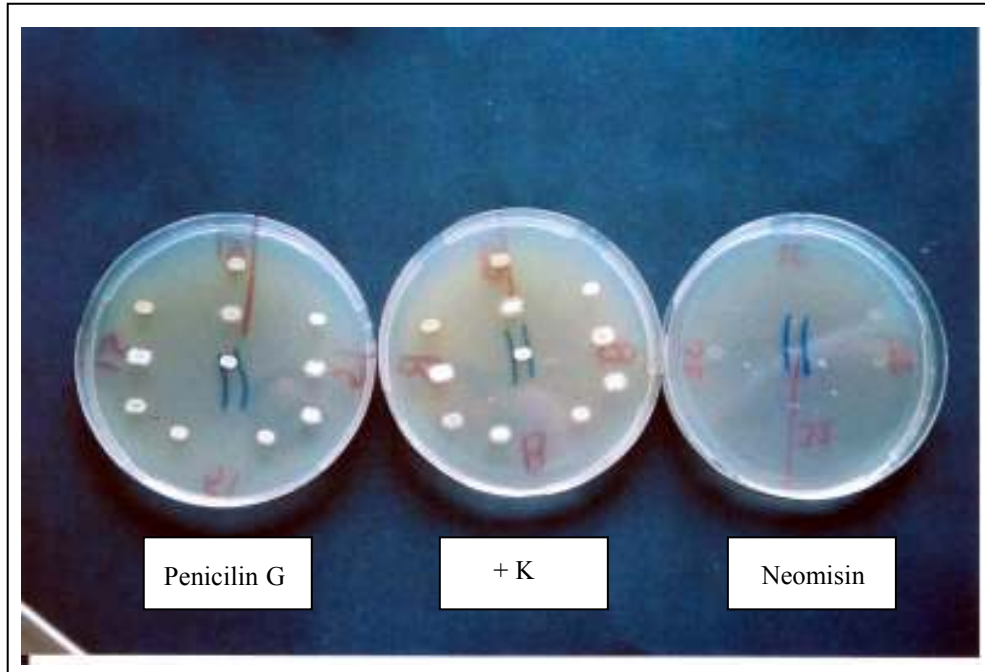
Şekil 2.13. Test suşlarının pH 9 da büyüme özellikleri



Şekil 2.14. Test suşlarının besi ortamında fenol varlığında büyüme özellikleri



Şekil 2.15. Test suşlarının besi ortamında potasyum tellürit varlığında büyüme özellikleri



Şekil 2.16. Aynı test suşlarının 2 farklı antibiyotik varlığında büyüme özellikleri. Solda (51 numaralı petri) 20 i.u./ml Penicilin G içeren besiyeri, ortada antibiyotik içermeyen Bennets Medium, sağda (32 numaralı petri) 25 µg/ml Neomisin sülfat içeren besiyeri

5. Antimikrobiyal aktivite testleri

İzolatların çeşitli test mikroorganizmalarına (Çizelge 2.9) karşı olası antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için, test suşları nutrient agar petrilere spot biçiminde inoküle edilmiştir. Her petriye 6 test suşu inoküle edilerek 25 °C’ de 5 gün süre ile inkübe edilmiştir.

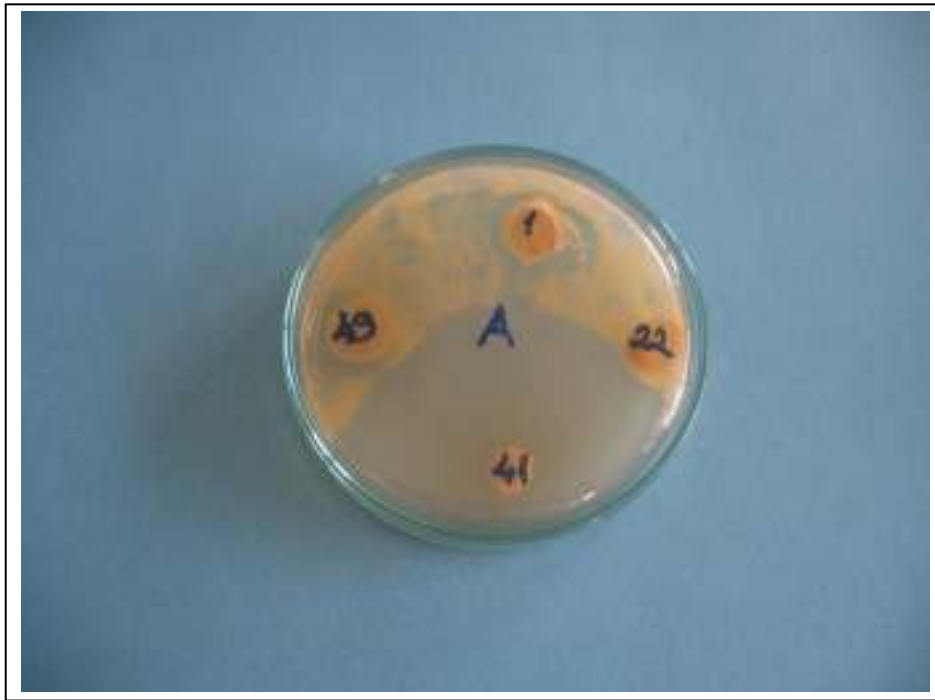
İnkübasyon süresi sonunda büyüme içeren petriler, 3-5 ml kloroform üstüne ters çevrilip konarak 40 dakika bekletildikten sonra, fazla kloroform buharı steril kabinde uçurulmuştur. Test organizmaları ile inoküle edilmiş olan 5 ml “yumuşak” agar büyümenin üzerine aktarılarak katılaşması sağlanmıştır. Bakteri ve mayaların 37 °C’ de 24 saat, küflerin 25 °C’ de 4 gün inkübasyonundan sonra, izolat kolonisi çevresinde belirlenen berrak zon, pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Şekil 2.17).

Çizelge 2.9. Test suşlarının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan test mikroorganizmaları

Test Mikroorganizması	Suş Numarası	
Bakteri	<i>Micrococcus luteus</i>	NRRL B - 1018
	<i>Bacillus subtilis</i>	NRRL B - 209
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NRRL B - 4268
	<i>Escherichia coli</i>	ATTC 25922
	<i>Proteus vulgaris</i>	NRRL B - 123
	<i>Enterobacter faecium</i>	NRRL B - 2354
	<i>Salmonella typhimurium</i>	NRRL B - 4279
Fungus	<i>Candida albicans</i>	NRRL Y -12983
	<i>Geotrichum candidum</i>	NRRL Y - 552
	<i>Candida utilis</i>	NRRL Y - 900
	<i>Rhodotorula rubra</i>	NRRL Y - 2505
	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Doğal izolat

6. Morfoloji ve pigmentasyon

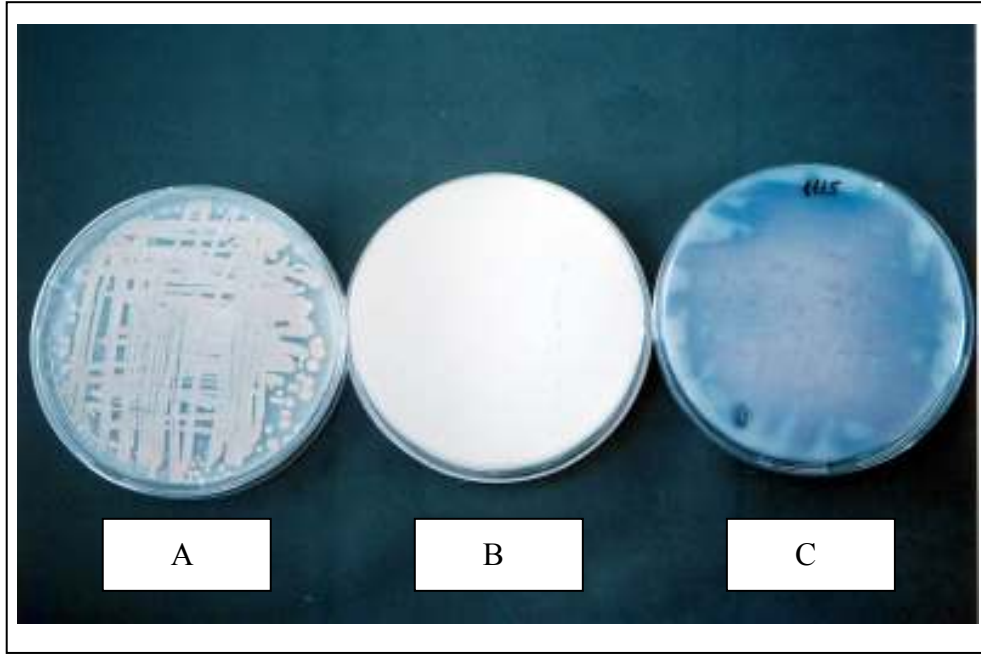
Test suşlarının morfolojik ve pigmentasyon özellikleri, Shirling ve Gottlieb (1966) tarafından önerilen besiyerlerinin ve yöntemlerin kullanımı ile belirlenmiştir. Pigmentasyon testlerinde test suşlarının inorganik tuz nişasta agar (ISP 4) besiyerinde 25 °C’ de 14 gün inkübasyon sonunda oluşturdukları havasal misel ve spor renkleri, substrat misel renkleri ve çözümlü pigment renkleri belirlenmiştir (Şekil 2.18). Havasal misel ve spor renkleri için, beyaz, gri, kahve, kırmızı, krem, pembe, sarı, siyah, yeşil; substrat misel renkleri için eflatun, gri, kahve, kırmızı, pembe, sarı, siyah, yeşil ve çözümlü pigment renkleri için eflatun, kırmızı, kahve, pembe ve sarı olarak kategorize edilmişlerdir.



Şekil 2.17. Çeşitli test suşlarının *Micrococcus luteus*’ a karşı antimikrobiyal aktivitesi

Test suşlarının morfolojik özelliği olarak, spor zincir morfolojileri belirlenmiştir. Bu amaçla, İnorganik Tuz–Nişasta Agar (ISP 4) besiyerinde 25 °C’ de büyütülen test suşları, inkübasyonun 21. gününde ışık mikroskobu ile 400x büyütmede incelenerek

gözlenmişlerdir. Spor zincirleri; düz-dalgalı zincirler (rectiflexibiles), ucu kanca ya da halka ile biten zincirler (rectinaculiaperti), spiral zincirler ve vertisiller olmak üzere 4 ana grupta değerlendirilmiştir.



Şekil 2.18. Bir aktinomiset izolatının İnorganik Tuz–Nişasta Agar (ISP 4) ortamında 14 günlük büyümesinde substrat ve havasal misel renkleri A. Havasal misel, B. Kontrol petrisi, C. Substrat miseli

Sonuç olarak, nümerik taksonomik çalışmalar toplam 44 taksonomik birim ile gerçekleştirilmiştir. Bunlardan 16 tanesi, izolasyon çalışması ile elde edilen ve renk gruplaması yolu ile tüm izolatlar arasından seçilen test suşlarıdır. İzolatların benzerliklerinin belirlenmesi açısından çalışmaya 28 adet *Streptomyces* tip örneği de dahil edilmiştir (Çizelge 2.10). Ayrıca, seçilen testlerin güvenilirliğini ve test hatasının belirlenmesi için izolat ve tip suşlarından rastgele seçilmiş 4 test suşu farklı kod numaraları verilerek çalışmaya duplikat olarak dahil edilmiştir (Çizelge 2.11). Tüm test suşları 138 birim karakter açısından değerlendirilmiştir. Bu aşamada test suşlarına uygulanan testler degradasyon, fizyolojik, biyokimyasal, büyüme, morfolojik ve pigmentasyon özelliklerine ilişkin bilgiler elde edilebilecek biçimde seçilmiştir. Elde edilen test sonuçları, pozitif (+) ya da negatif (-) olarak kodlanmıştır.

Çizelge 2.10. Aktinomiset izolatların tanılanması amacı ile kullanılan referans tip türler

İzolat No	ISP No	Referans Tip Tür İsmi
1	5073	<i>Streptomyces phoeochromogenes</i>
2	5081	<i>Streptomyces luridus</i>
3	5088	<i>Streptomyces niveus</i>
4	5099	<i>Streptomyces prasinus</i>
5	5109	<i>Streptomyces nodosus</i>
6	5112	<i>Streptomyces filipinensis</i>
7	5155	<i>Streptomyces glaurescens</i>
8	5188	<i>Streptomyces matensis</i>
9	5190	<i>Streptomyces goshikiensis</i>
10	5203	<i>Streptomyces fluorescens</i>
11	5230	<i>Streptomyces venezuelae</i>
12	5231	<i>Streptomyces rochei</i>
13	5234	<i>Streptomyces antibioticus</i>
14	5236	<i>Streptomyces griseus</i>
15	5242	<i>Streptomyces umbrosus</i>
16	5260	<i>Streptomyces rimosus</i>
17	5321	<i>Streptomyces kranskii</i>
18	5334	<i>Streptomyces olivaceoviridis</i>
19	5362	<i>Streptomyces cellulase</i>
20	5381	<i>Streptomyces viridis</i>
21	5438	<i>Streptomyces violaceolatus</i>
22	5445	<i>Streptomyces albidoflavus</i>
23	5454	<i>Streptomyces viridogenes</i>
24	5487	<i>Streptomyces lavenduligriseus</i>
25	5496	<i>Streptomyces diastaticus</i>
26	5517	<i>Streptomyces erythraeus</i>
27	5552	<i>Streptomyces omiyaensis</i>
28	5593	<i>Streptomyces fulvissimus</i>

Çizelge 2.11. Test hatasını belirlemek için kullanılan duplikatlar

Test Suşunun Adı	Kodu	Duplikat Kodu
<i>Streptomyces griseus</i>	M 5236	D 0001
<i>Streptomyces kranskii</i>	M 5321	D 0002
<i>Streptomyces sp.</i>	M 0109	D 0003
<i>Streptomyces sp.</i>	M 0534	D 0004

2.2.5.2.3. Nümerik testlerden elde edilen verilerin istatistiksel analizi

Toplam 44 test suşunun 138 birim karakter bakımından elde edilen verileri pozitif (+) ya da negatif (-) olarak kodlandıktan sonra IBM-PC uyumlu bilgisayarda X-Taxon programında kaydedildi. Duplike suşların da dahil olduğu +/- sonuçlar, 1/0 formatına dönüştürüldükten sonra NTSys-pc istatistiksel paket programı (Wishart, 1978) kullanılarak analizleri yapıldı. Test hatasının saptanması için test varyansının hesaplanmasından sonra (S_{i2} ; Sneath ve Johnson, 1972) duplike olarak seçilmiş suşlar son veri analizlerinden çıkarılmıştır.

Elde edilen veriler ışığında suşlar arasındaki benzerlik oranları hem + hem de – verileri eşit oranda değerlendiren S_{SM} (Simple matching coefficient; Sokal and Michener, 1958) katsayısı kullanılarak hesaplanmış, kümeleme ise Complete algoritmi ile oluşturulmuştur. Böylece, Türkiye’ nin çeşitli metalik maden yataklarından ve metal ile kirletilmiş ortamlardan izole edilmiş olan *Streptomyces* izolatlarının standart tip türler ile benzerlik dereceleri belirlenmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Metale Dirençli Aktinomiset İzolatlarının Eldesi

Çalışmanın aktinomiset izolasyonu aşaması 12 farklı lokaliteye ait toplam 42 farklı toprak/sediment örneği ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda toplam olarak 135 adet aktinomiset izolatu elde edilmiştir (Çizelge 3.1). Bu izolatların önemli bir kısmının ekonomik olarak metalik maden üretimi yapılan metal ocaklarından elde edilmiş olması, izolatların metal toleransı açısından potansiyelini ifade etmektedir. Uzun yıllardır metal eldesi için kullanılan Muratdere (Bilecik) ve Küre (Kastamonu) bakır ocakları, Balya kurşun ocağı (Balıkesir), Karaçam nikel – demir ocağından (Eskişehir) çok sayıda aktinomiset izolatu elde edilebilmiştir.

Çizelge 3.1. Metalik madenler açısından zengin örneklerden elde edilen aktinomiset izolatları

Lokalite İsmi ve Özellikleri	İlçe – İl	Sıra No	Kod ve Kaynak	Özellik	İzolat Numarası	Toplam İzolat Sayısı
Çimento Fabrikası	İnönü - Eskişehir	1	1.1.	Fabrikadan 50 metre	101, 102, 103	12
			1.2.	Fabrikadan 100 metre	104, 105, 107	
			1.3.	Fabrikadan 150 metre	109	
			1.4.	Hammadde (Klinker)	111, 112, 113, 114, 115	
Karaçam Köyü (Nikel –Demir Ocağı)	Sivrihisar - Eskişehir	2	2.1.	Ocak (Fe –Ni)	217, 218, 219	21
			2.2.	Tepe - Yüzey	213, 215, 216, 227, 230	
			2.3.	Etek - Yüzey	211, 231, 233	
			2.4.	Yol	206, 207, 208, 234, 235, 236	
			2.5.	Köy	201, 202, 203, 224	
Türkmenbaba Dağı	Eskişehir	3	3.1.	Ormaniçi Yol	301, 305	2
			4.1.	Ocak (Cu)	411, 412, 418	
Muratdere Köyü (Bakır Ocağı)	Bozfiytlük - Bilecik	4	4.2.	Ocak (Cu)	421, 422	5
			4.3.	Su ile taşınmış metal		
			5.1.	Ocak (Cu)	511	
Tüfekçikonak Köyü (Bakır Ocağı)	İnegöl – Bursa	5	5.2.	Ocak (Cu)	522, 524, 525, 526, 527	12
			5.3.	Ocak (Cu)	531, 532, 533, 534, 535, 536	
			6.1.	Ayrıldü Deresi, Silisli toprak yüzeyi	601, 603	
Mayıslar Köyü (Krom Ocağı)	Sarıcakaya - Eskişehir	6	6.2.	Silisli ve limonitli toprak (K.Ü.)	609, 610, 613, 614	18
			6.3.	Silisli ve limonitli toprak (K.A.)	615, 616, 620	

Çizelge 3.1. Metalik madenler açısından zengin örneklerden elde edilen aktinomiset izolatları (devam)

Lokalle İsmi ve Özelliği	İlçe - İl	Sıra No	Kod ve Kaynak	Özellik	İzolat Numarası	Toplam İzolat Sayısı
Mayıslar Köyü (Krom Ocağı)	Sarıcakaya - Eskişehir	6	6.4.	MTA 6 no' lu Sondaj Bölgesi, Polimetal	621, 622, 624, 625, 626, 627, 628	18
			6.5.	MTA 6 no' lu Sondaj Bölgesi, Krom	632	
			6.6.	Ayrıldü Deresi, Sülfürlü bozulmuş kayacı	633	
Karadeniz Bakır İşletmeleri Bakır Ocağı	Küre - Kastamonu	7	7.1.	Bakıbaşa Ocağı Limonitli toprak	701, 702, 704, 705, 706, 707	23
			7.2.	Bakıbaşa Ocağı Limonitli toprak	708, 709, 712, 713, 714	
			7.3.	Aşköy Ocağı	715, 717, 719, 720, 722	
			7.4.	Aşköy Ocağı	723	
			7.5.	Curuf - Polimetal bölgesi	725, 727, 728, 729, 732, 733	
Karabük Demir Çelik Fabrikası	Karabük	8	8.1.	Fabrikadan 100 metre	801, 803, 804, 805, 806, 807, 809, 811, 813	9
Akkonak Köyü	Amasra - Bartın	9	9.1.	Polimetal bölgesi	901, 902, 903, 908	4
			10.1.	Ocağın atık alanı (yüzey bölgesi)		
Balya Kurşun Ocağı	Balya - Balıkesir	10	10.2.	Ocağın atık alanı (dip bölgesi)	1006	4
			10.3.	Ocağın atık alanı (Curuf)	1003	
			10.4.	Ocağın alanı		
Porsuk Nehir Sistemi	Eskişehir	11	10.5.	Çökeltilme havuzu	1002, 1004	14
			11.1.	Sinerköy köprüsü (Kütahya girişi)	1101, 1102, 1103, 1104	
			11.2.	Sabuncupınar köprüsü (Porsuk barajı girişi)	1106, 1107, 1108, 1109	

Çizelge 3.1. Metalik madenler açısından zengin örneklerden elde edilen aktinomiset izolatları (devam)

Lokalle İsmi ve Özelligi	İlçe – İl	Sıra No	Kod ve Kaynak	Özellik	İzolat Numarası	Toplam İzolat Sayısı
Porsuk Nehir Sistemi	Eskişehir	11	11.3.	Satılmışoğlu köyü	1111, 1112, 1113	14
			11.4.	Alpu yolu, Arıtma tesisi girişi	1115, 1116, 1120	
Ulubat Gölü	M.Kemal Paşa – Bursa	12	12.1.	6. istasyon	1202, 1206, 1210, 1211	11
			12.2.	8. istasyon	1213, 1214, 1215, 1220	
			12.3.	9. istasyon	1222	
			12.4.	12. istasyon	1228, 1231	

3.2. İzolatların Çeşitli Metallere Olan Direncinin Katı ve Sıvı Besi Ortamlarında Belirlenmesi

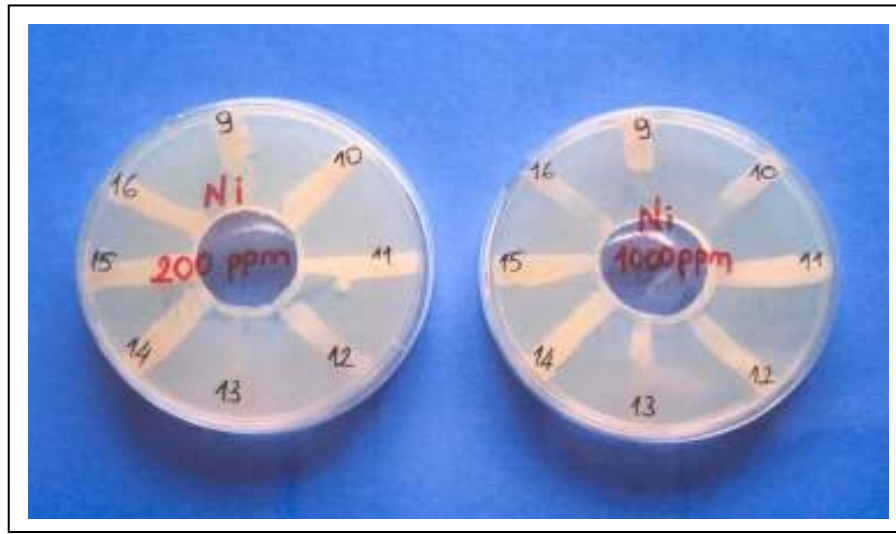
3.2.1. Metal direncinin kalitatif tayini

İzolatların metal içeren besi ortamında büyüme özellikleri, metal içermeyen besi ortamındaki büyüme oranları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir(Şekil 3.1). Toplam 135 adet aktinomiset izolatının araştırıldığı çalışmamızda, deneme sonuçları 3 paralelin ortalaması biçiminde sunulmuştur. İzolatların metal içeren besi ortamlarında büyüme durumları Çizelge 3.2' de sunulmuştur.



Şekil 3.1. 1000 mg/l konsantrasyonda nikel içeren besi ortamında tolerans denemesi. (1, 2, 3, 5 ve 8 numaralı izolatlar pozitif, 4, 6 ve 7 numaralı izolatlar ise negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir.)

Aktinomiset izolatlarının metal içeren katı ortamda büyümesi sırasında büyümenin inhibe edildiği en düşük konsantrasyon “minimal inhibitör konsantrasyon” (MİK) olarak belirlenmiştir (Şekil 3.2). Buna göre, kullanılan metallerin aktinomiset izolatlarına karşı MİK değerleri belirlenmiş olup elde edilen değerler Çizelge 3.3’ te sunulmuştur.



Şekil 3.2. Nikel içeren besi ortamında MİK değerinin belirlenmesi. (9 ve 10 numaralı izolatlar için MİK değeri 1000 mg/l, diğer izolatlar için >1000 mg/l olarak değerlendirilmiştir.)

Çizelge 3.3. Çeşitli metallerin metal ile kirlenmiş toprak/sediment örneklerinden elde edilen aktinomiset izolatlarına karşı minimal inhibitör konsantrasyon değerleri (mg/l)

Izolat No	Ni	Co	Zn	Cu	Fe	Cd	Pb	Hg
101	>1000	200	>1000	1000	1000	200	>200	5>
102	1000	>1000	1000	1000	1000	100	>200	5>
103	1000	1000	1000	1000	1000	200	>200	200
104	>1000	1000	1000	1000	1000	50	>200	10
105	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	50	>200	50
107	>1000	>1000	1000	1000	>1000	5>	>200	5>
109	>1000	>1000	1000	1000	>1000	200	>200	100
111	>1000	>1000	1000	1000	>1000	5>	>200	5>
112	>1000	>1000	1000	1000	1000	50	>200	10
113	>1000	200	1000	1000	>1000	10	>200	5>
114	>1000	>1000	1000	100	>1000	50	>200	5>
115	1000	1000	1000	200	1000	50	>200	50
201	>1000	1000	>1000	1000	>1000	5>	>200	10
202	>1000	50	1000	100	>1000	5>	200	5>
203	1000	50	200	100	1000	5>	>200	5>
206	>1000	>1000	100	200	>1000	50	>200	5>
207	200	200	1000	>1000	>1000	>200	>200	>200
208	>1000	>1000	1000	1000	>1000	200	>200	10
211	200	200	>1000	200	>1000	100	>200	>200
213	1000	100	>1000	200	1000	50	>200	5>
215	1000	>1000	100	100	1000	5>	>200	5>
216	>1000	50	200	1000	>1000	50	>200	5>
217	>1000	200	10>	200	1000	5>	>200	50
218	>1000	100	100	100	1000	10	200	50
219	1000	200	100	1000	1000	100	>200	10
224	>1000	50	200	1000	>1000	50	>200	5>
227	>1000	>1000	200	100	>1000	50	200	5>
230	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	100	>200	50
231	1000	200	200	1000	>1000	200	>200	50
233	1000	200	200	200	1000	100	>200	200
234	>1000	>1000	>1000	200	>1000	50	>200	5>
235	>1000	>1000	1000	1000	1000	50	>200	50
236	>1000	>1000	1000	1000	>1000	50	>200	10
301	1000	100	200	50	1000	10	200	5>
305	>1000	100	>1000	1000	>1000	50	>200	50
411	1000	100	100	200	1000	10	>200	10

Çizelge 3.3. Çeşitli metallerin metal ile kirlenmiş toprak/sediment örneklerinden elde edilen aktinomiset izolatlarına karşı minimal inhibitör konsantrasyon değerleri (mg/l) (devam)

İzolat No	Ni	Co	Zn	Cu	Fe	Cd	Pb	Hg
412	200	>1000	1000	200	1000	200	200	>200
418	1000	>1000	1000	200	1000	50	>200	5>
421	1000	200	200	200	1000	50	>200	100
422	>1000	>1000	100	200	>1000	10	>200	5>
511	>1000	>1000	1000	1000	1000	50	>200	50
522	1000	>1000	1000	1000	>1000	50	>200	5>
524	200	200	200	1000	>1000	200	50	>200
525	1000	100	10>	50	200	5>	>200	5>
526	1000	>1000	1000	1000	>1000	50	>200	200
527	1000	>1000	100	100	200	5>	>200	100
531	>1000	>1000	1000	1000	1000	200	>200	>200
532	>1000	1000	100	100	1000	50	>200	5>
533	1000	1000	1000	1000	>1000	50	>200	10
534	1000	50	1000	1000	>1000	50	>200	50
535	1000	>1000	1000	1000	200	50	>200	5>
536	>1000	1000	1000	>1000	1000	50	>200	10
601	1000	>1000	200	1000	>1000	>200	>200	10
603	>1000	>1000	>1000	1000	1000	>200	>200	50
609	>1000	>1000	1000	1000	>1000	5>	>200	5>
610	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	200	>200	50
613	>1000	>1000	1000	1000	>1000	50	>200	50
614	1000	>1000	1000	200	1000	10	>200	50
615	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	200	>200	100
616	>1000	>1000	1000	1000	>1000	200	>200	5>
620	1000	200	1000	50	>1000	5>	>200	10
621	>1000	>1000	200	1000	>1000	100	>200	50
622	>1000	>1000	200	100	1000	5>	>200	10
624	>1000	1000	>1000	200	>1000	50	>200	5>
625	1000	200	1000	200	>1000	50	>200	50
626	1000	200	>1000	>1000	>1000	50	>200	10
627	>1000	1000	>1000	>1000	>1000	50	>200	200
628	>1000	1000	>1000	200	>1000	50	>200	5>
632	1000	>1000	1000	200	>1000	50	>200	50
633	>1000	50	200	1000	1000	5>	>200	5>
701	>1000	>1000	>1000	1000	1000	100	>200	100
702	1000	>1000	10>	100	200	5>	>200	10
704	>1000	1000	200	1000	>1000	50	>200	50
705	>1000	1000	>1000	1000	>1000	>200	>200	100

Çizelge 3.3. Çeşitli metallerin metal ile kirlenmiş toprak/sediment örneklerinden elde edilen aktinomiset izolatlarına karşı minimal inhibitör konsantrasyon değerleri (mg/l) (devam)

İzolat No	Ni	Co	Zn	Cu	Fe	Cd	Pb	Hg
706	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	200	>200	100
707	200	1000	1000	200	200	5>	>200	200
708	1000	100	>1000	1000	1000	200	>200	50
709	>1000	1000	>1000	1000	>1000	50	>200	50
712	200	50	100	50	100	5>	100	5>
713	>1000	>1000	>1000	1000	1000	100	>200	100
714	1000	1000	>1000	1000	1000	50	>200	50
715	>1000	>1000	200	100	>1000	10	>200	10
717	>1000	>1000	>1000	200	1000	50	>200	200
719	>1000	200	200	200	1000	10	>200	50
720	1000	50	>1000	1000	100	10	>200	50
722	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	50	>200	50
723	>1000	50	200	200	>1000	50	>200	50
725	>1000	50	1000	1000	>1000	50	>200	5>
727	100	50	200	1000	>1000	5>	>200	5>
728	1000	1000	>1000	1000	1000	5>	>200	5>
729	200	50	200	100	1000	5>	>200	5>
732	1000	200	1000	200	1000	50	>200	5>
733	1000	1000	1000	1000	>1000	50	>200	200
801	1000	200	100	100	1000	10	>200	5>
803	>1000	>1000	1000	1000	>1000	200	>200	50
804	>1000	1000	100	200	1000	50	>200	5>
805	>1000	1000	200	100	1000	50	>200	50
806	200	200	50	100	1000	50	>200	10
807	1000	50	200	200	>1000	50	>200	5>
809	>1000	>1000	1000	200	1000	50	>200	5>
811	>1000	200	100	200	1000	50	>200	10
813	1000	50	100	200	>1000	10	>200	5>
901	1000	50	100	200	>1000	5>	>200	5>
902	>1000	1000	1000	1000	>1000	50	>200	50
903	>1000	200	>1000	1000	1000	5>	>200	10
908	1000	1000	100	1000	>1000	50	>200	5>
1002	50	50	50	50	>1000	5>	>200	5>
1003	1000	>1000	>1000	200	>1000	100	>200	5>
1004	1000	100	>1000	1000	1000	>200	>200	50
1006	1000	50	1000	1000	>1000	10	>200	5>
1101	>1000	200	50	100	1000	50	>200	5>
1102	1000	>1000	200	50	200	50	>200	5>

Çizelge 3.3. Çeşitli metallerin metal ile kirletilmiş toprak/sediment örneklerinden elde edilen aktinomiset izolatlarına karşı minimal inhibitör konsantrasyon değerleri (mg/l) (devam)

İzolot No	Ni	Co	Zn	Cu	Fe	Cd	Pb	Hg
1103	1000	>1000	>1000	200	1000	50	>200	5>
1104	1000	100	100	50	1000	50	>200	50
1106	>1000	1000	100	200	1000	50	>200	5>
1107	1000	200	>1000	200	1000	10	>200	5>
1108	>1000	>1000	>1000	200	1000	50	>200	50
1109	>1000	100	>1000	1000	1000	5>	>200	50
1111	>1000	200	50	200	1000	50	>200	5>
1112	>1000	>1000	>1000	1000	1000	50	>200	5>
1113	1000	1000	>1000	200	1000	50	>200	100
1115	>1000	1000	1000	200	1000	10	>200	10
1116	>1000	>1000	1000	1000	>1000	50	>200	50
1120	1000	200	200	200	1000	50	>200	5>
1202	1000	>1000	1000	1000	>1000	100	>200	50
1206	>1000	1000	200	1000	>1000	10	>200	5>
1210	1000	200	1000	1000	1000	50	>200	5>
1211	>1000	1000	1000	1000	>1000	50	>200	5>
1213	1000	100	50	1000	>1000	10	>200	5>
1214	>1000	>1000	1000	1000	>1000	50	>200	50
1215	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	>200	>200	10
1220	1000	>1000	1000	1000	>1000	50	>200	5>
1222	1000	>1000	200	1000	1000	50	>200	5>
1228	200	100	1000	1000	>1000	50	>200	5>
1231	1000	10>	200	1000	1000	5>	>200	50

Eldeki veriler, izolatlardan önemli bir kısmının çeşitli metallere karşı direnç gösterdiğini vurgulamaktadır. Kullanılan en yüksek metal konsantrasyonlarına karşı dirençli olan izolatlardan sayı ve oranları Çizelge 3.4' te, ikinci en yüksek konsantrasyona karşı dirençli izolatlardan oranları ise Çizelge 3.5' te özetlenmiştir.

Çizelge 3.4. Aktinomiset izolatlardan kullanılan en yüksek metal konsantrasyonuna direnç oranları

	1000 mg/l					200 mg/l		
	Ni ²⁺	Co ²⁺	Zn ²⁺	Cu ²⁺	Fe ²⁺	Cd ²⁺	Pb ²⁺	Hg ²⁺
Dirençli izolat sayısı	71	55	35	5	67	6	127	5
Dirençli izolat oranı (%)	52,6	40,7	25,9	3,7	49,6	4,4	94,1	3,7

Çizelge 3.5. Aktinomiset izolatlardan kullanılan ikinci en yüksek metal konsantrasyonuna direnç oranları

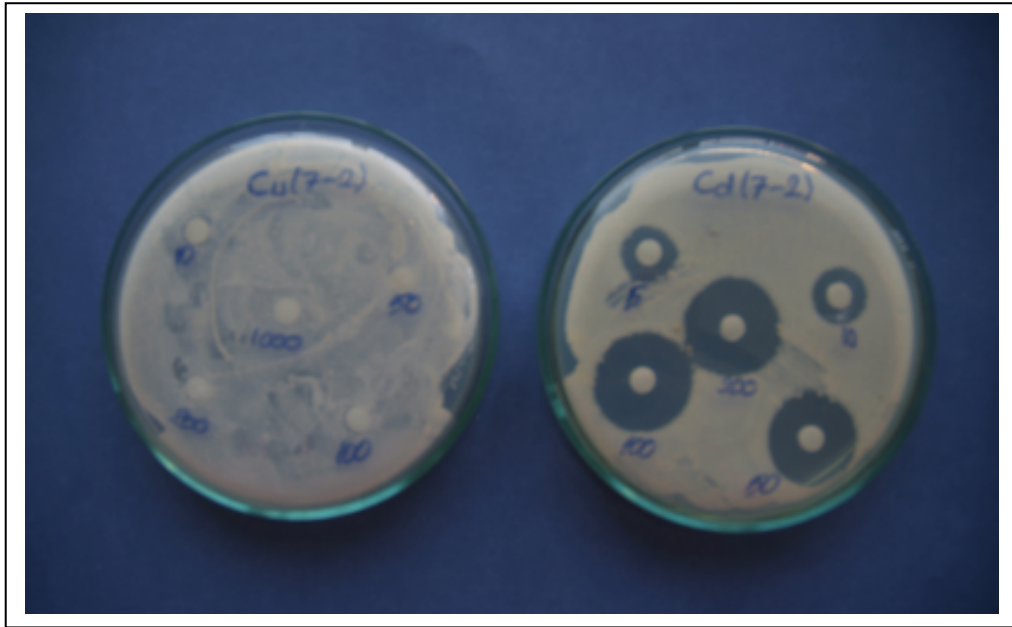
	200 mg/l					100 mg/l		
	Ni ²⁺	Co ²⁺	Zn ²⁺	Cu ²⁺	Fe ²⁺	Cd ²⁺	Pb ²⁺	Hg ²⁺
Dirençli izolat sayısı	124	81	85	74	127	20	12	133
Dirençli izolat oranı (%)	91,85	60	62,96	54,81	94,07	14,81	8,88	98,51

3.2.2. Metal direncinin yarı kantitatif tayini

Kalitatif analiz metodu ile gerçekleştirilen tolerans testleri sonucunda, en yüksek metal konsantrasyonlarına daha dirençli görülen toplam 68 izolat seçilmiştir. Yarı kantitatif metal direnç testleri seçilen bu izolatlardan ile gerçekleştirilmiştir. Çeşitli metal konsantrasyonlarını içeren filtre kağıtları etrafında oluşan inhibisyon zonunun küçüklüğü, izolatlardan toleransın bir ifadesi olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.3). Bu

izolatların büyümesinin çeşitli metal konsantrasyonları tarafından inhibisyon değerlerini içeren veriler Çizelge 3.6' da sunulmuştur.

Sonuçlar aynı izolatın farklı metallerin farklı konsantrasyonlarına direnç gösterebildiklerini vurgulamaktadır. Durumun bir örneği olarak, Şekil 3.3' te denenen aktinomiset izolatının farklı kadmiyum (5–200 mg/l) ve bakır (10–1000 mg/l) konsantrasyonlarına karşı toleransının değiştiği görülmektedir.



Şekil 3.3. 7-2 kodlu izolatın farklı kadmiyum (5–200 mg/l) ve bakır (10–1000 mg/l) konsantrasyonlarına karşı yarı kantitatif metal toleransı

Çizelge 3.6. Metal ile kirletilmiş toprak/sediment örneklerinden elde edilen aktinomiset izolatlara karşı çeşitli metallerin oluşturduğu inhibisyon zonları (mm)

İzolat Kodu		101	105	107	109	111	112	113	114	201	206	207	208
Metal													
Adı	mg/l												
Ni	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	200	-	-	-	-	-	-	-	-	20<	-	-	-
	1000	35	8	-	-	20,5	-	-	-	40<	-	9	-
Co	10	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20<	-
	50	20<	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20<	-
	100	20<	-	-	-	-	12	-	-	-	-	20<	-
	200	20<	11	-	-	9	-	20<	-	-	-	20<	-
	1000	40<	13	-	8,5	25	-	20	-	15,5	-	40<	8
Zn	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20<	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20<	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20<	-
	200	-	-	-	-	10	-	-	-	20<	-	20<	-
	1000	40<	11,5	17,5	-	40<	-	-	40<	29	-	40<	16
Cu	10	20<	-	-	-	20<	-	-	-	-	-	20<	-
	50	20<	-	-	-	20<	-	-	8	-	-	20<	-
	100	20<	-	-	-	20<	-	-	11	-	-	20<	-
	200	20<	-	-	-	20<	8	-	11,5	-	-	20<	-
	1000	40<	9	12	9	40<	14	11	22,5	40<	14,5	40<	12
Fe	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20<	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20<	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20<	-
	200	30	-	-	-	-	-	-	-	20<	-	20<	-
	1000	55	-	-	-	-	-	-	8	40<	-	40<	-
Cd	5	-	-	24	-	10,5	8	-	-	15,5	-	-	-
	10	9	-	27	-	11	10,5	-	-	20	-	-	-
	50	20	12	32,5	-	17	19	-	20<	28	-	9,5	10,5
	100	31	17	31	-	26	23	-	20<	31	-	20<	16,5
	200	29	18,5	35	-	32,5	25,5	-	40<	34	-	40<	21
Pb	5	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	15	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-
	50	11	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-
	100	12	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-
	200	17	-	-	-	-	-	-	-	14	12	-	-
Hg	5	27	13	21	20<	20<	20<	15	20<	20<	20<	20<	18
	10	25	14	21,5	20<	20<	20<	19	20<	20<	20<	20<	20
	50	28,5	21,5	26	20<	20<	20<	25	20<	20<	20<	20<	21,5
	100	38	23,5	34	20<	20<	20<	24	20<	20<	20<	20<	20<
	200	53	23	17	40<	40<	40<	47	40<	40<	40<	40<	40<

Çizelge 3.6. Metal ile kirlenmiş toprak/sediment örneklerinden elde edilen aktinomiset izolatlarına karşı çeşitli metallerin oluşturduğu inhibisyon zonları (mm) (devam)

İzolat Kodu		211	216	224	227	230	234	236	305	412	422	511	522
Metal													
Adı	mg/l												
Ni	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1000	-	16	16	-	14	-	-	-	-	-	-	-
Co	10	-	-	-	-	-	-	-	20<	-	-	-	-
	50	-	9	-	-	-	-	-	20<	-	-	-	-
	100	-	14	-	-	-	10	-	20<	-	-	-	-
	200	-	17	-	-	-	10,5	-	20<	9	-	-	-
	1000	10	38	11	-	15	18,5	-	40<	9	8,5	10	-
Zn	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	200	-	-	-	-	-	-	12,5	-	-	-	-	20<
	1000	-	16,5	16	-	20,5	-	25,5	-	-	16	-	40<
Cu	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7
	200	9	-	-	-	9	10	-	-	9	-	-	10
	1000	13	-	14,5	9	23	14,5	16	14	24	14	10	25,5
Fe	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1000	-	12,5	21,5	-	13	-	-	-	-	-	-	-
Cd	5	-	20<	19,5	7	25	-	-	17	-	8	-	-
	10	-	20<	11,5	9	28	-	-	19	-	9	-	8,5
	50	20<	18	35	15,5	20<	-	-	23	17	23	29,5	18,5
	100	13	22	37	21	20<	-	-	25	18	22	31	16,5
	200	22,5	26	56,5	20,5	40<	-	-	30	25	21,5	33,5	23
Pb	5	-	-	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	9,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	9,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	200	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hg	5	20<	20<	-	10	20<	21	14,5	20<	20<	20<	20<	20<
	10	20<	20<	-	11,5	20<	25	14,5	20<	20<	20<	20<	20<
	50	20<	20<	-	15	20<	30	17,5	20<	20<	20<	20<	20<
	100	20<	20<	-	17,5	20<	30	22	20<	20<	20<	20<	20<
	200	40<	40<	-	20,5	40<	47	23,5	40<	40<	40<	40<	40<

Çizelge 3.6. Metal ile kirlenmiş toprak/sediment örneklerinden elde edilen aktinomiset izolatlarına karşı çeşitli metallerin oluşturduğu inhibisyon zonları (mm) (devam)

İzolat Kodu		524	526	531	536	601	603	609	610	613	615	616	621
Metal													
Adı	mg/l												
Ni	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1000	13	-	13	11	9,5	-	-	8	-	-	-	-
Co	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	9	-	-	-	9	-	-	-	-	-	-	-
	100	13	-	-	8	20<	-	-	-	-	-	-	-
	200	16,5	-	-	9	20<	8	-	-	-	-	-	-
	1000	20	9	-	13	40<	11	9	10	-	-	-	-
Zn	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	8,5	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-
	200	-	9	-	-	-	-	-	-	-	20<	-	-
	1000	16	13	13	-	-	12	-	-	-	27,5	-	40<
Cu	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	200	-	-	-	-	-	13,5	-	-	-	13	-	10
	1000	18	-	12,5	12	12	30	10	13,5	-	25	11	28,5
Fe	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-	-	15,5	-	-	-	-	10	-
Cd	5	-	-	14,5	16,5	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	12,5	-	16	18	-	-	-	-	20<	-	-	-
	50	21	-	24	29	-	-	13	-	20<	-	-	-
	100	22,5	8	25,5	28,5	-	-	16	17	18	9	-	-
	200	25	9	29,5	35,5	-	-	22,5	26,5	20	11	14,5	16
Pb	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	9	-	-	-	-	-	-	-
	200	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-
Hg	5	20	-	7	22	20<	17	17	20<	20<	11,5	19,5	13
	10	19	-	14,5	19	20<	16	16	20<	20<	14	15	11,5
	50	20	10	16	20,5	20<	19,5	20	20<	20<	16	20	12
	100	20<	14	19	31,5	20<	25	28	20<	20<	20,5	23	33
	200	40<	19	25	36	40<	32,5	26,5	40<	40<	24,5	32	41

Çizelge 3.6. Metal ile kirlenmiş toprak/sediment örneklerindencide edilen aktinomiset izolatlarna karşı çeşitli metallerin oluşturduğu inhibisyon zonları (mm)(devam)

İzolot Kodu		622	624	626	627	628	632	701	704	705	706	709	713
Metal													
Adı	mg/l												
Ni	10	-	-	20<	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	20<	-	-	-	-	-	-	-	10	-
	100	-	-	20<	-	-	-	-	-	-	-	16,5	-
	200	14	-	20<	-	-	-	-	9,5	-	-	15	-
	1000	22,5	-	40<	-	-	40<	-	22	-	-	30	10
Co	10	-	-	20<	-	15	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	20<	-	11,5	-	-	-	20<	-	-	-
	100	-	-	16,5	-	12	-	-	-	20<	-	20<	-
	200	-	-	21,5	-	11,5	8,5	-	-	20<	-	20<	-
	1000	10	-	35	15	13,5	12,5	9	20	40<	9,5	40<	12,5
Zn	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,5	-
	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,5	-
	1000	18	-	19	-	-	-	-	40<	19	23,5	22,5	-
Cu	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	10,5	20<	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	8,5	13,5	20<	-	-	8	-	-	-	-	10	-
	200	14,5	16,5	20<	-	-	9,5	-	-	-	-	13,5	-
	1000	25,5	29	40<	12,5	21,5	22,5	9	17,5	9	11	31	13
Fe	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	200	11,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	-
	1000	22	14	-	20	14	18	-	-	-	-	16,5	-
Cd	5	-	-	-	-	20<	-	-	-	-	-	20<	-
	10	9	-	20<	-	20<	-	-	-	-	-	20<	-
	50	20<	-	20<	22	20<	-	-	13	11	-	20<	12,5
	100	20<	11,5	20<	25	20<	20	9	17,5	17,5	-	20<	18,5
	200	40<	14,5	40<	31	40<	25	12,5	33,5	22,5	-	40<	19,5
Pb	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hg	5	22	20<	20<	22	20<	27	13	20	22	9	11	12,5
	10	24	20<	20<	20<	20<	26	14	16	23	13	12,5	13,5
	50	28	20<	23	20<	20<	30	17,5	18	20<	15	15,5	20
	100	30	20<	32	20<	20<	32	23	26,5	20<	20,5	16,5	23
	200	35	40<	45	40<	40<	40	31	25	40<	25	20	27

Çizelge 3.6. Metal ile kirlenmiş toprak/sediment örneklerinden elde edilen aktinomiset izolatlarına karşı çeşitli metallerin oluşturduğu inhibisyon zonları (mm) (devam)

İzolot Kodu		715	717	722	723	803	809	902	903	1003	1004	1103	1108
Metal													
Adı	mg /l												
Ni	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1000	-	9,5	40<	-	13,5	11	-	15	10,5	13,5	-	9
Co	10	-	-	-	20<	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	20<	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	20<	-	-	10	-	-	-	-	-
	200	-	9	-	20<	-	-	10	16	-	14,5	9	7,5
	1000	19,5	16,5	40<	40<	-	10	12	25	11	31,5	10	9,5
Zn	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	20<	-	-	-	-	-	7	-	20<	-
	200	-	-	20<	-	-	-	-	-	8	-	20<	-
	1000	8,5	9	40<	-	-	9	-	40<	30	-	40<	23
Cu	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	200	9	-	20<	-	16,5	-	20	10	-	-	-	7
	1000	10	10	40<	-	-	11	33	17	17,5	9	32	11,5
Fe	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1000	-	-	31	-	10	-	-	8,5	-	-	-	7
Cd	5	13,5	-	-	-	-	-	8	25,5	-	-	25,5	12,5
	10	15	-	-	-	-	7	11,5	28,5	-	-	28,5	12
	50	24	10	15	-	8	10	23,5	38	18,5	-	38	20,5
	100	27	13	14	11	11	14,5	27	20<	19,5	-	20<	24,5
	200	27,5	14,5	14	22	15	18,5	36,5	40<	24	-	40<	27
Pb	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hg	5	16	9,5	11	15	13,5	20<	20<	20<	20<	30	20<	18
	10	15	10	10,5	16	10,5	20<	20<	20<	20<	20	20<	20
	50	18	10,5	11,5	20<	18,5	20<	20<	20<	20<	25	20<	34
	100	28,5	14,5	21,5	20	31	20<	20<	20<	20<	37	20<	28
	200	30	16,5	20	40<	33	40<	40<	40<	40<	40	40<	49

Çizelge 3.6. Metal ile kirlenmiş toprak/sediment örneklerinden elde edilen aktinomiset izolatlarına karşı çeşitli metallerin oluşturduğu inhibisyon zonları (mm) (devam)

İzolat Kodu		1109	1112	1116	1202	1206	1211	1215	1220				
Metal													
Adı	mg/l												
Ni	10	-	-	-	-	-	-	-	-				
	50	-	-	-	-	-	-	-	-				
	100	-	-	-	-	-	-	-	-				
	200	-	-	-	-	-	-	-	-				
	1000	12	40<	-	14,5	12	9	10,5	11				
Co	10	-	20<	-	-	-	-	-	-				
	50	-	20<	-	-	-	-	-	-				
	100	-	20<	-	-	-	-	-	-				
	200	10	20<	-	-	-	9,5	-	-				
	1000	16,5	40<	10	11,5	7,5	14,5	8	11				
Zn	10	-	-	-	15,5	-	-	-	-				
	50	-	-	-	9,5	-	-	-	-				
	100	-	20<	-	11	-	-	-	-				
	200	-	20<	-	10	-	-	-	-				
	1000	10	40<	18	13	22,5	9	-	25,5				
Cu	10	-	-	-	-	-	-	-	-				
	50	-	-	-	-	-	9	-	-				
	100	-	-	9	-	-	9,5	-	-				
	200	7	9	9	-	-	9,5	8	9				
	1000	9,5	18	15	10	21	15	14,5	13				
Fe	10	-	-	-	-	-	-	-	-				
	50	-	20<	-	-	-	-	-	-				
	100	-	20<	-	-	-	-	-	-				
	200	-	20<	-	-	23	-	-	-				
	1000	7	40<	8,5	-	9	8,5	9,5	10				
Cd	5	11,5	-	-	7	7,5	8	-	8,5				
	10	14,5	-	-	10	14,5	15	-	12				
	50	22,5	-	28	13	21,5	24	-	21,5				
	100	26	16	33	20	28,5	25	-	25				
	200	28,5	20,5	40<	20	43,5	26	15	29				
Pb	5	-	-	-	-	-	-	-	-				
	10	-	-	-	-	-	-	-	-				
	50	-	-	-	-	-	-	-	-				
	100	-	-	-	-	-	-	-	-				
	200	-	-	-	-	-	-	-	-				
Hg	5	22,5	13	11	9	20,5	20<	18,5	18,5				
	10	28,5	15	12	12	30	20<	19,5	21				
	50	31,5	20<	15	14	26	20<	23	25				
	100	31,5	20<	27	16	27,5	20<	30	27				

3.2.3. Metal direncinin kantitatif tayini

Bu aşama için yarı kantitatif metod ile diğer izolatlardan daha yüksek metal direncine sahip olduğu belirlenen 7 aktinomiset izolatı seçilmiştir. Bu izolatlar 3 farklı metalin (Ni, Zn, Pb) üçer farklı konsantrasyonda ilave edildiği ve edilmediği ortamlarda büyütülmüştür. Büyüme oranı dikkate alınarak elde edilen veriler karşılaştırılmıştır (Şekil 3.4). Değerlendirme parametresi olarak inkübasyon süresince elde edilen kuru hücre ağırlığı ve kontrole göre hücresel kitle artış değerleri kullanılmıştır. Metal toleransı araştırılan 7 izolatın kuru hücre ağırlığı ve hücresel kitle artışı değerleri sırası ile çizelge 3.7 ve 3.8' de sunulmuştur.



Şekil 3.4. Kurşun (100 mg/l) varlığında 236 kodlu aktinomiset izolatının kantitatif metal toleransı

Çizelge 3.7. Aktinomiset izolatlarının metal içeren büyüme ortamında 7 günlük inkübasyon sırasında sağladıkları kuru hücre ağırlığı (mg)

Metal Kons. (mg/l)		112	113	206	227	234	236	723
Ni	50	7.5	26.3	45.1	30.4	24.5	17.9	21.3
	100	6.3	19.2	22.7	15.7	30.5	23.8	22.5
	200	8.7	20.0	20.5	15	20.9	12	21.6
Zn	50	12.1	21.6	24.6	13.9	18	8.6	27.4
	100	7.7	24.1	21.6	11.1	26.6	14.6	28.3
	200	10	23.3	27.8	11.6	29.8	13	28.6
Pb	10	10	59.7	22	37.2	35.9	62.7	32.4
	50	10.9	68.2	26.1	43.2	33.1	62.7	20.6
	100	8.3	73.6	35.5	11.5	25.3	69.1	25.8

Çizelge 3.8. Aktinomiset izolatlarının metal içeren büyüme ortamında 7 günlük inkübasyon sırasında kontrole göre hücresel kitle artışı (%)

Metal Kons. (mg/l)		112	113	206	227	234	236	723
Ni	50	65,64	52,03	106,62	64,20	59,13	103,77	69,27
	100	55,51	37,88	53,55	33,05	73,76	137,68	73,17
	200	76,21	39,47	48,46	31,68	50,42	69,28	70,08
Zn	50	106,61	42,73	58,16	68,74	43,41	49,86	88,94
	100	67,40	47,68	50,95	54,84	64,21	84,64	91,87
	200	88,11	45,99	65,60	57,32	71,95	75,36	92,85
Pb	10	88,11	106,33	80,59	78,56	86,82	119,66	105,37
	50	96,04	121,48	95,60	91,24	79,93	119,66	66,99
	100	73,13	131,19	130,04	45,89	61,06	131,78	83,90

3.3.Metal Direncinin Biyosorpsiyon İle İlişkinin Belirlenmesi

Çalışmamızda üç farklı metal toleransı seviyesinde yer alan (kalitatif, yarı kantitatif ve kantitatif metal toleransı çalışmalarında kullanılan) toplam 18 adet aktinomiset izolatu karşılaştırılmıştır. Bu izolatlardan 100 mg/l Pb²⁺ (pH 5.0) çözeltisine eklenerek 60 dk boyunca 200 rpm’ de karıştırılması sonucunda ortamda kalan kurşun miktarı ve her gram kuru hücre için ortamdaki uzaklaştırılan metal miktarları çizelge 3.9’ da sunulmuştur.

Çizelge 3.9. Farklı metal toleransına sahip izolatlardan metal biyosorpsiyon kapasiteleri

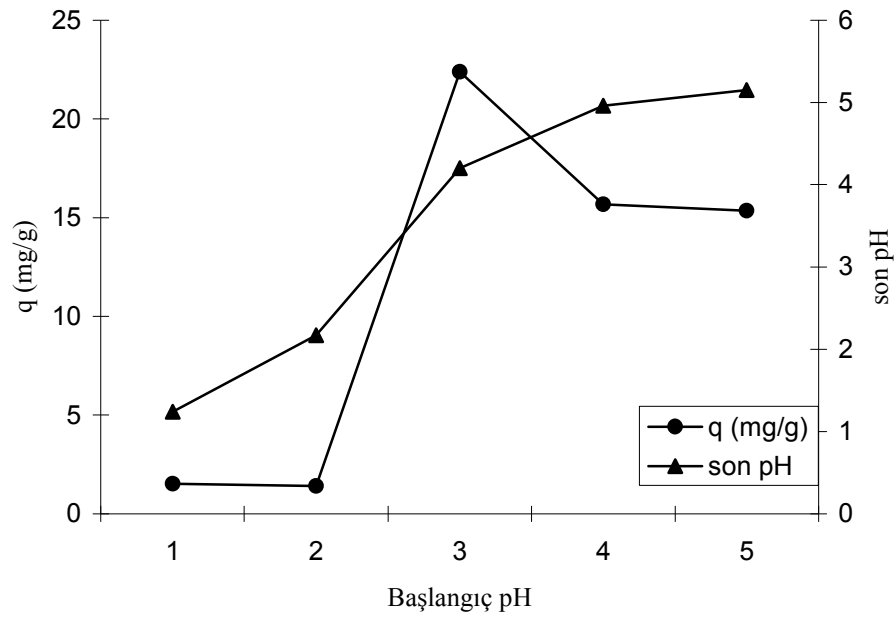
İzolatu Metale Direnci Seviyesi	İzolat No	Kalan Konsantrasyon (mg/ml)	Biyosorpsiyon kapasitesi (mg metal/g biyosorbent)
Duyarlı İzolatlar	301	59.44	20.28
	411	81.10	9.45
	712	79.12	10.44
	801	83.35	8.33
	1104	69.14	15.43
Orta Derecede Dirençli İzolatlar	114	72.40	13.48
	422	85.91	7.05
	536	84.79	7.61
	603	83.42	8.29
	627	74.70	12.65
	715	63.56	18.22
	803	84.53	7.74
Dirençli İzolatlar	113	58.46	20.77
	206	74.36	12.82
	227	86.22	6.89
	234	88.31	5.85
	236	86.21	6.90
	723	57.18	22.18

Çözeltide kalan Pb konsantrasyonu ne kadar az ise izolatu biyosorpsiyon yeteneği o kadar fazladır. Dolayısıyla o izolatu q değeri de yüksek olacaktır. Bu aşamada 723 no’ lu aktinomiset izolatu çalışılan diğer izolatlara oranla 100 mg/l Pb için

daha fazla biyosorpsiyon yeteneğine sahiptir ($q : 22.18$). Bu nedenle biyosorpsiyon ile ilgili sonraki çalışmalar için bu izolat seçilmiştir.

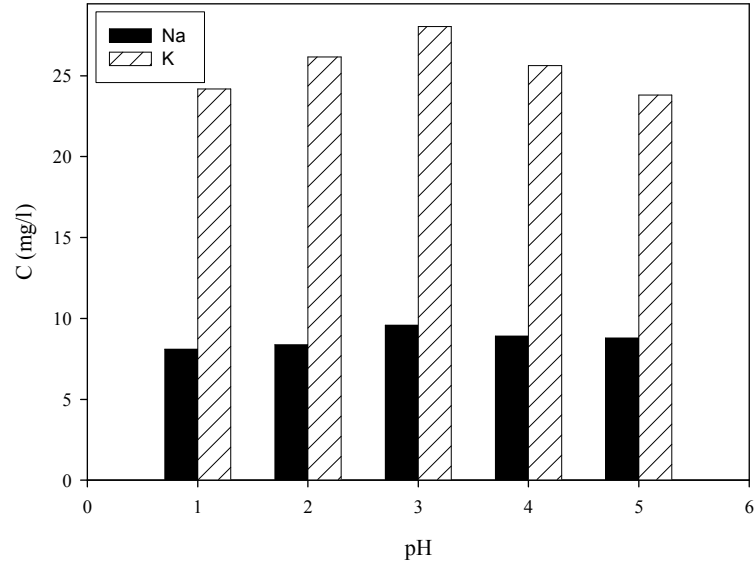
3.4. Seçilen Bir Aktinomiset İzolatının Biyosorpsiyonda Kullanımı

3.4.1. Batch (Kesikli Sistem) kurşun (Pb^{2+}) biyosorpsiyonu



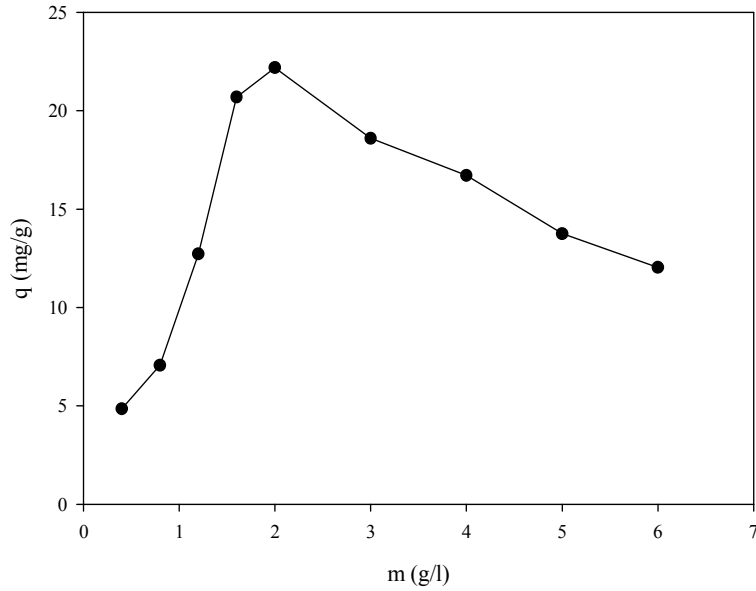
Şekil 3.5. 723 kodlu izolat ile Pb^{2+} biyosorpsiyonuna başlangıç pH'ının etkisi ve biyosorpsiyon süresince pH değişimi

Streptomyces 723 kodlu izolatın kuru biyoması ile Pb^{2+} biyosorpsiyonuna başlangıç pH'ının etkisi, biyosorpsiyon süresince ortam pH'ındaki Şekil 3.5'de ve pH'a bağlı olarak ortama salınan Na^+ ve K^+ iyonlarının konsantrasyonlarındaki değişim Şekil 3.6'da sunulmuştur.



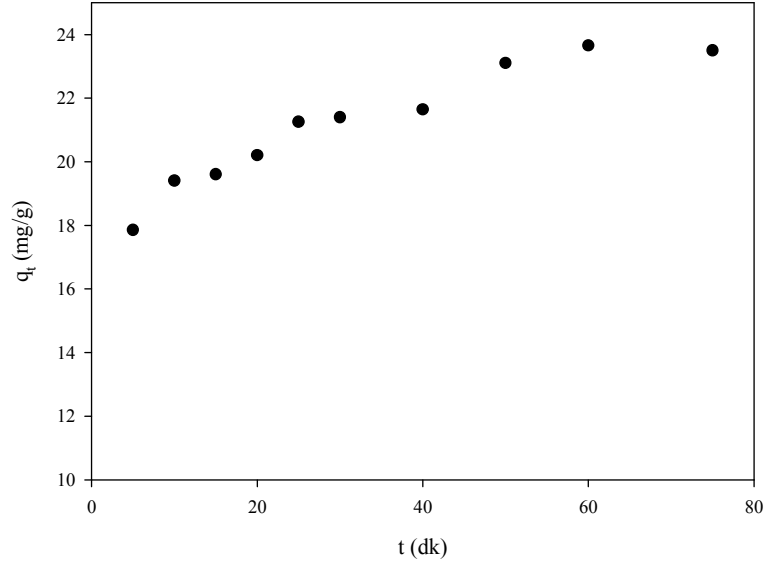
Şekil 3.6. pH'a bağlı olarak ortama salınan Na^+ ve K^+ iyonu derişimleri

Pb^{2+} biyosorpsiyonuna biyokütle miktarının etkisi 0.4-6.0 g/l aralığında incelenmiş ve sonuçlar Şekil 3.7' de sunulmuştur.



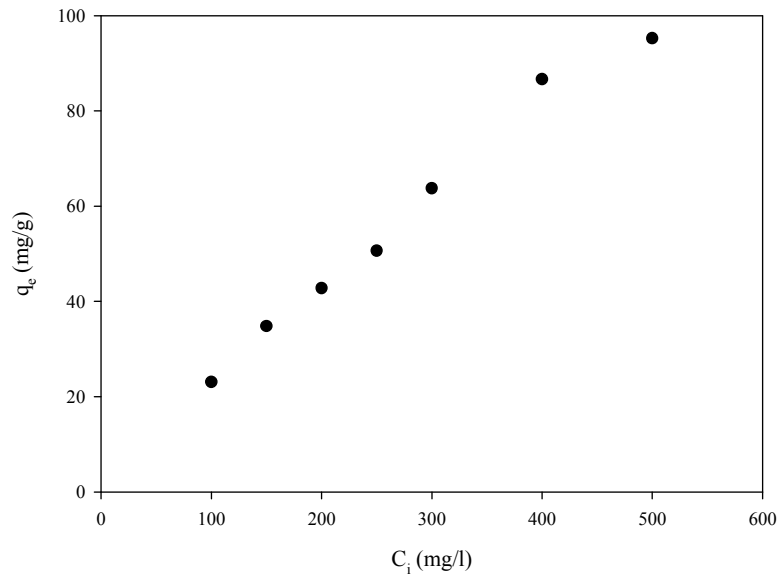
Şekil 3.7. 723 kodlu izolat ile Pb^{2+} biyosorpsiyonuna biyokütle miktarının etkisi

Pb^{2+} biyosorpsiyonuna temas süresinin etkisi Şekil 3.8.'de görülmektedir.



Şekil 3.8. Zamanın fonksiyonu olarak 723 kodlu izolat ile Pb^{2+} biyosorpsiyonu

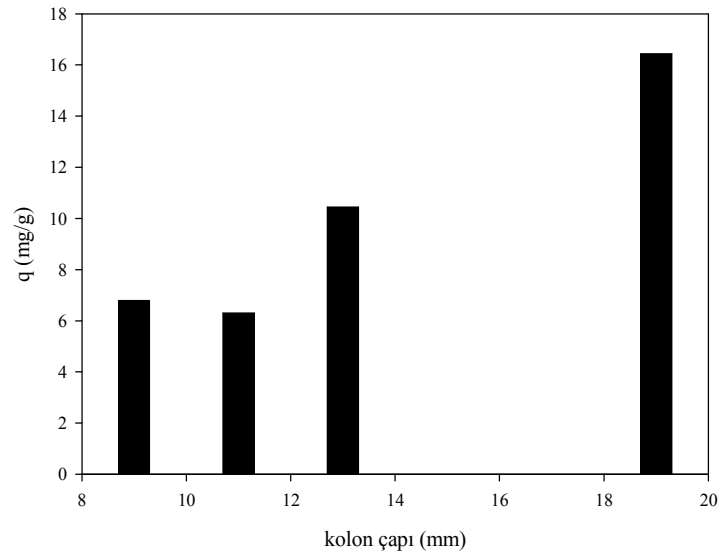
Başlangıç metal iyonu konsantrasyonunun kesikli sistemde bakteriyal biyokütle ile Pb^{2+} biyosorpsiyonuna etkisi Şekil 3.9' da verilmiştir.



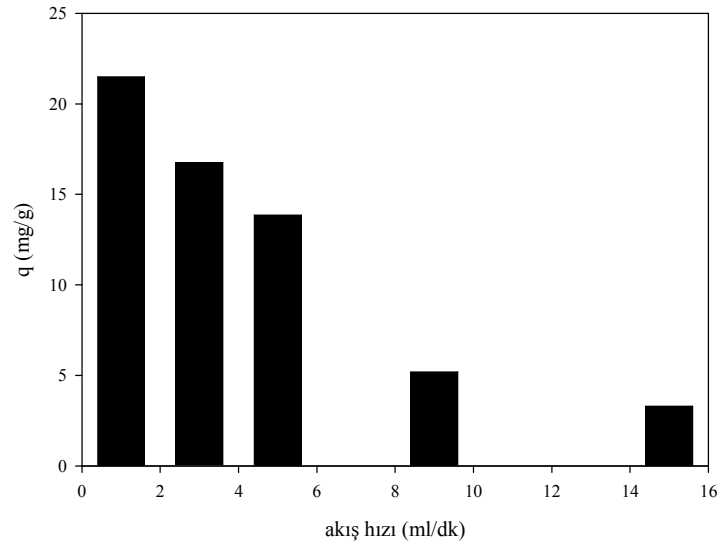
Şekil 3.9. 723 kodlu izolat ile Pb^{2+} biyosorpsiyonuna başlangıç metal iyonu konsantrasyonunun etkisi

3.4.2. Sıkıştırılmış yatak kolonda (Sürekli Sistem) kurşun (Pb^{2+}) biyosorpsiyonu

723 kodlu izolatin Pb^{2+} biyosorpsiyon performansının sıkıştırılmış yatak kolonda incelenmesi amacıyla öncelikle en uygun kolon çapı belirlenmiş ve elde edilen veriler Şekil 3.10' da sunulmuştur. Farklı akış hızlarında 723 kodlu izolat ile Pb^{2+} biyosorpsiyonuna ait veriler Şekil 3.11' de görülmektedir.

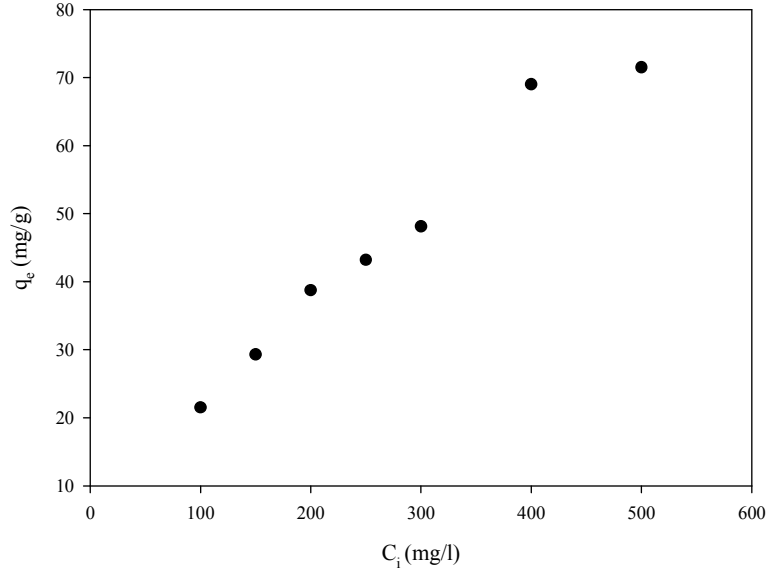


Şekil 3.10. Sıkıştırılmış yatak kolonda 723 kodlu izolat ile Pb^{2+} biyosorpsiyonuna kolon çapının etkisi



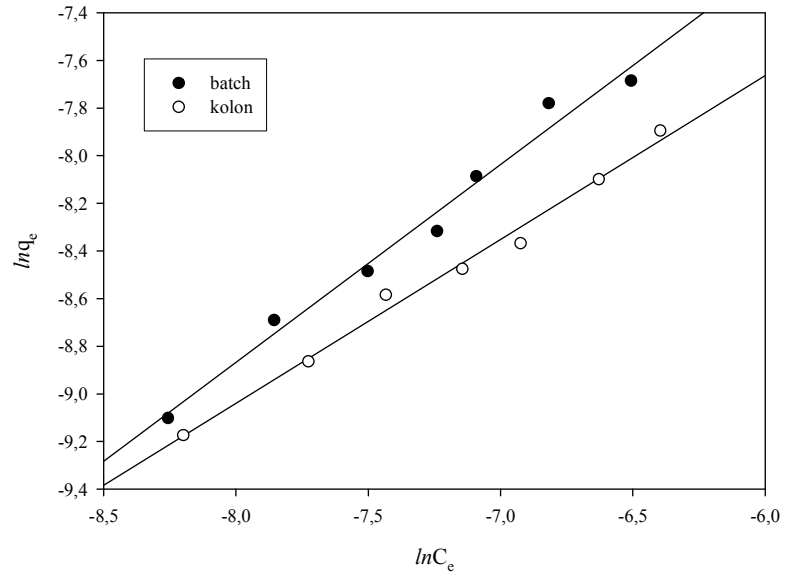
Şekil 3.11. Sıkıştırılmış yatak kolonda 723 kodlu izolat ile Pb^{2+} biyosorpsiyonuna akış hızının etkisi

Başlangıç metal iyonu konsantrasyonunun sıkıştırılmış yatak kolonda bakteriyal biyokütle ile Pb^{2+} biyosorpsiyonuna etkisi Şekil 3.12’de verilmiştir.

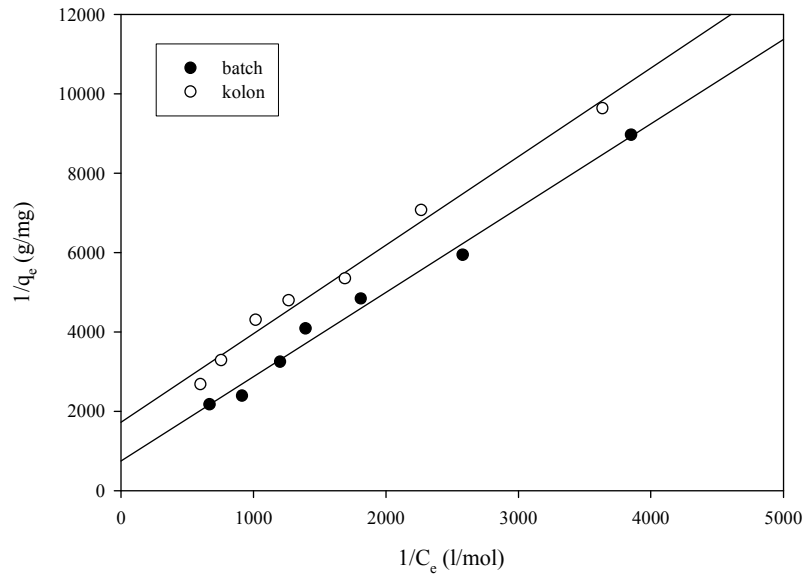


Şekil 3.12. Sıkıştırılmış yatak kolonda 723 kodlu izolat ile Pb^{2+} biyosorpsiyonuna başlangıç metal iyonunu konsantrasyonunun etkisi

Kesikli sistem ve sıkıştırılmış yatak kolonda bakteriyal biyokütle ile elde edilen denge verileri Freundlich ve Langmuir izoterm modelleri ile değerlendirilmiştir. Pb^{2+} biyosorpsiyonuna ait Freundlich ve Langmuir izoterm grafikleri sırasıyla Şekil 3.13 ve 3.14’ de sunulmuştur.



Şekil 3.13. Kesikli sistem ve sıkıştırılmış yatak kolonda 723 kodlu izolat ile Pb^{2+} biyosorpsiyonu için Freundlich izoterm grafiği

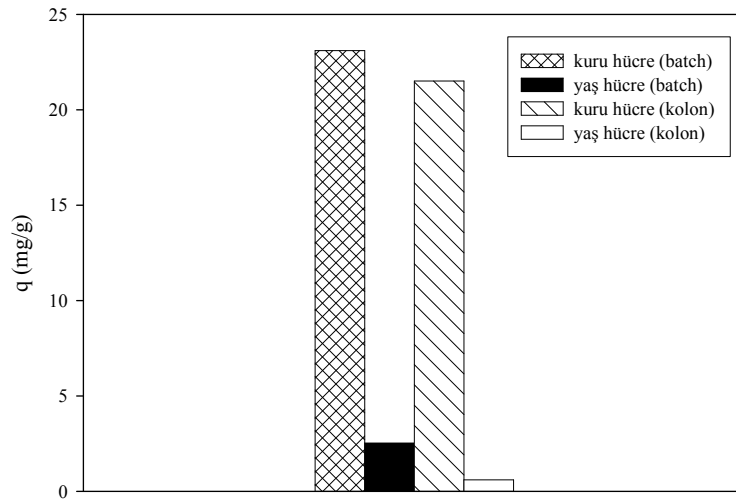


Şekil 3.14. Kesikli sistem ve sıkıştırılmış yatak kolonda 723 kodlu izolat ile Pb^{2+} biyosorpsiyonu için Langmuir izoterm grafiği

Çizelge 3.10. Batch ve kolon sistemlerinde 723 kodlu izolat ile Pb^{2+} biyosorpsiyonu için Langmuir ve Freundlich izoterm sabitleri

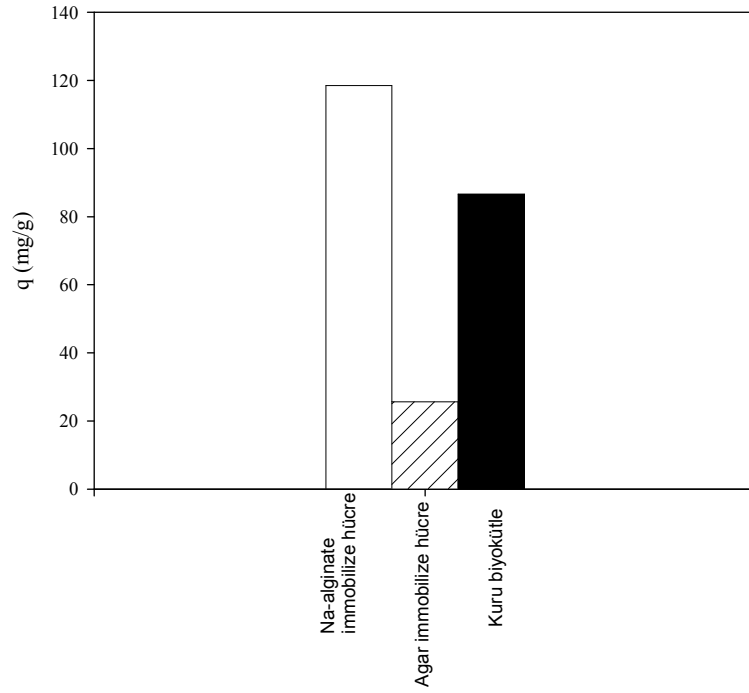
Biyosorpsiyon sistemi	Langmuir				Freundlich		
	q_{max} (mol/g)	K_L (l/mol)	r_L^2	R_L	n	K_F (l/g)	r_F^2
Batch	$1,33 \times 10^3$	$3,54 \times 10^2$	0,98	0,539	1,20	$1,08 \times 10^1$	0,98
Kolon	$5,79 \times 10^{-4}$	$7,73 \times 10^2$	0,98	0,348	1,45	$2,92 \times 10^{-2}$	0,99

Kuru (ölü) ve yaş (canlı) hücreler ile Pb^{2+} biyosorpsiyon kapasiteleri kesikli sistem ve sıkıştırılmış yatak kolonda değerlendirilmiş ve sonuçlar Şekil 3.15' te sunulmuştur.



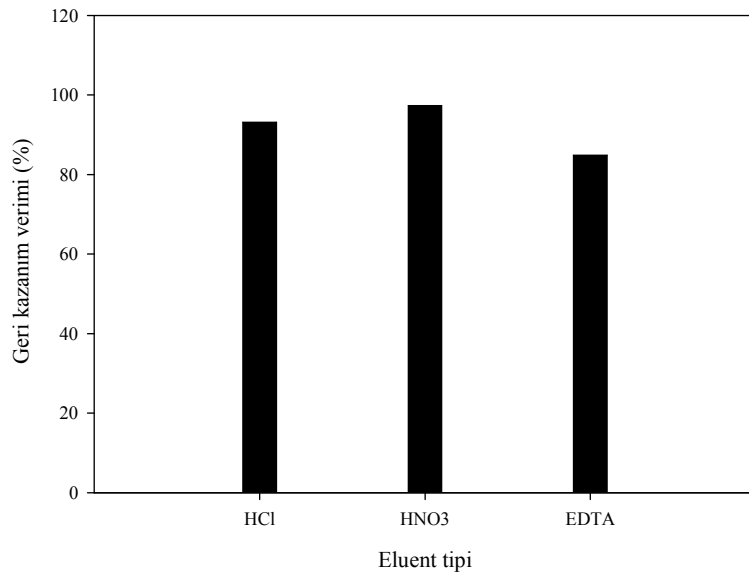
Şekil 3.15. Kesikli sistem ve sıkıştırılmış yatak kolonda yaş ve kuru 723 kodlu izolatı ile Pb^{2+} biyosorpsiyonu

Bakteriyal biyokütle, Na-alginat ve agar ile immobilize edilmiş ve immobilize sistemlerin biyosorpsiyon kapasiteleri Şekil 3.16' da verilmiştir.



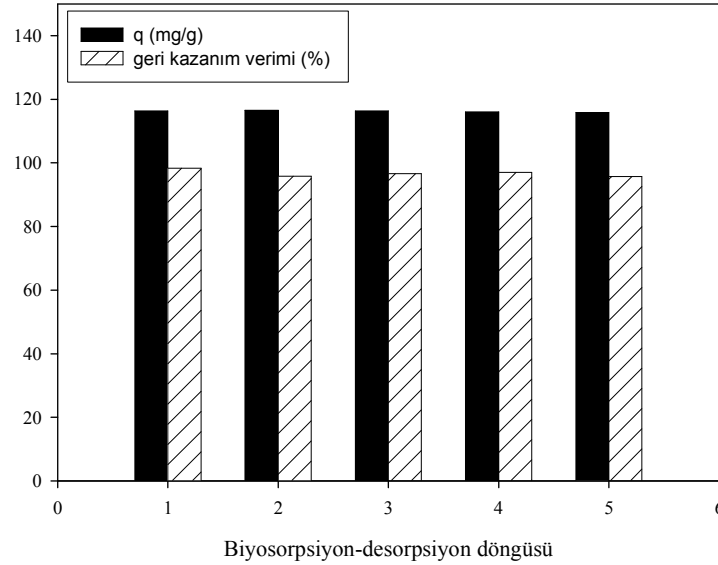
Şekil 3.16. İmmobilize sistemlerin biyosorpsiyon kapasiteleri

Eluent olarak 0.1 M HCl, 0.1 M HNO₃ ve 0.1 M EDTA kullanılarak desorpsiyon verimleri incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 3.17’ de sunulmuştur.



Şekil 3.17. Farklı eluent çözeltileri ile Pb²⁺’nin desorpsiyon verimleri

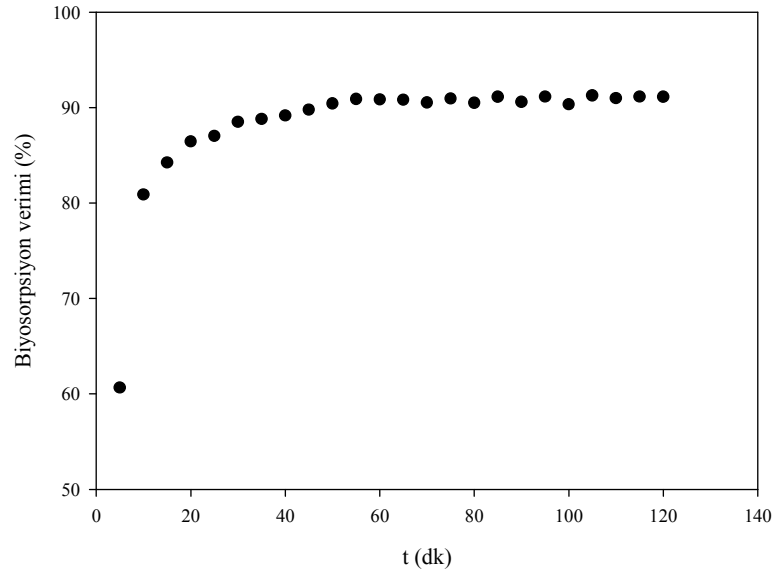
En yüksek desorpsiyon verimi 0.1 M HNO₃ ile elde edilmiş ve biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüsü aynı kolon kullanılarak 5 kez ard arda tekrarlanmıştır. Kolonun tekrar kullanılabilirliğine ait veriler Şekil 3.18’ de görülmektedir.



Şekil 3.18. İmmobilize biyosorbent sisteminin biyosorpsiyon-desorpsiyon döngüsü

3.4.3. Akışkan reaktör sisteminde (CFST) kurşun (Pb²⁺) biyosorpsiyonu

CFST sisteminde pH, akış hızı, metal çözeltisi hacmi ve derişimi, biyokütle miktarı parametreleri sabit tutularak büyük ölçekte biyosorpsiyonun uygulanabilirliği araştırılmıştır. Belirli zaman aralıklarında sistemden alınan örneklerdeki biyosorpsiyon verimi hesaplanarak, sonuçlar Şekil 3.19’ da sunulmuştur.



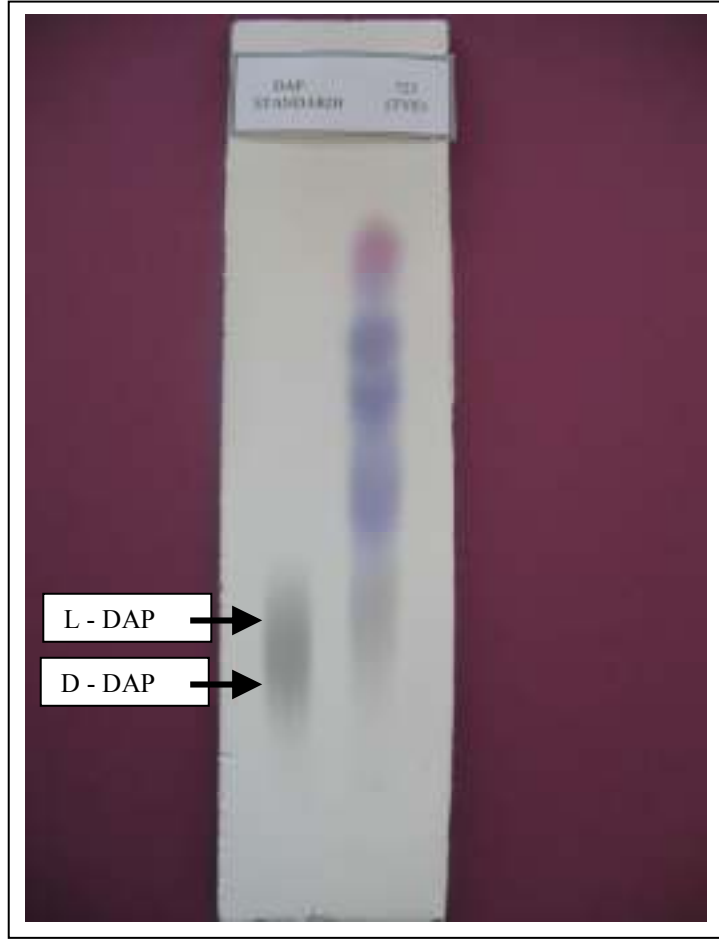
Şekil 3.19. Akışkan reaktör sisteminde immobilize biyokütlenin Pb^{2+} biyosorpsiyon verimi

Böylece atık sularda ya da atık sularda bulunan metal iyonlarının giderilmesi amacı ile metale dirençli aktinomiset izolatlarının kullanım olanakları belirlenmiş olabilecektir.

3.5. Metal Direncine ve/veya Yüksek Biyosorpsiyon Kapasitesine Sahip İzolatların Kemotaksonomik ve Nümerik Metodlarla İdentifikasyonu

3.5.1. Aktinomiset izolatlarının kemotaksonomik özellikleri

İzolatların cins seviyesinde tanılanması amacıyla öncelikle hücre çeperi diaminopimelik asit tipi belirlenmiş; morfolojik çalışmalar ile makroskobik ve mikroskobik incelemeler gerçekleştirilmiştir. Işık mikroskobu ile gerçekleştirilen morfolojik çalışmalardan elde edilen verilerin kemotaksonomik veriler ile birlikte değerlendirilmesi ile izolatlarımız cins seviyesinde tanılanmıştır. Yapılan analizler sonucunda 723 kodlu izolatın LL tipte DAP' a sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.20) Referans olarak kullanılan DL- α - ϵ -diaminopimelik asit' te bulunan ve izolatlarda belirlenen LL-DAP' ın R_f değeri 0.18 olarak saptanmıştır.



Şekil 3.20. 723 kodlu aktinomiset izolatının hücre çeperi DAP analiz sonucu

3.5.2. Aktinomiset izolatlarının nümerik taksonomisi

3.5.2.1. İzolatların renk gruplarının belirlenmesi

İzolatların renk gruplaması, oatmeal agar (ISP 3), inorganik tuz–nişasta agar (ISP 4) ve pepton–yeast extract–iron agar (ISP 6), tirozin agar (ISP 7) besiyerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzolasyon çalışmaları ile elde edilen toplam 135 adet izolat, cycloheximide (50µg/ml) ilave edilen besiyerlerine inoküle edilmiş ve 25 °C’ de 2 hafta süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, ISP 3 ve 4 besiyerlerinde büyüyen kolonilerin, havasal misel, substrat miseli ve çözümlü pigment

renkleri; ISP 6 ve ISP 7 besiyerinde ise, melanin pigmenti üretme özellikleri belirlenmiştir. İzolatların oluşturdukları pigment renkleri, Inter-Society Colour Council National Bureau of Standarts (ISCC-NBS) Colour Name Charts (Unated States Department of Commerce, Gaithersberg, Maryland, U.S.A.) katalogu kullanılarak saptanmıştır. İzolatlar, besiyerlerinde oluşturdukları belirtilen renkler dikkate alınarak ISP 3 besiyerinde 17 renk grubuna (Çizelge 3.12) , ISP 4 besiyerinde ise 19 renk grubuna (Çizelge 3.13) ayrılmıştır.

Bu renk gruplarındaki dağılımlara ve izolatların direnç ve biyosorpsiyon çalışmalarında verdikleri sonuçlara dayalı olarak seçilen 16 adet izolat, nümerik taksonomik çalışmalarda kullanılmak üzere test organizması olarak ayrılmıştır. Nümerik taksonomik çalışmalarda kullanılmak üzere seçilen izolatların elde edildikleri lokalitelere göre dağılımı Çizelge 3.11’ de sunulmuştur.

Çizelge 3.11. Nümerik taksonomik çalışmalarda kullanılmak üzere seçilen izolatların izole edildikleri lokalitelere göre dağılımı

İzolat No	İzole edildiği Lokalite	İlçe ve İl	Lokalitedeki kurşun miktarı (mg/l)
103	Çimento Fabrikası	İnönü - Eskişehir	34.295
109			15.867
112			15.374
113			
206	Karaçam Köyü (Nikel –Demir Ocağı)	Sivrihisar - Eskişehir	14.44
227			-
234			
236			
301	Türkmenbaba Dağı	Eskişehir	10.39
534	Tüfekçikonak Köyü (Bakır Ocağı)	İnegöl – Bursa	-
715	Karadeniz Bakır İşletmeleri Bakır Ocağı	Küre – Kastamonu	0.60
723			0.59
729			5.72
902	Akkonak Köyü	Amasra – Bartın	-
1003	Balya Kurşun Ocağı	Balya – Balıkesir	23767.2
1108	Porsuk Nehir Sistemi	Eskişehir	-

Çizelge 3.12. İzolatların Out Meat Agar (ISP 3) besiyerinde oluşturdıkları renk grupları (devam)

HAVASAL MİSEL RENGİ	SUBSTRAT MİSELİ RENGİ	ÇÖZÜNÜR PİGMENT RENGİ	İZOLAT NO
	95 - m.OlBr	90 - gv.Y	1107
	96 - d.OlBr	91 - d.gv.Y	1003
	101 - l.gY	92 - yWhite	714
	105 - gv.gY	-	908
	107 - m.Ol	-	809
	263 - White	-	1213
104 - p.gY	104 - p.gY	-	531
113 - OlGy	110 - gv.Ol	-	805
149 - p.G	107 - m.Ol	-	1214
191 - bGy	114 - OlBlack*	98 - brill.gY	1228
221 - v.l.P	243 - v.d.rP	112 - OlGy	616
232 - l.pGy	93 - yGy	242 - d.rP	1215
	28 - l.yPk*	31 - p.yPk	211, 525
	33 - brPk	-	224
	44 - d.rBr	-	609
	70 - l.OY*	-	235, 610
	76 - l.yBr	76 - l.yBr	113
263 - White	90 - gv.Y	-	1103, 1112
	92 - yWhite	-	704
	94 - l.OlBr	-	112, 305, 603, 628, 633, 706, 712, 713, 717, 722, 1206
	100 - deep fY	-	1004
	101 - l.gY	-	234
	44 - d.rBr	-	114, 217, 527, 1111, 1115
	46 - gv.rBr	94 - l.OlBr	107
	91 - d.gv.Y	-	301, 702
264 - l.Gray	93 - yGy	-	206, 208, 236, 422, 803, 1109, 1113
	94 - l.OlBr	-	411, 532, 624, 729, 1210, 1220
	108 - d.Ol*	91 - d.gv.Y	1104
	265 - med.Gy	-	1002
	26 - s.yPk	-	627
265 - med.Gy	91 - d.gv.Y	-	535
	91 - d.gv.Y	-	227

Çizelge 3.12. İzolatların Oat Meal Agar (ISP 3) besiyerinde oluşturdukları renk grupları (devam)

HAVASAL MİSEL RENGİ	SUBSTRAT MİSELİ RENGİ	ÇÖZÜNÜR PİGMENT RENGİ	İZOLAT NO
	93 - yGy	-	203
	104 - p.gY	-	1101, 1222
	111 - d.gy.OI	-	215
	257 - v.deep pR*	-	115, 1202
	104 - p.gY	-	902
266 - d.Gray	108 - d.OI*	-	1116
	230 - bk.P	-	620

Çizelge 3.13. İzolatların İnorganik Tuz – Nişasta Agar (ISP 4) besiyerinde oluşturdukları renk grupları

HAVASAL MİSEL RENGİ	SUBSTRAT MİSELİ RENGİ	ÇÖZÜNÜR PİGMENT RENGİ	İZOLAT NO
4 - l.Pk	95 - m.OlBr	-	236
	32 - gv.yPk	-	201
9 - pk White	42 - l.rBr	-	224
	85 - deepY	-	610
10 - pkGy	89 - p.Y	-	1101
	92 - yWhite	-	422
	29 - m.yPk	-	535
22 - r.Gy	204 - gv.pH	-	211, 1202
	108 - d.OH *	-	525
	32 - gv.yPk	-	107, 111
28 - l.yPk *	89 - p.Y	92 - yWhite	105
	27 - deepsPk	-	207
29 - m.yPk	92 - yWhite	-	231
31 - p.yPk	94 - l.OlBr	-	705
	77 - m.yBr	-	1215
79 - l.gy.yBr	267 - Black	-	301,532
80 - gv.yBr	88 - d.Y	-	1002
	94 - l.OlBr	33 - brPk	1108
89 - p.Y	88 - d.y	-	1006, 1113
	91 - d.gy.Y	-	621, 625
	95 - m.OlBr	-	632, 1231
90 - gv.Y	96 - d.OlBr	-	626
	29 - m.yPk	28 - l.yPk *	806
	45 - l.gy.rBr	-	807
	86 - l.Y	-	1213
	88 - d.Y	-	102, 233, 511, 613, 633, 704, 719, 725, 733, 809, 901, 1111, 1120
92 - yWhite	89 - p.Y	-	603, 706
	90 - gv.Y	90 - gv.Y	811
	91 - d.gv.Y	-	601, 615, 701, 707, 708, 714, 723, 813, 903, 1102, 1211
	96 - d.OlBr	-	219, 412, 526, 1106

Çizelge 3.13. İzolatların İnorganik Tuz – Nişasta Agar (ISP 4) besiyerinde oluşturdıkları renk grupları (devam)

HAVASAL MİSEL RENGİ	SUBSTRAT MİSELİ RENGİ	ÇÖZÜNÜR PİGMENT RENGİ	İZOLAT NO
93 - yGy	267 - Black	-	720
	85 - deep Y	-	522, 524, 622, 728, 908
	89 - p.Y	-	421
	91 - d.gy.Y	-	531, 534, 536, 614, 715, 732, 803, 1107, 1109
	94 - l.OiBr	90 - gy.Y	104
	95 - m.OiBr	87 - m.Y	533
	96 - d.OiBr	-	216, 709
	266 - d.Gray	-	217, 418
	267 - Black	191 - bGy	109
	188 - bk.B	-	1003
155 - gGy	106 - l.Oi	101 - l.gY	616
	72 - d.OY	70 - l.OY	1228
203 - p-pB	91 - d.gy.Y	-	627
	19 - gy.R	-	902
	23 - d.rGy	-	101
	26 - s.yPk	-	213
	32 - gy.yPk	-	113
	86 - l.Y	-	202
	87 - m.Y	-	103, 1112
	89 - p.Y	-	722, 1115
	90 - gy.Y	-	628, 712, 1004
	92 - yWhite	-	112, 218, 305, 713
	93 - yGy	-	717
	94 - l.OiBr	-	801
	75 - deep yBr*	-	527
	76 - l.yBr	-	235
	81 - d.gy.yBr	76 - l.yBr	227
264 - l.Gıy	92 - yWhite	-	804
	93 - yGy	-	609
	93 - yGy	-	411, 624, 805
		-	1206, 1220

Çizelge 3.13. İzolatların İnorganik Tuz – Nişasta Agar (ISP 4) besiyerinde oluşturdıkları renk grupları (devam)

HAVASAL MİSEL RENGİ	SUBSTRAT MİSELİ RENGİ	ÇÖZÜNÜR PİGMENT RENGİ	İZOLAT NO
	94 - I.OİBr	-	208
	265 - med.Gy	-	1210
	267 - Black	-	234, 702
	91 - d.gy.Y	-	215
	93 - yGy	-	1104, 1116
265 - med.Gy	242 - d.rP	-	115
	264 - I.Gray	-	1214, 1222
	265 - med.Gy	-	203, 729
266 - d.Gray	18 - I.gy-R	-	620
	96 - d.OİBr	86 - I.Y	727

Nümerik taksonomik çalışmalar için seçilen izolatlar, inorganik tuz–nişasta agar (ISP 4) besiyerindeki spor zincir morfolojileri açısından da incelenmişlerdir. ISP 4 besiyerinde 25 °C’ de büyütülen kültürler, inkübasyonun 21. gününde ışık mikroskobu ile incelenerek gözlenmişlerdir. Spor zincirleri; düz - dalgalı zincirler (rectiflexibles), ucu kanca ya da halka ile biten zincirler (rectinaculiaperti), verticilliate ve spiral zincirler olmak üzere 3 ana grupta değerlendirilmiştir (Çizelge 3.14).

Çizelge 3.14. İzole edilen aktinomiset izolatlarının ISP 4 besiyerlerinde spor zincir morfolojileri

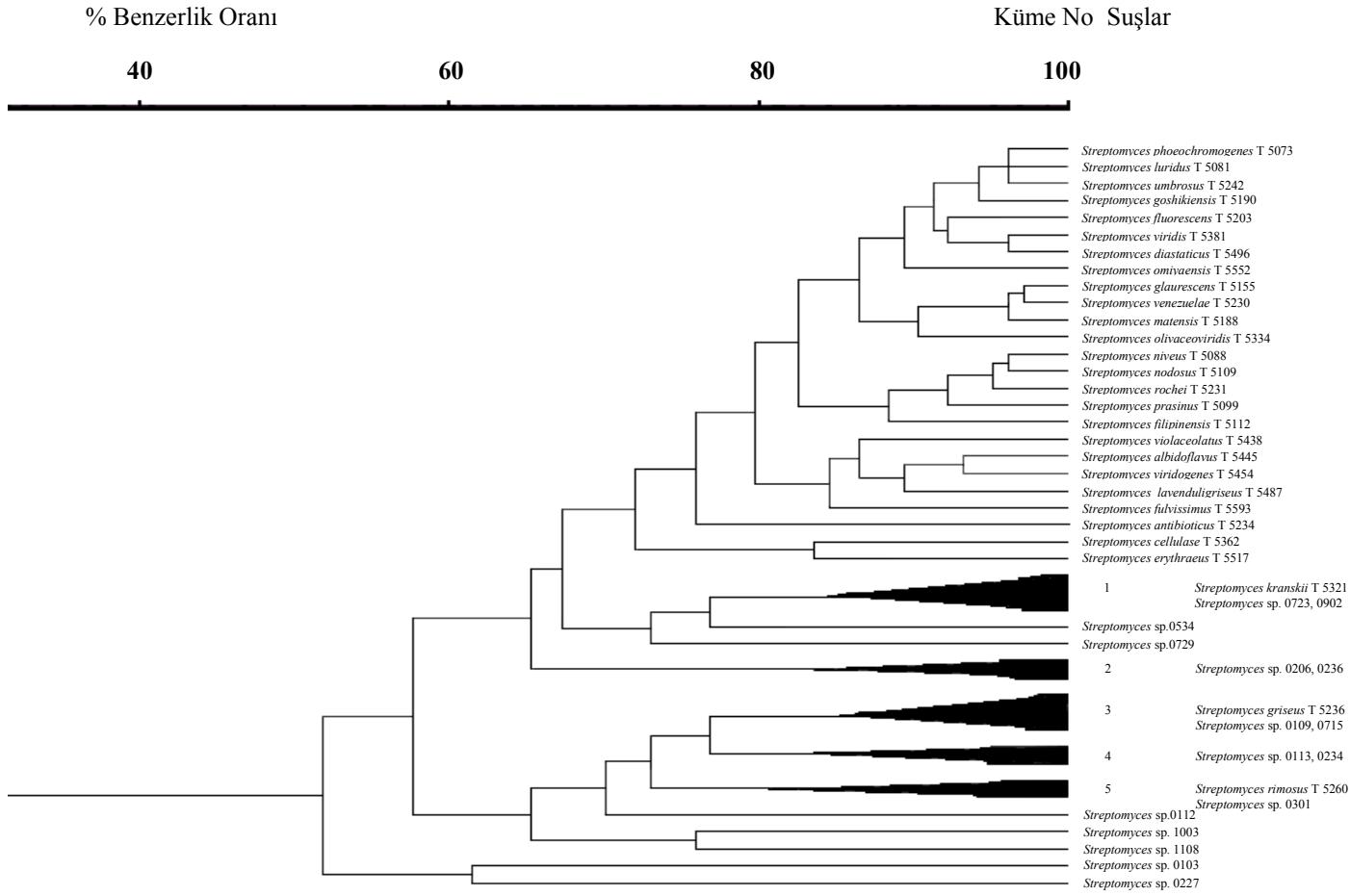
İzolat No	Spor Zincir Morfolojisi	
	Rectiflexibles	Rectinaculiaperti
103	+	+
109	+	+
112	+	-
113	+	-
206	+	+
227	-	+
234	+	+
236	+	+
301	+	+
534	+	+
715	+	+
723	+	+
729	+	-
902	+	+
1003	+	-
1108	+	-

3.5.2.2. Nümerik testlerden elde edilen verilerin istatistiksel analizi

Nümerik taksonomi testleri 16 test izolatu, 4 duplikat suş ve 28 tip örneği olmak üzere toplam 48 suşun 138 birim karakter açısından değerlendirilmesini içermektedir. Test hata değeri % 3,33 ve toplam test varyansı ($S_i^2=0.005$) olarak hesaplanmıştır.

Test hatasının saptanması için test varyansının hesaplanmasından sonra (Si²; Sneath ve Johnson, 1972) duplike olarak seçilmiş suşlar son veri analizlerinden çıkarılmıştır. %25 ve üstü hata veren testler (Triacyl Oleandomycin (50 µg/ml), Nalidixic acid (10 µg/ml), Chloramphenicol (10 µg/ml)' e direnç; L-Sistein kullanımı; pH 5.0' te büyüme; Hipoksantin hidrolizi); tüm değerleri (+) olan testler; (H₂S üretimi, Allantoin, Esculin hidrolizi ve D-Mannitol kullanımı) ve tüm değerleri (-) olan testler (Neomycin sülfat (50 µg/ml) a direnç; Safranin kullanımı; pH 4' te, Çinko Klorid (%0.01 w/v), Kristal Violet (%0.001 w/v), NaCl (%10 w/v), Sodyum Biselenit (%0.001 w/v), Sodyum Azid (%0.02 w/v), Sodyum Biselenit (%0.005 w/v), Potasyum Tellürit (%0.01 w/v), Feniletanol (%0.3 w/v), Fenol (%0.1 w/v) varlığında büyüme; L-Tirozin, Xantin hidrolizi; Kahve, Kırmızı, Siyah, Yeşil havasal misel ve spor kitlesi rengi; Eflatun, Siyah substrat misel rengi; Eflatun, kırmızı, pembe çözümlü pigment rengi ve verticillate spor zincir morfolojisi) final veri matrisinden çıkarılmıştır. Sonuç olarak toplam 34 test son veri matrisinden çıkarılmıştır.

Elde edilen veriler ışığında suşlar arasındaki benzerlik oranları hem + hem de – verileri eşit oranda değerlendiren S_{SM} (Simple matching coefficient; Sokal and Michener, 1958) katsayısı kullanılarak hesaplanmış, kümeleme ise Complete algoritmi ile oluşturulmuştur. Böylece, Türkiye' nin çeşitli metalik maden yataklarından ve metal ile kirletilmiş ortamlardan izole edilmiş olan *Streptomyces* izolatlarının standart tip türler ile benzerlik derecelerini ifade eden bir dendrogram oluşturulmuştur (Şekil 3.21).



Şekil 3.21. Nümerik verilerin Simple matching coefficient (S_{SM}) ve Complete algorithm analizlerine göre, metaller ile kirlenmiş toprak örneklerinden izole edilen *Streptomyces* suşları ile tip türler arasındaki ilişkiyi gösteren dendrogram

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Metaller çevrenin doğal parçalarıdır. Ancak bazı sebeplerle buldukları ortamlarda yüksek konsantrasyonlara ulaşabilirler. Birçok canlı için yüksek konsantrasyonları toksik etkilere yol açarken, bazılarının düşük konsantrasyonları mikroorganizmalar ve tüm canlılık için hayati önem taşır.

Metaller, birçok biyokimyasal tepkimenin kritik bileşenidir. Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ve Mg^{2+} gibi daha hafif metaller enzimlerin kofaktörleri olarak kullanılmanın yanısıra oksidatif fosforilasyon ve osmotik denge sağlanması gibi olaylarda hücre için büyük önem taşırlar. Biyolojik sistemler bazı ağır metallerin düşük konsantrasyonlarına da büyüme ve metabolik fonksiyonları için gereksinim duyarlar. Örneğin, mikroorganizmalar gelişimleri sırasında çevrelerinden Cu, Zn, Fe, Ni, Mn ve Co gibi metalleri alarak bünyelerinde biriktirmişlerdir. Esansiyel miktardaki bu metaller birçok proteinin prostetik grubu olarak ve enzimlerin aktif kısımlarının yapımında, bazı enzimatik reaksiyonlarda kofaktör olarak, porfirinlerde merkez olarak ve hücre içinde önemli redoks tepkimelerinde iş görürler.

Ağır metaller, doku harabiyetleri yanında genel olarak biyokimyasal tepkimelerde kullanılan enzimlerin deformasyonu ve bunun sonucunda da inhibisyonuna neden olurlar. Örneğin Hg^{2+} , enzimlerin sülfidril gruplarına bağlanır ve sonuç olarak enzim iş göremez hale gelir. Toprakta yaşayan mikroorganizmaların bir kısmı özellikle de metal pollusyonlu ortamlarda bulunan mikroorganizmalar bazı direnç mekanizmaları geliştirerek ağır metal toksisitelerini belirli bir konsantrasyona kadar bertaraf etme yeteneği kazanmışlardır. Bu mekanizmalar ana hatlarıyla mikroorganizmaya şu özellikleri kazandırır; oksidasyon ve redüksiyon tepkimeleriyle bazı metal bileşiklerini daha az toksik hale getirebilirler, metal iyonlarını solüsyondan uzaklaştıran intraselüler polimerler sentezleyebilirler, hücre yüzeylerinde metal iyonlarını tutabilen proteinler bulunur, hücre yüzeylerinde metal iyonlarını çözülemez metal kompleksleri halinde çöktürebilen mekanizmalar vardır, biyometilasyon sonrasında difüzyon mekanizmasını kullanarak metal bileşiklerini hücre dışına atabilirler. Ancak bu tolere etme yeteneği de belirli bir konsantrasyona kadar geçerliliğini sürdürebilir. Mikroorganizmanın tolerans yeteneğini kaybettiği dolayısıyla

gelişiminin engellendiği en düşük metal konsantrasyonu “minimal inhibisyon konsantrasyonu” olarak adlandırılır.

Tolerant mikroorganizmaların ekolojik açıdan önemi büyüktür. Çünkü metal pollusyonlu ortamlarda ancak ve sadece metal tolerans yeteneğine sahip canlılar yaşayabilmektedir. Bu nedenle bu ortamlardaki ekolojik madde döngülerinin devamı metal toleransına bağlı kalmaktadır. Aksi halde metal pollusyonlu bölgede madde döngülerinin durması ve bölgede canlılığın tehlikeye girmesi kaçınılmazdır. Bu nedenle, karasal ve sucul ortamlarda yer alan metal tolerant organizmalar, bu ortamlarda yaşamın devamı ve/veya bu ortamların ıslahı (remediasyon) için vazgeçilemez önemdedir.

Metal pollusyonlu karasal ve sucul ortamların biyolojik yöntemler kullanılarak ıslahı için bugüne kadar birçok çalışma yapılmıştır. Bu biyolojik ajanlar içerisinde de metabolizma hızları, tolerans ve biyosorpsiyon kapasiteleri gibi çeşitli özellikleri ile mikroorganizmalar tercih edilmişlerdir. Sucul çevrelerden metal iyonlarının uzaklaştırılması amacı ile mikroorganizmaların biyosorbent olarak kullanıldığı çok sayıda çalışma, konunun potansiyelini ve önemini ifade etmektedir.

Bu çalışmada da 12 farklı lokaliteden alınan toprak/sediment örneklerinden elde edilen 135 aktinomiset izolatının 8 ağır metal ve bu metallerin 5’ er farklı konsantrasyonuna karşı toleransları belirlenmiştir. Daha sonra tolerans durumları farklı seviyelerde olan toplam 18 örneğin biyosorpsiyon yetenekleri karşılaştırılarak tolerans ve biyosorpsiyon yeteneği arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. Bu 18 izolat arasından biyosorpsiyon yeteneği en iyi olan aktinomiset örneğinin, kesikli ve sürekli sistemlerde kurşun giderim optimizasyonu yapılmıştır. Belirlenen optimum koşullar göz önünde bulundurularak akışkan reaktör sisteminde bu aktinomiset izolatının biyoremediasyon amacına yönelik kullanımına yatkınlığı araştırılmıştır. Yüksek biyosorpsiyon kapasitesi ile dikkat çeken 723 kodlu izolatın hücre çeper analizi ve içerisinde bu izolatın da bulunduğu farklı tolerans seviyelerine sahip 16 izolatın nümerik taksonomik analizi yapılmıştır.

4.1. Metale Dirençli Aktinomiset İzolatlarının Eldesi

Çalışmanın izolasyon aşamasında 12 farklı lokaliteye ait toplam 42 farklı toprak/sediment örneğinden 135 adet aktinomiset izolatı elde edilmiştir (Çizelge 3.1). Bu izolatların elde edildikleri ortamlarda bulunan metal miktarlarının kimi örneklerde

nispeten, kimilerinde ise oldukça yüksek oldukları söylenebilir (Çizelge 2.3). Çoğu toprak örneğinde yüksek miktarda demir bulunması dikkat çekicidir.

Bu ortamlarda metal toleransına sahip mikrobiyal izolatların varlığı jeokimyasal madde döngülerinin sürebilmesi için ön koşul olarak görülebilir. Aksi takdirde madde döngüsünün tamamen durması söz konusu olacaktır. Bu yaklaşımla elde edilen izolatlarımızın bioremediasyon çalışmalarına konu olması ve kullanılması sonraki çalışmaların ana hedeflerinden birisi olacaktır. Bu yolla metaller ile kirletilmiş yaşam ortamlarının ıslahına yönelik adımlar atılması mümkün görülmektedir. Uzun yıllardır metal eldesi için kullanılan Balya kurşun ocağı (Balıkesir), Karaçam nikel – demir ocağı (Eskişehir), Muratdere (Bilecik) ve Küre (Kastamonu) bakır ocaklarından çok sayıda aktinomiset izolatu elde edilebilmiş olması, bu öngörüğü destekleyen verilerdir.

4.2. İzolatların Çeşitli Metallere Olan Direncinin Katı ve Sıvı Besi Ortamlarında Belirlenmesi

4.2.1 Metal direncinin kalitatif tayini

Tarama çalışması sonucunda, çalışılan aktinomiset izolatlarının kurşun' a karşı önemli bir toleransa sahip olduğu belirlenmiştir. Denemeye alınan 135 izolatu 127 kadarı 200 mg/l konsantrasyonda kurşun varlığında büyümelerini sürdürmüştür. Dirençli izolat sayısının en yüksek olduğu ikinci metal ise %52.6 oranı ile nikel olarak saptanmıştır. Demir' e karşı %49.6, kobalt' a karşı %40.7, çinko' ya karşı %25.9, kadmiyum' a karşı %4.4, bakır' a karşı %3.7, ve civa' ya karşı da %3.7 oranında kullanılan en yüksek konsantrasyonda direnç gözlenmiştir. İzolatlardan önemli kısmının ise, bakır, kadmiyum ve civa' ya karşı duyarlı oldukları görülmektedir. Minimal inhibisyon konsantrasyonu, kullanılan ikinci en yüksek konsantrasyon olan izolatların tolerans yüzdelerine bakıldığında azımsanmayacak bir düzeyde olduğu görülmektedir. Birinci sırada %98.51 oranı ile civa' ya karşı tolerans ve sırasıyla %94.07 oranı ile demir, %91.85 oranı ile nikel, %62.96 oranı ile çinko, % 60 oranı ile kobalt, %54.81 oranı ile bakır, %14.81 oranı ile kadmiyum, %8.88 oranı ile kurşun bulunmaktadır.

Tarama çalışması sonucunda 1215 kodlu izolatu kullanılan metallere 6 tanesine; 105, 207, 230, 234, 603, 610, 615, 627, 705, 706 ve 722 kodlu izolatların ise

kullanılan metallere 5 tanesine karşı en yüksek metal konsantrasyonlarında bile direnç gösterdikleri belirlenmiştir. Bu izolatların yüksek metal toleransları oldukça dikkat çekicidir. Diğer izolatların önemli kısmının duyarlı olarak belirlendiği bakır, kadmiyum ve civa' ya karşı kullanılan en yüksek metal konsantrasyonlarına karşı bile dirençli olan izolatlar da elde edilebilmiştir. Bakır' a karşı 207, 536, 610, 626, 627 kodlu; kadmiyum' a karşı 207, 601, 603, 705, 1004, 1215 kodlu; civa' ya karşı 207, 211, 412, 524, 531 kodlu; izolatların tolerant oldukları görülmektedir. Özellikle 207 kodlu izolatın bakır, kadmiyum ve civa' ya karşı kullanılan en yüksek metal konsantrasyonlarına karşı bile dirençli görülmesi çarpıcı bir bulgudur.

Kullanılan 8 metalin 6 tanesine en yüksek konsantrasyonda bile direnç gösteren 1215 kodlu izolat; 1000 mg/l oranında nikel, kobalt, çinko, demir ve 200 mg/l oranında kadmiyum ve kurşun içeren ayrı besi ortamlarında gelişme gösterirken bu izolatın bakır için MİK değeri (denenen konsantrasyonlar arasında) 1000 mg/l, civa için ise 10 mg/l olarak belirlenmiştir. Denenen izolatlar arasında bakır' a karşı 1000 mg/l' de duyarlılığın yüksek olduğu görülmektedir. Oysa; 207, 536, 610, 626 ve 627 kodlu izolatların bakır için MİK değerinin 1000 mg/l' den daha yüksek olduğu ve dolayısı ile yüksek dirence sahip oldukları belirlenmiştir. MİK değeri kullanılan en küçük konsantrasyondan daha da düşük olarak belirlenen izolat sayısı; kobalt için 1, çinko için 3, kadmiyum için 24, civa için 58 olarak gözlemlenmiştir. Demir' e karşı toleransa bakıldığında ise MİK değerleri oldukça yüksek konsantrasyonlarda seyretmiştir. Bu aşamada kullanılan en yüksek metal konsantrasyonlarına dirençli olan izolatlar bir sonraki aşamada, yarı kantitatif olarak direnç belirlenmesi çalışması için seçilmiştir. En dirençli olduğu görülen 68 izolat bir sonraki aşamada değerlendirilmiştir.

4.2.2. Metal direncinin yarı kantitatif tayini

Yarı kantitatif direnç tarama çalışması sonucunda 613 kodlu izolatın kullanılan metallere 6 tanesine; 109, 112, 113, 206, 227, 234, 236 ve 723 kodlu izolatların ise kullanılan metallere 5 tanesine karşı en yüksek metal konsantrasyonlarında bile diğerlerinden yüksek direnç gösterdikleri belirlenmiştir. Bu izolatlar metal solüsyonu içeren disk çevresinde hiç inhibe olmadan büyüyebilmiştir.

Kadmiyum ve civa' ya karşı, kullanılan en yüksek metal konsantrasyonlarında bile dirençli olan izolatlar da elde edilebilmiştir. Diğer izolatların önemli kısmı, bu metaller

açısından duyarlı olarak belirlenmiştir. Kadmiyum' a karşı 109, 113, 206, 234, 236, 601, 603, 706, 1004 kodlu ve civa' ya karşı 224 kodlu izolatların tolerant oldukları görülmektedir.

101 ve 201 kodlu izolatlar ise kullanılan 8 metalin hiçbirisine karşı kullanılan en yüksek konsantrasyonda direnç gösterememiş dolayısıyla disk etrafında gelişmemiştir. Kullanılan 8 metalin 2 tanesine karşı, kullanılan en yüksek konsantrasyonda duyarlı olduğu belirlenen 613 kodlu izolatin kadmiyum'a karşı 11 mm ve civa' ya karşı 40 mm' den fazla zon çapı belirlenmiştir. 224 kodlu izolat ise; sadece civa' nın kullanılan bütün konsantrasyonlarına karşı direnç gösterebilmiş dolayısıyla civa solüsyonu emdirilmiş disklerin etrafında gelişebilmiş ve diğer 7 metalde kullanılan en yüksek konsantrasyonda zon çapları belirlenmiştir. Bunlar; nikel' de 16 mm, kobalt' ta 11 mm, çinko' da 16 mm, bakır' da 14.5 mm, demir' de 21.5 mm, kadmiyum' da 56.5 mm, kurşunda ise 11 mm olarak ölçülmüştür.

Yarı kantitatif olarak metal direnci belirlenen 68 aktinomiset izolatından kullanılan yüksek konsantrasyonlara direnç gösteren 7 tanesi seçilerek kantitatif olarak direnç belirlenmesi amacıyla bir sonraki aşamada değerlendirilmiştir.

Bu yöntem kullanılarak yapılan başka bir çalışmada denenen 7 *Streptomyces* suşunun metal toleransı incelenmiştir. Yine bu suşların nikel taşıma genlerinin taraması yapılarak toleransla bu genler arasında bir ilişki kurulmaya çalışılmıştır. Metallere karşı direnç en yüksek konsantrasyon olarak nikel' de 10 mM, krom' da 5 mM, kadmiyum' da 2 mM, kobalt' da 20 mM, bakır' da 5mM, çinko' da 50 mM olarak belirlenmiştir. (Amoroso et al., 2000) Yaptığımız çalışmada bu çalışmaya oranla nikel, kadmiyum, bakır için daha iyi sonuçlar elde edilmiş olup kobalt ve çinko için bu derece bir tolerans durumu gözlenememiştir. Çalışmamızda, nikel için yaklaşık olarak 2, kadmiyum ve bakır için 4 kat daha yüksek konsantrasyona tolerant olan izolatlar elde edilmiştir.

4.2.3. Metal direncinin kantitatif tayini

Sıvı besi ortamlarında elde edilen hücresel kitle artışı değerleri, bazı çalışmalarda metal toleransının değerlendirilmesi amacı ile kullanılmıştır (Amoroso et al. 1998). Çalışmamızda elde edilen kuru hücre ağırlığı ve hücresel kitle artışı değerlerinin (Çizelge 3.6. ve 3.7.) metal tipine bağlı olmadığı görülmüştür. Denenen aktinomiset izolatları, her üç metale de benzer oranlarda tolerans göstermiştir. Ayrıca

metal konsantrasyonu ile büyüme arasında bir korelasyon olmadığı görülmektedir. Konsantrasyonun artışı ya da azalması, büyüme üzerinde doğrusal bir etki yaratmamaktadır. Konsantrasyon arttıkça hücre gelişim yüzdesinin artışı da o mikroorganizmanın metal tolerans mekanizmasına bağlı olabileceği düşünülebilir. Bu durumda farklı mikroorganizmaları tolerans yönünden birbiriyle kıyaslamak çok doğru olmayacaktır. Metal toleransını mikroorganizmanın sıvı besiyerinde kütlece artış olarak değil de metabolik aktivitelerine (karbon kaynağı kullanımı, azot kaynağı kullanımı vs.) bakarak kıyaslamak daha doğru bir yaklaşım olabilir.

Alg hücreleri kullanılarak, sıvı besiyerinde ayrı ayrı kadmiyum, bakır, krom ve kurşun varlığında hücre büyümesine bakılan bir çalışmada; metal içeren ortamda gelişen hücre miktarı metal içermeyen besiyerindeki hücre miktarı ile karşılaştırılmıştır. Bu dört metal ortamının toksik etkilerini destekleyen sonuçlar elde edilmiş ve metallerin toksik etkileri birbirleri ile kıyaslanmıştır. Sonuçlara göre; bakır'ın diğer 3 metale oranla çok daha toksik, kurşunun ise en az toksisite gösteren metal olduğu belirlenmiştir. Bu dört metalin toksisite sırası ise; $Cu^{2+} > Cd^{2+} > Cr^{6+} > Pb^{2+}$ olarak verilmiştir. Sekiz günlük inkübasyon sonucunda hücre gelişimini bakır'ın %90, kadmiyum'un %84, krom'un %71, kurşun'un ise %68 oranında azalttığı belirlenmiştir (Rehman et al., 2007). Bu çalışmada belirlenen kurşun varlığında hücre gelişimi ve kurşun toksisitesine direnç özelliği, çalışmamızda elde edilen sonuçlar ile uyum göstermektedir.

4.3. Metal Direncinin Biyosorpsiyon ile İlişkisinin Belirlenmesi

Bakterilerin metal toleransından sorumlu bazı ortak mekanizmaların varlığı bilinmektedir. Bakterilerin hücreye giren toksik metalleri hücre dışına pompalama ve enzimler aracılığı ile toksik metal formlarını daha az toksik metal formlarına dönüştürme yolları ile metallerin toksisitelerinden korundukları bildirilmektedir. Bu mekanizmaların plazmid ve kromozomal kodlu bakteriyal metal toleransında aynı ya da benzer olduğu düşünülmektedir. Bu mekanizmaların yanı sıra biyoakümülyasyonun da bir rezistans mekanizması olarak kullanıldığı bilinmektedir (Silver and Phung, 1996). Bu durumda biyosorpsiyon ile metal toleransı arasında bir korelasyonun varlığı da doğal bir araştırma konusu olmalıdır.

Çalışmamızda elde edilen verilerin istatistiksel yöntemlerle değerlendirilmesi sonucunda metal toleransı ile biyosorpsiyon arasında pozitif ya da negatif bir ilişki belirlenmemiştir. Farklı metal toleransı gösteren toplam 18 izolatın birbiri ile karşılaştırılmasından elde edilen veriler, bu iki özellik arasında pozitif ya da negatif bir ilişkinin olmadığını göstermektedir. Bu durum, izolatlarımızda metal toleransından sorumlu mekanizmanın bioakümüülasyonun olmadığını, bunun yerine metalleri hücre dışına pompalama ya da daha az toksik formlara dönüştürme gibi mekanizmaların işlev görebileceğini düşündürmektedir.

Ayrıca yüksek biyosorpsiyon kapasitesi ile dikkat çeken birçok izolatın izolasyon ortamında (Çizelge 2.3. ve 3.12.) nispeten az miktarda kurşun bulunduğu veya hiç bulunmadığı gözlenmiştir. 723 kodlu izolatın bulunduğu ortamda kalan kurşun miktarı 57.18 mg/l, 113 kodlu izolatın 58.46 mg/l, 301 kodlu izolatın ise 59.44 mg/l olarak belirlenmiştir.

Bu veriler de tolerans ve biyosorpsiyon arasında bir korelasyon varlığını şüpheli hale getirmektedir.

4.4. Seçilen Bir Aktinomiset İzolatının Biyosorpsiyonda Kullanımı

Çalışmanın bu kısmında *Streptomyces* 723 kodlu izolatın sulu çözeltilerden Pb^{2+} iyonlarının biyosorpsiyon yöntemiyle uzaklaştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla biyosorpsiyona etki eden pH, biyokütle, başlangıç metal iyonu konsantrasyonları, denge süresi gibi parametreler batch (kesikli) sistemde optimize edilmiştir. Ayrıca biyosorpsiyon işlemi kolon (sürekli) sisteminde de uygulanmış ve akış hızı, kolon çapı ve başlangıç metal iyonu konsantrasyonu için en uygun koşullar belirlenmiştir. Kullanılan bakteriyal biyokütle Na-alginat ve agarda immobilize edilerek, immobilize biyokütlelerin Pb^{2+} biyosorpsiyon kapasiteleri karşılaştırılmıştır. En yüksek kapasiteye sahip Na-alginat ile immobilize edilen biyokütlenin desorpsiyon ve tekrar kullanım özellikleri de belirlenmiştir. Ayrıca bu biyokütlenin büyük ölçekte kullanımı CFST sistemi ile değerlendirilmiştir.

4.4.1. Batch (Kesikli Sistem) kurşun (Pb^{++}) biyosorpsiyonu

4.4.1.1. Biyosorpsiyona pH etkisi

Şekil 3.5' te *Streptomyces* 723 kodlu izolattan hazırlanan kuru biyokütlenin biyosorpsiyon kapasitesine başlangıç pH' ının etkisi görülmektedir. Biyosorpsiyon kapasitesi pH 3.0'de maksimum değere ulaşmakta (22.39 mg/g), bu pH' ın altındaki değerlerde ise çok düşük biyosorpsiyon gözlenmektedir. Bu değerlerin üzerindeki pH değerlerinde biyosorpsiyon kapasitesi biraz azalmakla beraber sabit kalmaktadır. pH 5.0' in üzerindeki değerlerde ise kurşun iyonlarının hidroksit bileşiği şeklinde çökme eğiliminden dolayı biyosorpsiyon çalışmaları yapılmamıştır. Biyosorpsiyon çalışmaları süresince ortam pH' ının değişimi izlenmiş ve ortam pH' ına bağlı olarak ortama salınan Na^+ ve K^+ iyonlarının derişimleri ölçülmüştür. Şekil 3.5' ten görüleceği üzere, biyosorpsiyon süresince başlangıç pH' larında 3.0' den itibaren son pH değerleri yaklaşık 4.2 - 5.0 arasında değişmektedir. Ayrıca ortama salınan Na^+ ve K^+ iyonlarının konsantrasyonları pH 3.0' de maksimum değere ulaşmaktadır. Bu durum biyosorpsiyon prosesinde iyon değişimi mekanizmasının da etkili olabileceğini düşündürmektedir. Çok düşük pH değerlerinde ortamdaki H^+ iyonu konsantrasyonunun çok yüksek olması nedeniyle protonlar pozitif yüklü kurşun iyonları ile biyosorbent yüzeyine bağlanmak için yarışmakta ve protonlanan biyosorbent yüzeyi ile kurşun iyonları arasındaki elektrostatik itme kuvvetleri nedeniyle biyosorpsiyon kısıtlanmaktadır. Çalışmada elde edilen bu sonuçlar literatür ile uyum içerisindedir (Friis ve Myers-Keith, 1986; Holan ve Volesky, 1994).

4.4.1.2. Biyosorpsiyona biyokütle miktarı etkisi

Farklı biyokütle miktarları ile gerçekleştirilen deneylerin sonuçları Şekil 3.6' da sunulmuştur. Biyokütle miktarı 0.4 g/l' den 2.0 g/l' ye artması Pb^{2+} biyosorpsiyon kapasitesininin 4.85 mg/g' dan 22.18 mg/g değerine artmasına neden olmuştur. 2 g/l' den yüksek biyokütle miktarlarında ise biyosorpsiyon kapasitesinde azalma söz konusudur. Belirli bir miktardan sonra biyokütle metal iyonları bakımından doygunluğa ulaşmakta ve ortamdaki kurşun iyonu derişimi sabit olduğundan kullanılan biyokütle miktarının artması ile biyosorpsiyon kapasitesi azalmaktadır. Çalışmada Pb^{2+} biyosorpsiyonu için

en uygun biyosorbent konsantrasyonu 2.0 g/l olarak bulunmuş ve daha sonraki çalışmalar bu konsantrasyon kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.4.1.3. Biyosorpsiyona temas süresinin etkisi

Şekil 3.7' de temas süresinin biyosorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi görülmektedir. Şekilden görüleceği gibi biyosorpsiyon yaklaşık 50 dakikada dengeye ulaşmakta ve bu süreden sonra kapasitede kayda değer bir değişim gözlenmemektedir. Bu durum sabit miktardaki biyokütle yüzeyindeki metal bağlanma merkezlerinin tamamının metal iyonları ile doygunluğa ulaşmasının bir sonucu olarak açıklanabilir. Biyosorpsiyon dengesinin kısa bir sürede kurulması yöntemin uygulanabilirliğine avantaj sağlamaktadır.

4.4.1.4. Biyosorpsiyona başlangıç Pb^{2+} iyonu konsantrasyonunun etkisi

Streptomyces 723 kodlu izolattan hazırlanan kuru biyokütle ile Pb^{2+} iyonlarının biyosorpsiyonu üzerine başlangıç metal iyonu konsantrasyonunun etkisi 100-500 mg/l aralığında çalışılarak incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 3.8.' de verilmiştir. Metal iyonlarının başlangıç konsantrasyonunun 100 mg/l' den 400 mg/l' ye artması biyosorpsiyon kapasitesinin 23.10 mg/g' dan 86.65 mg/g' a artmasına neden olmuştur. 400 mg/l' den daha yüksek başlangıç metal iyonu konsantrasyonlarında biyosorpsiyon kapasitesi hemen hemen sabit kalmıştır. Bu durum, sabit miktarda biyokütle kullanıldığında belirli bir metal iyonu derişiminden sonra biyokütlenin doygunluğa ulaşması ile açıklanabilir.

4.4.2. Sıkıştırılmış yatak kolonda (Sürekli Sistem) kurşun (Pb^{++}) biyosorpsiyonu

Streptomyces 723 kodlu izolattan hazırlanan kuru biyokütlenin biyosorpsiyon performansı batch sisteminin yanı sıra sıkıştırılmış yatak kolonda da incelenmiştir. Kolon çalışmalarında batch prosesi ile optimize edilen pH, biyokütle konsantrasyonu değerleri kullanılarak akış hızı, kolon çapı ve başlangıç metal iyonu konsantrasyonunun biyosorpsiyon kapasitesine etkisi araştırılmıştır. Böylece her iki proses performans açısından karşılaştırılmıştır.

Biyosorpsiyona kolon çapının etkisi 9, 11, 13 ve 19 mm' lik kolonlar kullanılarak sabit akış hızında (3 ml/dk) incelenmiştir (Şekil 3.9). Kolon çapının 9 mm'

den 19 mm' ye artması ile biyosorpsiyon kapasitesinde 6.80 mg/g' dan 16,45 mg/g' a artış gözlenmiştir. Kullanılan biyokütle miktarı sabit olduğundan kolon çapının artması ile biyosorbentin metal çözeltisi ile etkileşebilecek yüzey alanı artmakta ve bu durum biyosorpsiyon kapasitesinin artması ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle daha sonraki kolon çalışmalarında en yüksek biyosorpsiyon kapasitesinin elde edildiği 19 mm çaplı kolonlar kullanılmıştır.

Kolonda yapılan biyosorpsiyon çalışmalarında biyosorpsiyon kapasitesine etki eden bir diğer önemli faktör kolondan geçirilen çözeltinin akış hızıdır. Çalışmada çözeltinin akış hızı bir peristaltik pompa yardımıyla 1 ml/dk' dan 15 ml/dk 'ya kadar değiştirilerek, farklı akış hızlarında bakteriyal biyokütlenin biyosorpsiyon kapasiteleri karşılaştırılmıştır. Akış hızı 1 ml/dk' dan 15 ml/dk' ya yükseltildiğinde biyosorpsiyon kapasitesi 21.50 mg/g' dan 3.30 mg/g değerine azalmıştır (Şekil 3.10). Akış hızındaki artışla biyosorpsiyon kapasitesinde önemli ölçüde düşüş gözlenmesi, Pb²⁺ çözeltisi ile biyokütlenin etkileşimi için yeterli sürenin sağlanamamasından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle kolon çalışmalarında en düşük akış hızı olan 1 ml/dk optimum akış hızı olarak belirlenmiştir.

Başlangıç metal iyonu derişiminin biyosorpsiyon kapasitesine etkisi batch sisteminin yanı sıra kolon sisteminde de aynı koşullarda incelenmiş ve benzer sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 3.11). Batch ve kolon sistemlerinde farklı başlangıç Pb²⁺ iyonu konsantrasyonlarında elde edilen denge verileri Freundlich ve Langmuir izoterm modelleri ile değerlendirilmiştir. Şekil 3.12 ve 13'de *Streptomyces* 723 kodlu izolattan hazırlanan kuru biyokütlenin batch ve kolon sistemlerinde sırasıyla Freundlich ve Langmuir izoterm grafikleri, Çizelge 3.9' da ise bu grafiklerin değerlendirilmesi ile hesaplanan izoterm sabitleri görülmektedir. Çizelge 3.9' daki r^2 değerleri kıyaslandığında bakteriyal biyokütle ile Pb²⁺ iyonlarının biyosorpsiyonu Freundlich ve Langmuir izotermelerinin her ikisine de uygunluk göstermektedir. Ancak Langmuir modelinden hesaplanan maksimum tek tabakalı biyosorpsiyon kapasitesi (q_{max}) değerleri deneysel olarak elde edilen maksimum biyosorpsiyon kapasitesi değerleri ile uygun olmadığından, bakteriyal biyokütle ile Pb²⁺ biyosorpsiyonunun Freundlich modeli ile tanımlanması daha uygundur.

Şekil 3.14, batch ve kolon sistemlerinde kuru ve yaş biyoküteller için biyosorpsiyon kapasitelerini göstermektedir. Kuru hücre ile her iki sistemde de elde

edilen biyosorpsiyon kapasiteleri yaş hücre ile elde edilen kapasitelere göre oldukça yüksektir. Bu, beklenen bir sonuçtur ve canlı hücrelerin metal direnci göstermesi ile açıklanabilir. Ayrıca kuru biyokütleler ile yapılan biyosorpsiyon çalışmaları bu tip biyokütleleri oluşturan mikroorganizmaların besin kaynağına ihtiyaç duymaması ve toksisiteden etkilenmemesi gibi önemli avantajlar sunmaktadır (Yan and Viraraghavan, 2001).

Biyosorpsiyon çalışmalarında serbest formdaki biyokütlelerin yanı sıra immobilize biyokütlelerin kullanımı da son yıllarda önem kazanmıştır. Immobilize formdaki biyokütlelerin kullanımı özellikle yüksek mekanik kararlılık, yüksek desorpsiyon verimi, tekrar kullanılabilirlik ve yüksek biyosorpsiyon kapasiteleri gibi avantajları nedeniyle pratik uygulamalarda öne çıkmaktadır (Stoll and Duncan, 1997; Yan and Viraraghavan, 2001; Valdman et al., 2001; Marseaut et. al, 2004). Bu nedenle, çalışma kapsamında kullanılan kuru biyokütle Na-alginat ve agar ile immobilize edilmiş ve sonuçlar Şekil 3.15' de verilmiştir. Bu sonuçlara göre Na-alginat ile immobilize edilen biyokütle en yüksek biyosorpsiyon kapasitesine sahiptir. Bu nedenle, desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik çalışmaları Na-alginat ile immobilize edilen biyokütle ile gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon ajanı olarak 0.1 M HCl, 0.1 M HNO₃ ve 0.1 M EDTA çözeltileri kullanılmış ve en yüksek Pb²⁺ geri kazanım verimi 0.1 M HNO₃ çözeltisi ile elde edilmiştir (Şekil 3.16). Biyosorpsiyon ajanı olarak 0.1 M HNO₃ kullanıldığında immobilize sistem biyosorpsiyon ve desorpsiyon verimlerinde önemli bir değişim olmaksızın 5 kez ardarda kullanılabilir (Şekil 3.17). Aynı biyokütlenin tekrar kullanılabilirliği biyosorpsiyon amacı ile kullanılacak biyosorbentlerde ekonomik açıdan aranan önemli bir özelliktir.

4.4.3. Akışkan reaktör sisteminde (CFST) kurşun (Pb⁺⁺) biyosorpsiyonu

Çalışmamızda en yüksek biyosorpsiyon kapasitesine sahip, Na-alginatta immobilize edilen biyokütlenin büyük ölçekte uygulaması CFST sisteminde gerçekleştirilmiştir. Optimum batch koşullarında kullanılan biyokütle miktarı ve metal iyonu çözeltisi hacmi 20 kat artırılarak sistemden belirli zaman aralıklarında belirli hacimde örnek alınmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.18' de sunulmuştur. Şekilden de görüleceği gibi biyosorpsiyon kapasitesi yaklaşık 50 dakikadan sonra sabit kalmaktadır. CFST sisteminden elde edilen bu sonuç batch sisteminden elde edilen biyosorpsiyon

denge süresi ile uyumludur. Ayrıca bu sistemde Pb^{2+} iyonlarının giderim verimi 400 mg/l başlangıç Pb^{2+} iyonu derişiminde yaklaşık %91 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre CFST sisteminin kurşun iyonlarının gideriminde oldukça etkili olduğunu söylemek mümkündür.

4.5. Metal Direncine ve/veya Yüksek Biyosorpsiyon Kapasitesine Sahip İzolatların Kemotaksonomik, Nümerik ve Moleküler Metodlarla İdentifikasyonu

4.5.1. Aktinomiset izolatlarının kemotaksonomik özellikleri

Lechevalier (1989) tarafından L-DAP içeren aktinomisetler, *Nocardioides* Prauser, *Intrasporangium* Kalakoutsii, Krillova and Krasil'nikov, *Streptomyces* Waksman and Henrici, *Kitasatosporia* Omura et al., *Streptoverticillium* Baldacci, *Kineosporia* Pagani and Parenti ve *Sporichthya* Lechevalier, Lechevalier and Holbert cinsleri altında toplanmışlar ve çeper tipine göre Kemotip I grubu olarak sınıflandırılmışlardır. Yüksek biyosorpsiyon kapasitesi gösteren 723 kodlu izolatımız, L-DAP içermesi nedeni ile hücre çeperi tip I içerisine alınmıştır.

Hücre çeperinde L-DAP içeren aktinomisetler arasında havasal misele ve havasal miselde de spor zincirine sahip olma özelliği *Streptomyces* cinsini karakterize eden bir özelliktir. Bu nedenle ISP 4 besiyerinde 14 günlük büyüme sonrasında rectiflexibles ve rectinaculiaperti tipte spor zincir morfolojisi gösteren 723 kodlu izolatımızı cins seviyesinde *Streptomyces* sp. olarak değerlendirmekteyiz.

4.5.2. Aktinomiset izolatlarının nümerik taksonomisi

Nümerik taksonomi testlerinde değerlendirilen 44 test suşunun S_{SM} and COMPLETE algoritmi ile analizi sonucunda %80 benzerlik seviyesinde 5 minör (2-4 suş) ve 7 tek üyeli küme oluşturduğu görülmektedir. Türkiye' nin çeşitli metalik maden yataklarından ve metal ile kirletilmiş ortamlardan izole edilmiş olan *Streptomyces* izolatlarının standart tip türler ile yakın ve/veya aynı kümelerde konumlanmaması bu izolatların bilinen tip türlerden farklılığını ifade eden bir bulgudur. Bu izolatlardan 7 tanesi tek üyeli küme oluşturması ile dikkat çekmektedir. *Streptomyces* *kranskii* ve *Streptomyces* *rimosus* dışında hiçbir referans tip tür metal kontamine ortamdan izole edilmiş olan *Streptomyces* izolatları ile aynı kümede yer almamıştır.

Bu çalışmada ortalama test hatası değeri % 3.33 olarak belirlenmiştir. Sneath ve Johnson (1972) nümerik çalışmalarda %10 test hatasını normal ve kabul edilebilir bulmaktadır. Elde edilen test hatası verileri önceki bazı nümerik çalışmalar ile benzer ve/veya karşılaştırılabilir düzeydedir. Nötrofilik, mezofilik *Streptomyces* (%3.36), *Actinomadura* cinsi (%6.1), *Nocardia* cinsi (%7.1) oldukça yüksek test hatası veren gruplar olarak dikkat çekmiştir (Şahin ve ark., 2001).

Sonuç olarak metal ile kirletilmiş ortamlardan izole edilmiş olan *Streptomyces* izolatlarının referans *Streptomyces* tip türlerinden belirgin biçimde ayrıldığı görülmektedir. Çok sayıda karakterin aynı zamanda ve aynı değerde kullanımını öngörmesi nedeni ile nümerik taksonomik çalışmalar güvenilir ve objektif sonuçlar üretmektedir. Bu nedenle elde edilen sonuçlar sonraki çalışmalar için cesaret verici nitelikte kabul edilebilir.

4.6. Sonuç

Yoğun kullanım nedeni ile ağır metallerin doğada birikimleri, ekosistemleri tehdit ettikleri gibi besin zinciri yolu ile insanlara kadar da kolayca ulaşabilmektedir. Bu ortamlarda ağır metal kirliliği nedeni ile otoepürasyon ve madde döngüsünde olan kırılmalar da olayın diğer ciddi bir boyutunu oluşturmaktadır.

Metal - mikroorganizma ilişkileri arasında ilk sıralarda dikkati çekenler tolerans ve biyosorpsiyon ile ilişkili olanlardır. Metal tolerant mikroorganizmaların metal ile kirletilmiş ekosistemlerin bioremediasyonu amacı ile kullanım potansiyeli özel önem taşımaktadır. Diğer mikroorganizma grupları arasında aktinomisetlerin kuraklığa karşı da tolerant olması nedeni ile bu amaçla kullanım potansiyelleri oldukça önemli görülmektedir.

Biyosorpsiyon ise, ekosistemin metallerin toksik etkilerinden korunması açısından oldukça önemli görülmektedir. Bu nedenle metallerin ekosistemden uzaklaştırılması için uygun biyosorbent bulunmasına yönelik çok sayıda araştırma yapılagelmiştir.

Yüksek toleransa sahip olan mikroorganizmaların yüksek biyosorpsiyon kapasitesi gösterip göstermeyeceği dikkat çeken bir konudur. Bu çalışmada aktinomiset izolatlarının metal toleransı ile biyosorpsiyonu arasında bir korelasyonun varlığı sorgulanmıştır. Elde edilen verilerin istatistiksel yöntemlerle değerlendirilmesi değişik

tolerans seviyelerine ait izolatların biyosorpsiyon kapasiteleri arasında doğrusal bir ilişki olmadığını vurgulamaktadır. Çok sayıda aksine örnek olmasına ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmamasına karşın, en yüksek biyosorpsiyon kapasitesine sahip olan *Streptomyces* 723 kodlu izolatımızın en yüksek toleransa sahip grup içinde yer alması dikkat çekicidir.

Çalışmanın biyosorpsiyon kısmı kapsamında incelenen *Streptomyces* 723 kodlu izolattan hazırlanan kuru biyokütle ve Na-alginat ile immobilize biyokütlenin biyosorpsiyon performansı batch, kolon ve CFST sistemlerinde değerlendirildiğinde, sulu çözeltilerden Pb^{2+} iyonlarının biyosorpsiyon yoluyla uzaklaştırılmasında etkili bir biyosorbent olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak, aktinomiset izolatlarının metal toleransı ile biyosorpsiyon arasında bir korelasyonun olmadığı kanısına varılan bu çalışmada elde edilen veriler;

- a. Metal varlığında büyümesini sürdürebilecek özelliğe sahip olması nedeni ile bioremediasyon amacı ile kullanılabilir öneme sahip izolatların elde edilmesi,
- b. Yüksek biyosorpsiyon kapasitesi ile dikkat çeken ve kurşun iyonu için optimize edilmiş biyosorbent eldesi,
- c. Tatlı su çevrelerinde bulunan metallerin uzaklaştırılmaları, konsantre edilmeleri ve/veya geri kazanımları amacı ile verimli biçimde kullanılabilir izolat eldesi,
- d. Yeni tür olabilecek *Streptomyces* izolatları elde edilmesi,
- e. Sediment örneklerinde bulunan aktinomiset izolatlarına yönelik bilgi birikimine katkı sağlanması,
- f. Ülkemizde sucül aktinomisetler ile yapılacak çalışmalara başlangıç oluşumu,

gibi nedenlerle önemli görülebilir. Bu konular aynı zamanda çalışmanın sonraki olası yönelimleri arasında olmaya değer önemde görülmektedir.

5. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akar T., 2001, Çimento Toz Emisyonlarına Maruz Kalan İnsanların Plazmalarında Ni, Cd, Cr ve Co Elementlerinin ve Eritrosit Mambran Transport Enzim Düzeylerinin Belirlenmesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir.
- Akar, T., 2005, Furanosteroid Yapılı Bazı Bileşiklerin Antifungal Etkinliğinin ve *Neurospora crassa* Fungal Kültürünün Biyotransformasyon ve Biyosorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Eskişehir.
- Aksu, Z., Sağ, Y., and Kutsal, T., 1992, The biosorption of copper (II) by *C. vulgaris* and *Z. ramigera*. *Environmental Technology*, 13, 579-586.
- Aksu, Z., Çalik, A., Dursun, A.Y., and Demircan, Z., 1999, Biosorption of iron (III)-cyanide anions to *Rhizopus arrhizus*: application of adsorption isotherms. *Process Biochemistry*, 34, 483-491.
- Amoroso, M. J., Castro, G. R. , Carlino, F. J., Romero, N. C., Hill, R. T. and Oliver, G., 1998, Screening of heavy metal-tolerant actinomycetes isolated from the Sali River. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44:129-132.
- Amoroso, M.J., Schubert, D., Mitscherlich, Schumann, P. and Kothe, E., 2000 Evidence for high affinity nickel transporter genes in heavy metal resistant *Streptomyces* spec., *J. Basic Microbiol.*, 40, 5-6, 295-301.
- Amoroso, M.J., Castro, G.R., Durán , A., Peraud , O., Oliver , G. and Hill, R.T., 2001, Chromium accumulation by two *Streptomyces* spp. isolated from riverine sediments, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 26, 210-215.
- Arica, M.Y. Kaçar, A. and Genç, Ö., 2001, Entrapment of white-rot fungus *Trametes versicolor* in Ca-alginate beads: preparation and biosorption kinetic analysis for cadmium removal from aqueous solution, *Bioresource Technology*, 80, 121-129.
- Bal, Y., Bal, K.E. and Lalam, A., 2003, Removal of Bi (III) and Zn (II) by nonliving *Streptomyces rimosus* biomass from nitric solutions, *The European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection*, 3, 1, 42-48.
- Becker, B., Lechevalier, M.P. and Lechevalier, H.A., 1965, Chemical composition of cell-wall preparations from strains of various form-genera of aerobic Actinomycetes, *Appl. Microbiol.*, 13(2), 236-243.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Chang, J.S., Huang, J.C., Chang, C.C., and Tarn, T.J., 1998, Removal and recovery of lead fixed-bed biosorption with immobilized bacterial biomass. *Water Sci Tech*, 38(4-5), 171-178.
- Çabuk, A., 2001, Sıkıştırılmış yatak biyoreaktörde immobilize bakteriyal biyokütle kullanılarak atık suların ağır metal giderimi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir.
- Döner Dedeoğlu, E., 2000, Kurşun pollusyonlu topraklardan izole edilen fungusların kurşun toleranslarının ve atık sularındaki kurşunu sorblama yeteneklerinin belirlenmesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir.
- Endo, G., Ji, G. and Siver, S., 1996, Heavy metal resistance plasmids and use in bioremediation, In: Moo-Young, M., Anderson, W.A. ve Chakrabarty, A.M. (Eds.), *Environmental Biotechnology principles and Applications*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London, 768 p.
- Friis, N and Myers-Keith, 1986, P. Biosorption of uranium and lead by *Streptomyces longwoodensis*. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 21-28
- Gabriel, J., Baldrian, P., Hladokova, K. and Hakova, M., 2001, Copper sorption by native and modified pellets of wood-rotting basidiomycetes, *Letters in Applied Microbiology*, 32, 194-198.
- Gadd, G.M., 1990, Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Experientia*, 46: 834-840.
- Gannon, E.J., Zabinski, C.A., Moynahan, O.S., 2002, Microbial community structure and carbon-utilization diversity in a mine tailings revegetation study, *Restoration Ecology*, 10, 77-87.
- Giasson, P., Jaouich, A., Cayer, P., Gagné, S., Moutoglis, P., Massicotte, L., 2006, Enhanced phytoremediation : A study of mycorrhizoremediation of heavy metal-contaminated soil, *Willey Interscience Remediation Journal*, 17, 97 – 110.
- Golab, Z., Orłowska, B., Smith, R.W., 1991, Biosorption of lead and uranium by *Streptomyces* sp. *Water Air Soil Pollut.* 60, 99–106.
- Golab, Z., Breitenbach, M., Jezierski, A., 1995, Sites of copper-binding in *Streptomyces pilosus*, *Water air and soil pollution*, 82 (3-4): 713-721.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Goodfellow, M. and Williams, S.T., 1983, Ecology of Actinomycetes, *Ann. Rev. Microbiol.*, 37, 189-216.

Güney, Y. ve Koyuncu, H., 2002, Porsuk nehri dip sedimentlerinin kimyasal ve mikroyapısal özellikleri, Türkiye' nin Kıyı ve Deniz Alanları, IV. Ulusal Konferansı Bildiriler Kitabı, Vol. 2, 969-979.

Holan, Z.R. and Volesky, B., 1994, Biosorption of lead and nickel by biomass of marine algae. *Biotechnol. Bioeng.* 43, 1001-1009.

<http://www.atal.tubitak.gov.tr/istanbul/DenizSarica.pdf>

Kefala, M.I., Zouboulis, A.I. and Matis, K.A., 1999, Biosorption of cadmium ions by Actinomycetes and separation by flotation, *Environmental Pollution*, 104, 283-293.

Kılıçarslan, S., 1999, Ağır metal iyonlarını içeren besin ortamlarında üretilen mikroorganizmalarla kesikli sistemde Cr, Pb ve Cu iyonlarının adsorpsiyonu, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir.

Korn-Wendish, F. and Kutzner H.J., 1992, The Family *Streptomycetaceae*, In: The Prokaryotes (Eds. Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H.), 921-995, Springer-Verlag, New York.

Küster, E. and Williams, S.T., 1964, Selection of media for isolation of Streptomyces, *Nature (London)*, 202, 928-929.

Langham, C.D., Williams, S.T., Sneath, P.H.A. and Mortimer, A.M., 1989, New probability matrices for identification of *Streptomyces*, *J. Gen. Microbiol.*, 135, 121-133.

Lechevalier, H.A., The Actinomycetes III, A practical guide to generic identification of Actinomycetes, In: Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology (Eds. Williams, S.T., Sharpe, M.E. and Holt, J.G.) 1989, Vol. 4, 2344-2347, The Williams & Wilkins Comp., Baltimore.

Lehninger, A.L., 1993, *Principles of Biochemistry*, 2nd ed., Worth Publishers, New York

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Leyval, C., Turnau, K and Haselwandter, K., 1997, Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects, *Mycorrhiza*, 7, 139–153.
- Lin, A.J., Zhang X.H., Wong, M.H., Ye Z.H., Lou, L.Q., Wang, Y.S., Zhu, Y.G., 2007, Increase of multi-metal tolerance of three leguminous plants by arbuscular mycorrhizal fungi colonization, *Environ. Geochem. Health*, 29, 473-481
- Locci, R., 1989, *Streptomyces* and related genera, In: Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology (Eds. Williams, S.T., Sharpe, M.E. and Holt, J.G.), Vol. 4, 2451-2508, The Williams & Wilkins Comp., Baltimore.
- Marseaut, S., Debourg, A., Dostalek, P., Votruba, J., Kuncova, G., Tobin, J. M., 2004, A silica matrix biosorbent of cadmium. *Int. Biodet. Biodegr.* 54, 209-214.
- Mattuschka, B. and Straube G., 1993, Biosorption of metals by a waste biomass. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 58 57-63.
- Mc Carthy, A.J., and Williams, S.T., 1990, Methods for studying the Actinomycetes, *Methods in Microbiology*, 22, 533-563.
- Mengoni, A., Barzanti, R., Gonnelli, C., Gabbrielli, R. and Bazzicalupo, M., 2001, Characterization of nickel-resistant bacteria isolated from serpentine soil, *Environ. Microbiol.*, 3, 11, 691-698.
- Mills, A.L., 1997, Metal requirements and tolerance, In: Hurst, C.J. (Ed.), *Manual of Environmental Microbiology*, ASM Press, Washington D.C., 349-357.
- Muraleedharan, T. R., Iyengar, L. and Venkobachar, C., 1995, Screening of Tropical Wood-Rotting Mushrooms for Copper Biosorption, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 9, 3507–3508.
- Nitsch. B. and Kutzner, H.J., Egg-yolk agar as a diagnostic medium for streptomycetes, *Experientia*, 25: 113.
- Nriagu, J.O. and Pacyma, J.M, 1988, Quantitative assesment of world-wide contamination of air, water and soils by trace elements, *Nature*, 333, 134-139.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Özcan, S. ve Özcengiz, G., 2003, *Phanerochaete chrysosporium*' da Pb (II), Ni (II) ve Cr (II) tresine yanıtın proteom analizi, *XII. Biyoteknoloji Kongresi Bildiri Kitapçığı*, 172-177.
- Öztürk, A., Artan, T., Ayar, A., 2004, Biosorption of nickel (II) and copper (II) ions fom aqueous solution by *Streptomyces coelicolor* A3 (2), *Colloids and Surfaces B: Bioimterfaces*, 34, 105-111.
- Puranik, P.R., Chabukswar, N.S., Paknikar, K.M., 1995, Cadmium biosorption by *Streptomyces pimprina* waste biomass, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43 (6): 1118-1121.
- Ravel, J., Amoroso, M.J., Colwell, R.R., Hill, R.T., Mercurresistant actinomycetes from Chesapeake Bay, *FEMS microbiology letters*, 162: 177-184, 1998.
- Rehman, A., Shakoori, F.R., Shakoori, A.R., 2007, Heavy metal resistant *Distigma proteus* (Euglenophyta) isolated from industrial effluents and its possible role in bioremediation of contaminated wastewaters, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 23, 753-758.
- Rho, J.Y. and Kim J.H., 2002, Heavy metal biosorption and its significance to metal tolerance of *Streptomyces*, *The Journal of Microbiology*, 51-54.
- Sağ E., 2002, Eskişehir Merkez Çukurhisar Kasabası' nda çimento fabrikası ve trafik yoğunluğuna bağlı kurşun kirliliğinin belirlenmesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir.
- Sağ, Y., Nourbakhsh, M., Aksu, Z., and Kutsal, T., 1995, Comparison of Ca-alginat and immobilized *Z. ramigera* as sorbents for copper (II) removal, *Process Biochemistry*, 30(2), 175-181.
- Sağ, Y., Ataçoğlu, I., and Kutsal, T., 2000a, Equilibrium parameters for the single-and multicomponent biosorption of Cr(VI) and Fe(III) ions on *R. arrhizus* in a packed column. *Hydrometallurgy*, 55, 165-179.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Sağ, Y., Yalçuk, A., and Kutsal, T., 2000b, Mono and multi-component biosorption of heavy metal ions on *Rhizopus arrhizus* in a CFST, *Process Biochemistry*, 35, 787-799.
- Sağ, Y., and Aktay, Y., 2001, Application of equilibrium and mass transfer models to dynamic removal of Cr(VI) ions by chitin in packed column reactor. *Process Biochemistry*, 36, 1187-1197.
- Sağ, Y., Tatar, B. and Kutsal, T., 2003, Biosorption of Pb (II) and Cu (II) by activated sludge in batch and continuous-flow stirred reactors, *Bioresource Technology*, 87, 27-33.
- Shirling and Gottlieb, 1966, Methods for characterization of *Streptomyces* species, *Int. J. Sys. Bacteriol.*, 16(3), 313-340.
- Silver, S and Phung, L.T., 1996, Bacterial heavy metal resistance: New surprises, *Annu. Rev. Microbiol.*, 50, 753 – 789.
- Sing, C. and Yu, J., 1998, Copper adsorption and removal from water by living mycelium of white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Water Res.*, 32, 9, 2746-2752.
- Sneath, P. H. A. and Johnson, R., 1972, The influence on numerical taxonomic similarities of errors in microbiological tests. *Journal of General Microbiology*, 72, 377-392.
- Sokal and Michener, 1958
- Staneck, J.L. and Roberts, G.D., 1974, Simplified approach to identification of aerobic Actinomycetes by thin-layer chromatography, *Appl. Microbiol.*, 28(2), 226-231
- Stoll, A. and Duncan, J.R., 1997, Comparison of the heavy metal sorptive properties of three types of immobilized, non viable *Saccharomyces cerevisiae* biomass. *Process Biochem.* 32, 467-472.
- Şahin, N., Yalçın, İ., Işık, K., Kariptaş, E. ve Özkanca, R., 2001, Notrofilik-mezofilik streptomyceteslerin izolasyonu ve numerik taksonomisi, *Journal of Biotechnology*, 25, 67-81.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Tobin, J.M., Cooper, D.G., and Neufeld, R.J., 1990, Investigation of the mechanism of metal uptake by denaturated *Rhizopus arrhizus* biomass. *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 591-595.
- Valdman E., Erijman L., Pessoa, F.L.P., Leite S.G.F., 2001, Continuous biosorption of Cu and Zn by immobilized biomass *Sargassum sp.* *Process Biochem.* 36, 869-873.
- Veglio, F. and Beolchini, F., 1997, Removal of metals by biosorption : a review, *Hydrometallurgy*, 44, 301-316.
- Volesky, B. and Holan, Z.R., 1995, Biosorption of heavy metals, *Biotechnol Prog.* 11, 235-250.
- Williams, S.T. and Cross, T., 1971, Actinomycetes, *Meth. Microbiol.*, 4, 295-334.
- Williams, S.T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E.M.H., Sneath, P.H.A. and Sackin, M.J., 1983 a, Numerical classification of *Streptomyces* and related genera, *J. Gen. Microbiol.*, 129, 1743-1813.
- Williams, S.T., Goodfellow, M., Wellington, E.M.H., Vickers, J.C., Alderson, G., Sneath, P.H.A., Sackin, M.J. and Mortimer, A.M., 1983 b, A probability matrix for identification of some *Streptomyces*, *J. Gen. Microbiol.*, 129, 1815 –1830.
- Wishart, D. 1978, Clustan user manual. 4th Ed. Computing Laboratory of the University of St Andrews, St Andrews.
- Wood, J.M. and Wang, H.K., 1983, Microbial resistance to heavy metals, *Environ. Sci.Technol.*, 17, 582-590.
- Yalçinkaya, Y., Soysal, L., Denizli, A., Arica, M.Y., Bektaş, S., Genç, O., 2002, Biosorption of cadmium from aquatic systems by carboxymethylcellulose and immobilized *Trametes versicolor*, *Hydrometallurgy*, 63, 31– 40.
- Yan, G. and Viraraghavan, T., 2001, Heavy metal removal in a biosorption column by immobilized *M. Rouxii* biomass. *Bioresour. Technol.* 78, 243-249.
- Yetiş, Ü., Özcengiz, G., Dilek, F.B., Ergen, N., Erbay, A. and Dölek, A., 1998, Heavy metal biosorption by white-rot fungi, *Water Science and Technology*, 38, 4-5, 323–330.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Yücel, S., 2007, Mağaralardan İzole Edilen Aktinomiset İzolatlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Çalışmalar, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir.

Zafar, S., Aqil, F., Ahmad, I., 2007, Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil, *Bioresource Technology*, 98, 2557-2561.

Zhang, R.Q., Tang, C.F., Wen, S.Z., Liu, Y.G., Li, K.L., 2006, Advances in resarch on genetically engineered plants for metal resistance, *Journal of Integrative Plant Biology*, 48, 1257-1265.