

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***PSEUDOMONAS* CİNSİ BAKTERİLERDE HEKZA VALENT KROM
İNDİRGEME ÜZERİNE AĞIR METALLERİN ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Eda EVGEN**

Anabilim Dalı : Biyoloji

Programı : Moleküler Biyoloji

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN

OCAK 2012

YÜKSEK LİSANS TEZ ONAY FORMU

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü 091461017 nolu öğrencisi Eda EVGEN tarafından hazırlanan "Pseudomonas Cinsi Bakterilerde Hekzavalent Krom İndirgeme Üzerine Ağır Metallerin Etkisi " başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Doç Dr. Nazime MERCAN DOĞAN
(Jüri Başkanı)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Aysel UĞUR

Jüri Üyesi :Yard. Doç. Dr. Şevki ARSLAN

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 20/01/2012 tarih ve 02/15 sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Prof. Dr. Nuri KOLSUZ

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

İmza



Öğrenci Adı Soyadı : Eda EVGEN

ÖNSÖZ

2009-2012 yılları arasında Pamukkale Üniversitesi, Biyoloji Bölümü'nde, Doç. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN' ın danışmanlığı altında yürütülen bu çalışma yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Tez çalışmamın başından sonuna kadar ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, tecrübe ve eşsiz bilgilerinden yararlandığım hocam Doç. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN'a,

Laboratuar çalışmalarında desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Gülümser ACAR ve Göksel DOĞAN'a

Protein elektroforez çalışmalarında destek veren bölüm öğretim üyemiz sayın hocam Yard. Doç.Dr. Şevki ARSLAN'a,

Ayrıca eğitimim süresince yardımlarını eksik etmeyen beni bugünlere özveriyle getiren aileme sonsuz teşekkürler.

Ocak 2012

Ad Soyad : Eda EVGEN

İÇİNDEKİLER

ÖZET	xii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Krom	2
1.1.1. Krom kullanımı ve kirliliği	6
1.1.2. Çevre ve sağlık etkileri	6
1.1.3. Beslenme ve toksisite; insan sağlığında riskler	7
1.1.4. Hayvanlar.....	8
1.1.5. Bitkiler ve algler	8
1.1.6. Mikroorganizmalar	10
1.2. Remediasyon Stratejileri	11
1.3. Biyolojik Temizleme (Biyoremediasyon).....	13
1.4. Mikrobiyal Cr(VI) Biyoremediasyonu.....	14
1.5. Bakteriyal Cr(VI) İndirgemesi	17
1.6. Cr(VI) Dirençlilik Mekanizması.....	19
1.7. Cr(VI) İndirgeyen Bakteriler.....	22
1.8. Cr(VI) İndirgeme Yolları	23
1.8.1. Direk Enzimatik ve İndirek Cr(VI) indirgemesi.....	24
1.8.2. Kromat redüktazlar	26
1.8.2.1. Aerobik redüktazlar	27
1.8.2.2. Anaerobik redüktazlar	28
1.8.2.3. Krom varlığında kromat redüktazın indüklenmesi.....	28
1.9. Mikrobiyal Krom İndirgemesini Etkileyen Faktörler	28
1.9.1. Hücre yoğunluğu.....	28
1.9.2. Başlangıç Cr(VI) konsantrasyonu.....	29
1.9.3. Elektron akseptörlerinin etkisi	29
1.9.4. Sıcaklık ve pH etkileri	30
1.9.5. Karbon kaynakları ve elektron donörleri	30
1.9.6. Metal ve ağır metaller	32
1.9.6.1. Metal ve ağır metallerin sınıflandırılması	34

1.9.6.2.	Ağır metal ve metallerin biyolojik bulunurluluğu, alım biyolojisi ve toksisitesi.....	35
1.9.6.3.	Ağır metal ve metallerin hücre içine alınması.....	37
1.10.	Ağır Metallerin Krom İndirgemeye Etkisi.....	39
1.11.	Biyosorpsiyon	41
1.11.1.	Biyosorpsiyon teorisi ve mekanizmaları.....	41
1.12.	<i>Pseudomonas</i> Cinsinin Genel Özellikleri	44
1.12.1.	Habitatları	45
1.12.2.	Morfolojisi ve hücre yapısı.....	46
1.12.3.	Pigmentasyon.....	46
1.12.4.	Gelişme ortamları ve fizyolojik özellikleri.....	47
1.12.5.	Plazmid DNA.....	48
2.	MATERYAL VE METOT.....	49
2.1.	Materyal	49
2.1.1.	Materyal örnekleri.....	49
2.1.2.	Araştırmada kullanılan besiyerleri ve kimyasallar	50
2.2.	Metot	55
2.2.1.	Besi ortamı belirlenmesi	55
2.2.2.	Bakteri tiplendirmesi.....	55
2.2.3.	Bakterilerin heksavalent krom dirençliliğinin belirlenmesi	55
2.2.4.	Bakterilerin krom indirgemesi	55
2.2.5.	Analitik metot	55
2.2.6.	pH'nın etkisi	56
2.2.7.	Metal ve ağır metallerin etkisi	56
2.2.8.	Başlangıç krom konsantrasyonunun indirgemeye etkisi	56
2.2.9.	Biyosorpsiyon	56
2.2.10.	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE).....	57
2.2.10.1.	Kromat redüktaz enziminin indüklenmesi	57
2.2.10.2.	Poliakrilamid jel elektroforezinin yapılışı	57
2.2.10.3.	Protein elektroforezin yapılışı ve jellerin boyanması.....	57
2.2.10.4.	Proteinlerin moleküler ağırlıklarının hesaplanması	58
2.2.10.5.	Scanning elektron mikroskop ile görüntüleme.....	58
3.	BULGULAR.....	59
3.1.	Besi Ortamı Belirlenmesi.....	59
3.2.	Bakterilerin Tiplendirilmesi	59

3.3.	Kromun Hücre Gelişimine Toksik Etkisi.....	60
3.4.	Bakterilerin Hekzavalent Krom Dirençlilik Mekanizmalarının Belirlenmesi	61
3.5.	Krom İndirgeme Deneyleri	63
3.5.1.	Krom indirgemeye pH'ın etkisi	63
3.5.2.	Farklı ağır metal ve metal varlığında krom indirgeme deneyleri	64
3.6.	Biyosorbsiyon	79
3.7.	Elektroforez.....	81
3.8.	Scanning Elektron Mikroskop ile Görüntüleme	83
4.	TARTIŞMA	84
4.1.	Krom İndirgemeye pH'ın Etkisi.....	84
4.2.	Ağır metal ve Metallerin Krom İndirgemeye Etkisi	85
4.3.	Başlangıç Krom Konsantrasyonunun İndirgemeye ve Hücre Gelişimine Etkisi	91
4.4.	Krom Varlığında Kromat Redüktazın İndüklenmesi	92
4.5.	Scanning Elektron Mikroskop (SEM) Analizi	92
5.	SONUÇ.....	94
	KAYNAKLAR	95
	ÖZGEÇMİŞ.....	117

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
dk	Dakika
g	Gram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mmol	Milimol
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	mikrometre
N	Normalite
M	Molarite
NA	Nutrient agar
NB	Nutrient broth
LB	Luria bertani
TSB	Tryptic soy broth
TSA	Tryptic soy agar
DPC	Difenil-karbazid
rpm	Devir sayısı
MİK	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
ve ark.	Ve arkadaşları
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

TABLO LİSTESİ

Tablolar

1: Krom elementinin fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	5
2: Atık sulardan Cr(VI) uzaklaştırma teknolojileri.....	13
3: Bilinen Cr(VI) indirgeyen bakteriler.....	22
4: Bakteri kodları ve izole edildiği kaynaklar.....	49
5: Bakterilerin hegzavalent krom dirençlilikleri.....	62
6: <i>Pseudomonas mendocina</i> PASS3-P18 bakterisinin 30ppm krom konsantrasyonunda, ağırmetal ve metal varlığında Cr(VI) indirgeme sonuçları(A).....	65
7: <i>Pseudomonas mendocina</i> PASS3-P18 30 ppm krom konsantrasyonunda, ağırmetal ve metal varlığında Cr(VI) indirgeme sonuçları(B).....	66
8: <i>Pseudomonas mendocina</i> PASS3-P18 bakterisinin 50ppm krom konsantrasyonunda, ağırmetal ve metal varlığında Cr(VI) indirgeme sonuçları(A).....	67
9: <i>Pseudomonas mendocina</i> PASS3-P18 bakterisinin 50ppm krom konsantrasyonunda, ağırmetal ve metal varlığında Cr(VI) indirgeme sonuçları(B).....	68
10: <i>Pseudomonas mendocina</i> DS0601-FX-P22 bakterisinin 25ppm krom konsantrasyonunda, ağırmetal ve metal varlığında Cr(VI) indirgeme sonuçları (A).....	69
11: <i>Pseudomonas mendocina</i> DS0601-FX-P22 bakterisinin 25ppm krom konsantrasyonunda, ağırmetal ve metal varlığında Cr(VI) indirgeme sonuçları (B).....	70
12: <i>Pseudomonas mendocina</i> DS0601-FX-P22 bakterisinin 15ppm krom konsantrasyonunda, ağırmetal ve metal varlığında Cr(VI) indirgeme sonuçları(A).....	72
13: <i>Pseudomonas mendocina</i> DS0601-FX-P22 bakterisinin 15ppm krom konsantrasyonunda, ağırmetal ve metal varlığında Cr(VI) indirgeme sonuçları(B).....	73
14: <i>Pseudomonas mendocina</i> PASS3-P18 bakterisinin 50 ppm Cr(VI) konsantrasyonunda farklı ağırmetal ve metal varlığında hücre yoğunlukları.....	74
15: <i>Pseudomonas mendocina</i> PASS3-18bakterisinin 30 ppm Cr(VI) konsantrasyonunda farklı ağırmetal ve metal varlığında hücre yoğunlukları.....	76
16: <i>Pseudomonas mendocina</i> DS0601-FX-P22 bakterisinin 15 ppm Cr(VI) konsantrasyonunda farklı ağırmetal ve metal varlığında hücre yoğunlukları.....	77

17: *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisinin 25 ppm Cr(VI) konsantrasyonunda farklı ağırmetal ve metal varlığında hücre yoğunlukları.....78

ŞEKİL LİSTESİ

şekiller

1: Periyodik tablo.....	2
2: Aerobik ve anaerobik şartlar altında enzimatik Cr(VI) indirgeme mekanizması.....	18
3: Bakterilerde Cr(VI) dirençlilik mekanizması.....	20
4: Cr(VI) indirgeme yolları.....	26
5: Ağır metal ve metal iyonlarıyla mikroorganizmanın etkileşimi.....	39
6: İzolatların 16S sRNA analizine göre filogenetik ağacı.....	59
7: <i>Pseudomonas mendocina</i> DS0601-FX-P22 bakterisinde kromun hücre gelişimine etkisi.....	60
8: <i>Pseudomonas mendocina</i> PASS3-P18 bakterisinde kromun hücre gelişimine etkisi.....	61
9: <i>Pseudomonas mendocina</i> PASS3-P18 bakterisinin pH değişimine bağlı Cr(VI) indirgemesi.....	63
10: <i>Pseudomonas mendocina</i> DS0601-FX-P22 bakterisinin pH değişimine bağlı Cr(VI) indirgemesi.....	64
11: <i>Pseudomonas mendocina</i> PASS3-P18 bakterisinin 30 ppm krom konsantrasyonunda ağır metal ve metal varlığında Cr(VI) indirgemesi (A).....	65
12: <i>Pseudomonas mendocina</i> PASS3-P18 bakterisinin 30 ppm krom konsantrasyonunda ağır metal ve metal varlığında Cr(VI) indirgemesi (B).....	66
13: <i>Pseudomonas mendocina</i> PASS3-P18 bakterisinin 50 ppm krom konsantrasyonunda ağır metal ve metal varlığında Cr(VI) indirgemesi (A).....	67
14: <i>Pseudomonas mendocina</i> PASS3-P18 bakterisinin 50 ppm krom konsantrasyonunda ağır metal ve metal varlığında Cr(VI) indirgemesi (B).....	68
15: <i>Pseudomonas mendocina</i> DS0601-FX-P22 bakterisinin 25 ppm krom konsantrasyonunda ağır metal ve metal varlığında Cr(VI) indirgemesi (A).....	70
16: <i>Pseudomonas mendocina</i> DS0601-FX-P22 bakterisinin 25 ppm krom konsantrasyonunda ağır metal ve metal varlığında Cr(VI) indirgemesi (B).....	71
17: <i>Pseudomonas mendocina</i> DS0601-FX-P22 bakterisinin 15 ppm krom konsantrasyonunda ağır metal ve metal varlığında Cr(VI) indirgemesi (A).....	72
18: <i>Pseudomonas mendocina</i> DS0601-FX-P22 bakterisinin 15 ppm krom konsantrasyonunda ağır metal ve metal varlığında Cr(VI) indirgemesi (B).....	73
19: <i>Pseudomonas mendocina</i> PASS3-P18 bakterisinin 30 ve 50 ppm Cr(VI) konsantrasyonundaki biyosorbsiyon.....	79

20: <i>Pseudomonas mendocina</i> DS0601-FX-P22 bakterisinin 15 ve 25 ppm Cr(VI) konsantrasyonundaki biyosorbsiyon.....	80
21: <i>Pseudomonas mendocina</i> DS0601-FX-P22 suşunun periplazmik proteinlerinin SDS-PAGE profilleri.....	81
22: <i>Pseudomonas mendocina</i> PASS3-P18 suşunun periplazmik proteinlerinin SDS-PAGE profilleri.....	82
23: <i>Pseudomonas mendocina</i> PASS3-P18 bakterisinin 110 ppm kromlu ortamdaki görüntüsü.....	83
24: <i>Pseudomonas mendocina</i> PASS3-P18 bakterisinin kromsuz ortamdaki görüntüsü.....	83

ÖZET

PSEUDOMONAS CİNSİ BAKTERİLERDE HEKZAVALENT KROM İNDİRGEME ÜZERİNE AĞIR METALLERİN ETKİSİ

Bu çalışmada kullanılan izolatların 16S rRNA sekans analizi sonuçlarının değerlendirilmesi sonucunda toplam 13 izolat içinde 6 farklı tür olduğu tespit edilmiştir. Bu izolatların 3'ü *Enterobacter cancerogenus* , 3'ü *Pseudomonas mendocina*, 1'i *Exiguobacterium aurantiacum* , 2'si *Pseudomonas stutzeri*, 2'si *Enterobacter cloacae* ve 1 tanesinin de *Streptomyces thermocarboxydus* olduğu görülmüştür.

Bakterilerin krom dirençliliği, Minimum İnhibisyon Konsantrasyonuna (MİK) göre belirlenmiştir. Krom indirgeme deneylerinde çalışılmak üzere krom ve ağır metallerin hücre üzerine olan toksik etkisi nedeniyle 110 ppm ve 25 ppm MİK değerine sahip olan *P. mendocina* PASS3-P18 ve *P. mendocina* DS0601-FX-P22 suşları seçilmiştir. Seçilen *P. mendocina* PASS3-P18 ve *P. mendocina* DS0601-FX-P22 suşların krom indirgeme deneyleri için gerekli optimum şartlar belirlenmiştir. Her iki bakterinin optimal gelişme sıcaklıkları 37 °C olup tüm krom indirgeme deneyleri Triptik Soy Broth (TSB)'ta yapılmıştır. Bakterilerin en iyi indirgeme yaptıkları pH dereceleri ise *P. mendocina* PASS3-P18 bakterisi için pH=7 ve *P. mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisi için pH=6'dır.

Farklı metal ve ağır metallerin indirgemeye olan etkisini belirlemek için Mn^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Ba^{+2} , Al^{+2} , Ni^{+2} , Co^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} , Pb^{+2} 'nin saf suda çözünebilen konsantrasyonları (Cu^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} 52ppm, Ba^{+2} , Al^{+2} , Ni^{+2} , Pb^{+2} için 100 ppm, Co^{+2} ve Cd^{+2} için 20 ppm) dikkate alınmıştır. Son hacim 100 ml olacak şekilde ilgili besi ortamlarına Cr(VI) ile birlikte ilave edilmişlerdir. Krom indirgeme deneyleri difenil karbazid metoduna göre yapılmıştır.

Çalışmamız sonunda elde edilen verilere göre kullanılan ağır metallere Cu^{+2} ve Fe^{+2} nin her iki bakteri için krom indirgemeyi teşvik ettiği ortaya çıkmıştır. Ayrıca *P. mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisi ile yapılan 25 ve 15 ppm krom

konsantrasyonundaki deneylerde diğeri *P. mendocina* PASS3-P18 bakterisinden farklı olarak Co^{+2} ve Mn^{+2} ağır metallerinin krom indirgemelerini teşvik ettiği bulunmuştur. Al^{+2} 'un, *P. mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisinde 25 ppm krom konsantrasyonunda krom indirgeme üzerinde teşvik edici etkisi bulunurken, 15 ppm krom konsantrasyonunda ise kontrol ile aynı sürede krom indirgemeyi tamamladığı görülmüştür. Çalışmada kullanılan diğeri ağır metallerin (Ba^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} , Pb^{+2}) her iki bakteri için krom indirgeme üzerine olumsuz etkisi olduğu ortaya çıkmıştır. Bu durumu bu ağır metallerin bakteriler için esansiyel olmaması ve yapmış olduğu toksik etkinin bir sonucu olarak açıklayabiliriz.

Pseudomonas mendocina PASS3-P18 için yapılan biyosorbsiyon deneylerinde bakterinin hücre yüzeyinde kromu tutmadığı görülmüştür. Bu sonuç, çalışmamızda kullanılan bakterinin kromu indirgediğine dair bir kanıt niteliğindedir.

Çalışmamızda yapılan scanning elektron mikroskobu görüntülemesinde kromlu ve kromsuz ortamdaki hücreler karşılaştırıldığında kromlu ortamdaki hücrelerin dejenere olmuş yapıları ortaya çıkmaktadır.

SDS-PAGE analizi sonucunda ise *P. mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisinde 31 kDa civarında bir protein bandı, *P. mendocina* PASS3-P18 de iki ayrı protein bandının indüklendiği gözlenmiştir. Bu protein bantlarından biri yaklaşık olarak 29 kDa büyüklüğünde iken diğeri bandın moleküler büyüklüğü yaklaşık olarak 52 kDa'dur.

Anahtar kelimeler: *Pseudomonas*, krom indirgeme, ağır metal, biyoremediasyon

ABSTRACT

THE EFFECT OF HEAVY METALS ON HEXAVALENT CHROMIUM REDUCTION BY *PSEUDOMONAS*

As a result of the 16S rRNA sequence analysis of isolates used in the study, it was found out that there are 6 different types, out of totally 13 isolates. 3 of these were *Enterobacter cancerogenus*, another three are *Pseudomonas mendocina*, one was *Exiguobacterium aurantiacum*, two were *Pseudomonas stutzeri*, another two were *Enterobacter cloacae*, and one was *Streptomyces thermocarboxydus*.

The chrome resistance of bacteria was determined by Minimum Inhibition Concentration (MIC). For the purpose of including in the chrome reduction experiments, owing to the toxic effect of chrome and heavy metals on cells, *P. Mendocina* PASS3-P18 and *P. Mendocina* DS0601-FX-P22 having 110 ppm ve 25 ppm MIC value were selected. For the selected strains *P. Mendocina* PASS3-P18 and *P. Mendocina* DS0601-FX-P22, the optimum conditions necessary for chrome reduction experiments were determined. For both of the bacteria, the optimal evolution temperature was determined as 37 °C and the chrome reduction experiments were conducted in Tryptic Soy Broth (TSB). The best pH degree in which the bacteria indicated high reduction degree for *P. Mendocina* PASS3-P18 bacteria was 7 while it was 6 for *P. Mendocina* DS0601-FX-P22.

In order to determine the effects of metals and heavy metals on the reduction, Mn^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Ba^{+2} , Al^{+2} , Ni^{+2} , Co^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} , Pb^{+2} s concentrations that can be dissolved in distilled water, 52 ppm for Cu^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , 100 ppm for Ba^{+2} , Al^{+2} , Ni^{+2} , Pb^{+2} and 20 ppm for Co^{+2} and Cd^{+2} were taken into consideration. Determining the final concentration as 100 ml, Cr(VI) was added to the related medium. Chrome reduction experiments were conducted regarding diphenylcarbazide method.

According to the findings that were obtained at the end of the study, it was found that of the heavy materials used in the study, Cu^{+2} and Fe^{+2} has stimulated the chrome reduction. In addition, in the experiments with 25 and 15 ppm chrome

concentrations which were conducted with the bacteria *P. Mendocina* DS0601-FX-P22, it is found that the heavy metals Co^{+2} and Mn^{+2} had stimulated chrome reduction, different from the other bacteria *P. Mendocina* PASS3-P18. It has been found that there was a stimulation effect of the bacteria Al^{+2} *P. Mendocina* DS0601-FX-P22 on the chrome reduction in the 25 ppm chrome concentration whereas in a medium of 15 ppm chrome concentration it was found that same chrome reduction interval as the control. On the other hand the other heavy metals in the study (Ba^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} , Pb^{+2}) had negative effect on the chrome reduction of both bacteria. This is possible due to explain this situation as a result of the toxic effect of heavy materials or these heavy metals are not essentials for those bacteria.

In the biosorption experiments conducted for *P. Mendocina* PASS3-P18 bacteria, it was seen that the bacteria did not keep chrome on the surface of cell. This result of the present study is evidence that the bacteria used in the study absolutely reduced chrome.

Upon analyzing the scans of electron microscope, when we compare the mediums with and without chrome, we observed that the cells in the medium of chrome have degenerated forms

As a result of SDS-PAGE analysis, it was observed that one intensity of one protein band corresponding to approximately 31 kDa in *P. Mendocina* DS0601-FX-P22 and two different protein bands in *P. Mendocina* PASS3-P18 were induced. One of these band was approximately 29 kDa, On the other hand other one was approximately 52 kDa.

Keywords: *Pseudomonas*, Chromium reduction, heavy metal, bioremediation

1. GİRİŞ

Teknolojinin hızlı gelişmesi, hızlı sanayileşme ve nüfus artışı çevre kirliliğine neden olmaktadır. Endüstriyel atık suların birçoğu çeşitli su standartlarına göre istenmeyen oranlarda ağır metal iyonları içermektedir. Arsenik, civa, kurşun, krom, kadmiyum, nikel, demir, bakır, çinko gibi ağır metaller kirliliğe neden olmaktadır. Ağır metaller canlılar için toksik olup, vücuda girdikleri zaman ciddi hastalıklara ve ölümlere neden olurlar.

Kimyasal çökeltimle metalleri istenilen seviyelere indirebilmek için aşırı kimyasal kullanımı gereklidir ki fakat bu hacimce çok miktarda toksik çamur oluşumuna neden olmaktadır. Ayrıca bu çamurların arıtılması için de ek proseslere ihtiyaç vardır. Buna ek olarak, kimyasal yöntemler hem pahalıdır, hem de metalin geri kazanılmasından daha ziyade atık sulardaki aşırı metal kirliliğini kontrol etmeyi ve istenilen konsantrasyonlara düşürmeyi amaçlamaktadır. Halbuki sudaki birçok mikroorganizma çözülmüş ağır metalleri bünyelerine alabilme mekanizmalarına sahiptirler. Mikroorganizmaların bu özelliklerinden yararlanılarak endüstriyel atık sulardaki ağır metallerin giderimi ve geri kazanımı mümkün olabilmektedir.

Krom, metal ve kromatlar şeklinde bulunan ve çok geniş ölçüde korozyon önleyici uygulamalarda kullanılan bir elementtir. Cr(VI)'nın ana kaynakları; deri, boya, mürekkep, kumaş boyası, alüminyum vb. endüstrilerdir. Son yıllarda, kromun giderimi için daha ucuz alternatif yöntemler araştırılmaktadır. Ağır metal iyonlarının adsorpsiyonu için alg, bakteri, mantar ve mayaların biyosorbent olarak kullanılabilecekleri kanıtlanmıştır (Nakiboğlu ve Sevindir, 2006; Srinath ve ark. 2002; Kıvanç ve ark. 1996). Krom indirgeme üzerine organik asit, karbon kaynakları, ağır metaller, pH, sıcaklık, krom konsantrasyonu gibi çeşitli koşulların etkileri önemli araştırma konularından olup, bu faktörlerin bakteriyel krom indirgeme mekanizması üzerine nasıl bir etki yaptığı hala detaylı olarak anlaşılabilmiş değildir.

Bu çalışmada *Pseudomonas* cinsine ait *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 ve *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX-P22 bakterilerinde Cd^{+2} , Pb^{+2} gibi ağır metaller ve Mn^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Ba^{+2} , Al^{+2} , Ni^{+2} , Co^{+2} , Zn^{+2} gibi metallerin Cr (VI)

indirgemeye etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Toprak ve su gibi doğal ortamlarda çok sayıda metal ve ağır metal kirliliği mevcuttur. Bu tür ağır metallerin hem kendi aralındaki etkileşimleri hem de bu ortamlarda bulunan krom indirgeyici mikroorganizmalar üzerindeki etkileri tam olarak bilinmemektedir. Bu tez çalışması ile bazı ağır metallerin krom indirgeme üzerindeki etkileri ile ilgili bilgi elde edilmiş olacaktır. Elde edilecek bilgiler konu ile ilgili daha detaylı çalışmalara zemin oluşturabilecektir. Biyoremediasyon çalışmalarında krom indirgemeye etki eden faktörlere bir yenisi daha ilave edilmiş olacaktır.

1.1. Krom

Atom numarası 24, atomik ağırlığı 51,996 gr/mol olan krom, ilk kez Fransız kimyacı Vauquelin tarafından 1797’de keşfedilmiştir. Vauquelin Sibirya’daki kırmızı kurşun madenlerinden keşfettiği bu elementi bileşimindeki farklı renklerden dolayı Yunancada renk anlamına gelen ‘chroma’ kelimesi ile isimlendirdi (Mohan ve Pittman Jr, 2006). Cr, $Ar3d54s^1$ elektronik konfigürasyon durumuyla periyodik tablonun VI-B grubunda yer alır. Ayrıca krom elementinin fiziksel özellikleri tablo 1’de verilmektedir.

Elektron dizilimi sadece 1,2 ve 3. periyotlar için vardır.

İyon yükü

Atom No 24

Krom

Kütle No 52.0

24P

28N

1	H	2	He																																
3	Li	4	Be	5	B	6	C	7	N	8	O	9	F	10	Ne																				
11	Na	12	Mg	13	Al	14	Si	15	P	16	S	17	Cl	18	Ar																				
19	K	20	Ca	21	Sc	22	Ti	23	V	24	Cr	25	Mn	26	Fe	27	Co	28	Ni	29	Cu	30	Zn	31	Ga	32	Ge	33	As	34	Se	35	Br	36	Kr
37	Rb	38	Sr	39	Y	40	Zr	41	Nb	42	Mo	43	Tc	44	Ru	45	Rh	46	Pd	47	Ag	48	Cd	49	In	50	Sn	51	Sb	52	Te	53	I	54	Xe
55	Cs	56	Ba	57	La	72	Hf	73	Ta	74	W	75	Re	76	Os	77	Ir	78	Pt	79	Au	80	Hg	81	Tl	82	Pb	83	Bi	84	Po	85	At	86	Rn
87	Fr	88	Ra	89	Ac	104	Rf	105	Db	106	Sg	107	Bh	108	Hs	109	Mt	110	Uun	111	Uuu	112	Uub												
Lantanit Serisi				58	Ce	59	Pr	60	Nd	61	Pm	62	Sm	63	Eu	64	Gd	65	Tb	66	Dy	67	Ho	68	Er	69	Tm	70	Yb	71	Lu				
Aktinid Serisi				90	Th	91	Pa	92	U	93	Np	94	Pu	95	Am	96	Cm	97	Bk	98	Cf	99	Es	100	Fm	101	Md	102	No	103	Lr				

Şekil 1: Periyodik tablo

Havaya maruz kaldığında hızla oksitlenmesine rağmen, kromun elementel formu (Cr(0))' dır. Bu nedenle oluşan ince oksit tabakası oksijene geçirgenlidir ve bu yüzden metalin geri kalanını daha fazla oksidasyona karşı korur. Bu özellik günümüzde elektrokaplama ile diğer metallerin korunmasında kullanılır (Molakwane, 2010).

Geleneksel olarak sadece laboratuvar koşulları altında gözlenen Cr'un stabil olmayan ve biyolojik sistemlerdeki kısa ömre sahip diğer değerlikteki durumlarına rağmen, Cr'un stabil formları Cr(III) ve Cr(VI)'dır. Cr(VI), kromun en toksik formu olup genellikle kromat (CrO_4^{2-}) şeklinde oksijenle ya da dikromat ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) şeklinde oksiyonlarla kompleks yapmış formda bulunmaktadır (Molakwane, 2010;Shanker ve ark., 2005). Cr(III) ise oksit, hidroksit ve sülfat formlarında bulunup çok daha az hareketli, su ve topraktaki organik materyale güçlü bir şekilde bağlı olarak bulunur. Cr(VI) güçlü bir okside edici ajan olup organik madde varlığında Cr(III)'e indirgenmektedir. Bu dönüşüm asidik topraklar gibi asidik ortamlarda daha hızlı olmaktadır (McGrath ve Smith, 1990). Bununla birlikte Cr(VI)'nın yüksek düzeyleri, ortamın indirgeme kapasitesinin üstünde olup bir kirletici olarak davranmaya başlar. Ayrıca Cr(III) de aşırı oksijen varlığında Cr(VI)'ya oksitlenebilir ve çok toksik bir forma tekrardan dönüşmüş olur (Vajpayee ve ark., 1999).

Krom doğada granitik kayalar, serpentin kayalar ve kömürde ağırlıklı olarak Cr(III) formunda çoğunlukla kromit ($\text{FeO}(\text{Cr}_2\text{O}_3)$) ve krokoit (PbCrO_4) olarak oluşur (Merian, 1984; Hintze, 1930). Hekzavalent kromun çok küçük miktarları tersiyer ve quarterner alüvyon dolu havzalarla ilişkili zengin yer altı suyu silikatında oluşur.Eski alüvyal sedimentlerdeki silikatların sürekli hidrolizi Cr(III)'ün Cr(VI)'ya oksidasyonuna sebep olan su pH'sını arttırır (Robertson, 1975). Ayrıca Cr(VI) atmosferde orman yangınları, kömürün yanması, volkanik patlamalar , otomobil egzozu ve krom içeren materyallerle ilişkilidir (Xing ve Okrent, 1993; Merian, 1984).

Krom dünyada en çok bulunan yedinci element olup, yer kabuğunda ise 21. sıradadır (McGrath ve Smith, 1990). Yeryüzündeki Cr miktarı, 100-300 $\mu\text{g/g}$ aralığında değişmektedir. Cr hava, toprak ve su ekosistemlerinde doğal olarak bulunmaktadır. Topraktaki doğal bulunurluğu 10-50 mg/kg arasındadır. Tatlı sulardaki konsantrasyonu genellikle 0.1-117 $\mu\text{g/L}$ arasındayken denizlerdeki konsantrasyonu 0.2-50 $\mu\text{g/L}$ arasındadır. Atmosferdeki Cr konsantrasyonu ise oldukça farklılık

göstermekte olup 5×10^{-6} - 1.2×10^{-3} $\mu\text{g}/\text{m}^3$ arasındayken kirli alanlarda 0.015-0.03 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ arasındadır (Nriagu, 1988). Krom, tabak yapımı, boyama, alaşım, kimyasal maddelerin yapımı (Palmer ve Wittbrodt, 1991), maden sanayii, pigment, tekstil ve elektro kaplamacılıktaki (Vajpayee ve ark.,1999) yaygın kullanımına bağlı olarak çeşitli endüstriyel alanlardan doğal su ekosistemlerine girmektedir. Dünyadaki kullanımı her yıl yaklaşık 107 ton civarındadır; bunun yaklaşık %60-70'i çelik ve %15'i de tabak yapımı, pigment ve elektrokaplamacılık gibi kimyasal endüstri prosesinde kullanılmaktadır (McGrath ve Smith, 1990; Stern, 1982; Papp, 1985). Bu kullanımların neticesinde krom, su, toprak ve hava ekosistemlerinde ciddi bir kirletici potansiyeli haline gelmiş ve Cr'un çevredeki biyolojik bulunurluğunu ve biyohareketliliğini arttırmıştır. Kirlenmemiş tatlı sularda krom konsantrasyonu 0,1–0,5 ppm arasında, okyanuslarda 0,0016–0,05 ppm arasında (De Filippis ve Pallaghy, 1994), kağıt endüstrisi çıkış sularında ise 80 ppm civarındadır (Carlos ve ark., 2001) . Çevredeki kromun kritik değerlendirmeleri üzerine detaylı derlemeler Kimbrough ve ark. (1999), Kotas ve Stasicka (2000) tarafından da yapılmıştır. Atık sulardaki izin verilen Cr miktarı 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ iken bu değer genellikle 2000-5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'yi bulmaktadır (Vajpayee ve ark.,1999). Kaplamacılık endüstrisi atık sularındaki Cr(VI) ve Cr (III) derişimleri sırasıyla 25-100 ve 5-50 $\mu\text{g}/\text{L}$ arasındayken tabak yapımı endüstrisindeki Cr(III) konsantrasyonu 1500 $\mu\text{g}/\text{L}$ olarak tespit edilmiştir (Dirilgen ve Doğan, 2002). Atık sulardaki Cr türlerinin konsantrasyonları Cr'un kullanıldığı endüstriyel proseslerdeki çeşitliliğe bağlı olarak değişmektedir (Nriagu, 1988). Bu nedenle Cr(VI) maden sanayiinde Cr(III) ise tabak yapımı, tekstil ve dekoratif kaplama endüstrisi atık sularında daha yüksek düzeylerde bulunmaktadır (Dirilgen ve Doğan, 2002). Metal kaplama sanayiinde arıtılmamış atıksular yaklaşık 100 mg/L Cr(VI) içerirler ki bu da izin verilen limit olan 0,05-1 mg/L 'den oldukça fazladır (Thyagarajan, 1992; Arora ve Pandey, 1984).

Krom Güney Afrika, Filipinler, Güney Zimbabve ve Türkiye'de en büyük yatakları olan kromit madeninden $[(\text{Fe},\text{Mg})\text{O}(\text{Cr}, \text{Al}, \text{Fe})_2\text{O}_3]$ ekstrakte edilir (Matthews ve Morning, 1980). Şimdiye kadar aşağıdaki verimli tipleri içeren yaklaşık beş maden tanımlanmıştır:

Barbertonit: $\text{Mg}^6\text{Cr}^2(\text{CO}^3) \text{OH}^{16} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Brezinat: Cr^3S^4

Kromit: $(Mg, Fe^{+2})(Cr, Al, Fe^{+3})_2O_4$

Kromatit: $CaCrO_4$

Nikromit: $(Ni, Co, Fe^{+2})(Cr, Fe^{+3}, Al)_2O_4$

Çıkarılmış madenlerden ferrik kromit ($FeCr_2O_4$) esas olarak Güney Afrika'da bulunmuştur. Güney Afrika'daki kromit madeni rezervi yeryüzünün tanımlanan kaynaklarının yaklaşık %72'sini temsil eder. Krom madeni kaynaklarını işleten diğer ülkeler ise Rusya, Finlandiya, Hindistan, Kazakistan ve Brezilya'dır (Molakwane, 2010).

Tablo 1: Krom elementinin fiziksel ve kimyasal özellikleri

Ortalama atomik kütle	51.9961
Kaynama noktası	294 K 2672 °C 4828 °F
Boyca genişleme katsayısı	62×10^{-7} cm/cm/ °C(0 °C)
Yoğunluğu	7.19 g/cc
Elektrik iletkenliği	0.0744×10^6 /cm
Isı iletkenliği	0.937 W/cmK
Erime noktası	2130 K 1857 °C 3375 °F
Molar hacmi	7.78 cm^3 /mol
Isınma ısısı	0.45 J/gK
Nötron/proton/elektron sayısı	28/24/24
Atomik yarı çapı	1.85 Å
Atomik hacim	7.23 cm^3 /mol
İyonik yarı çapı	0.52 Å
Kovalent yarı çapı	1.18 Å
Elektron konfigürasyonu	$1s^2 2s^2 p^6 3s^2 p^6 d^5 4s^1$
Her enerji seviyesindeki elektron sayısı	2, 8, 13, 1
Niteliği	Sert kırılğan gri renkli geçiş metali
Yanabilirlik sınıfı	Yanıcı olmayan katı
Fiziki hali	Katı (20°C 1 atm)
Kristal yapısı	Kübik merkezli

1.1.1. Krom kullanımı ve kirliliği

Krom'un başlıca kullanıcıları metalürjik, kimyasal ve refrakter tuğla endüstrileridir (Langard, 1980). Kromu kullanan diğer endüstriler pigment üretimi, metal kaplama, korozyonu engelleme, organik sentez, deri tabaklama ve ahşap koruma endüstrileridir (Yassi ve Nieboer, 1988; Hartford, 1979; Darrin, 1956).

Kromun yaygın endüstriyel kullanımı çevreye deşarj edilen krom içeren atıkların yüksek hacimlere çıkmasına yol açar. Bu atıkların yanı sıra, konteynırların hatalı ambalajlanması ve depolanmasından dolayı sızıntı da kromun çevrede birikimini artırır (Sharma, 2002).

Kromun neredeyse tamamı insan aktivitelerinden kaynaklanarak doğal sistemlere girer. Sadece % 0.001'i doğal jeolojik proseslere bağlıdır (Merian, 1984). Çevreye akan antropojenik kaynaklı krom esas olarak Cr(VI)'dır. Cr(III)'ün aksine Cr(VI) aquatik sistemlerde yüksek çözünürlük ve mobilite ile şiddetli bir kontaminanttır. Cr(VI) kronik ve subkronik etkilerine bağlı olarak U.S.EPA (ABD Çevre Koruma ajansı) tarafından A grubu insan karsinojeni olarak sınıflandırıldığı bilinen bir karsinojendir (Federal Register, 2004).

1.1.2. Çevre ve sağlık etkileri

Önceki çalışmalarda, oksidasyon durumuna bağlı olarak kromun biyolojik etkileri araştırılmıştır; Cr(VI) çoğu organizmalar için oldukça toksik iken Cr(III) daha az toksiktir (Katz ve Salem, 1993; Wong ve Trevors, 1988). Cr(VI) bileşikleri Cr(III) bileşiklerine oranla oldukça yüksek çözünürlüğe sahip olup biyolojik bulunurlukları daha yüksektir (Dirilgen ve Doğan, 2002). Kotas ve Stasicka (2000), Cr'nın biyolojik bulunurluğu ve hareketi kadar toksisitesinin de esas olarak kimyasal formuna bağlı olduğunu öne sürmüşlerdir. Cr(VI), Cr(III)'e oranla gerek güçlü oksidatif potansiyeli ve gerekse de hücre membranında kolayca difüze olması nedeniyle biyolojik sistemler üzerine toksik etkiler göstermektedir (Dirilgen ve Doğan, 2002).

Krom toksisitesi Cr(VI)'nın daha düşük oksidasyon durumlarına indirgenme prosesiyle ilişkilidir. Cr(VI)'nın Cr(III)'e redüksiyonu birçok biyolojik sistemlerde rapor edilmiştir; örneğin Cr(V) geçiş formu, Cr toksisitesindeki olası önemli mekanizmalara katılmaktadır (Kawanishi ve ark., 1986). Cr(V) kompleksleri, NAD(P)H, FADH₂, bazı pentozlar ve glutatyon gibi fizyolojik indirgeyici ajanlar tarafından Cr(VI)'nın redüksiyonuyla oluşmaktadır (Shi ve Dalal, 1990). Bu

kompleksler, OH radikallerinin önemli miktarlarını oluşturmak için H₂O₂ ile reaksiyona girmektedirler. OH radikalleri de diğer toksik etkilerinin yanı sıra direkt olarak DNA değişikliklerine neden olmaktadır (Shi ve Dalal, 1990). Diğer hücre içi krom-indirgeyici ajanlar, vitamin C ve B12, sitokrom P-450 ve mitokondriyal solunum zinciridir (Alcedo ve Wetterhahn, 1990).

İntraselüler Cr(III), DNA'nın fosfat grupları tarafından tutulmakta ve bu da replikasyonu, transkripsiyonu etkilemekte ve mutasyona neden olmaktadır (Bridgewater ve ark., 1994; Costa, 1991; Nishio ve Uyeki, 1985). DNA üzerindeki oksidatif hasar krom tarafından üretilen genotoksik etkinin sonucunda olduğu düşünülmektedir (Luo ve ark., 1996; Itoh ve ark., 1995). Cr(III), enzimlerin karboksil ve sülfidril gruplarına bağlanarak enzimlerin yapısını ve aktivitesini değiştirmektedir (Levis ve Bianchi, 1982). DNA polimerazın modifikasyonu ve diğer enzimlerin aktivitesi Cr(III)'ün magnezyum iyonu ile yer değiştirmesi sonucunda etkilenmektedir (Carlos ve ark., 2001; Travieso ve ark., 1999; Snow, 1994).

1.1.3. Beslenme ve toksisite; insan sağlığında riskler

Krom (VI) mutajenik ve kanserojenik özelliklerinden dolayı A grubu insan kanserojen maddesidir. Cr(VI)'ya maruz kalındığında, sindirim sistemi ve akciğerlerde kansere (Kaufman, 1970), mide bulantısına, ishale, kanamalara neden olabilir (Gupta ve ark., 2001; Browning, 1969). İnsanlar Cr(VI) bileşiklerini inhalasyon, dermal temas ve yutma yoluyla absorblayabilirler. Cr(VI)'nın insan sağlığına etkileri akciğer kanseri, solunum yolları irritasyonu, dermatit, böbrek ve karaciğer hasarı ve mutasyon ve karsinojenlere yol açan çeşitli nükleik asit ve protein hasarlarını kapsar (Bianchi ve Levis, 1984). Bununla birlikte alerjik dermatit, deri ülserasyonu, mukoz membranları irritasyonu, nazal septum, böbrek tübül nekrozu ve solunum yolu enfeksiyonlarının artması gibi bir takım sağlık risklerine yol açar (Flesel, 1979).

Krom özellikle Cr(III) ve Cr(VI) gibi farklı türleri olduğu için çevrede düzenli toksik elementler arasında eşsizdir ve farklı şekillerde düzenlenmiştir. Kimyasal, toksikolojik ve epidemiyolojik kanıtlara dayanarak, Cr(VI) konsantrasyonunun düzenlenmesi Cr(III)'den farklıdır. Hekzavalent krom toksik ve mutajenik iken, trivalent krom besinsel olarak kullanılan formdur. Kromun hem güçlü bir epitel tahriş edici hem de insan karsinojeni olduğu onaylanmıştır (Langand, 1983; Petrilli

ve Flora, 1977). Aksine, Cr(III) hayvan fizyolojisinde esansiyel bir elementtir ve glukoz ve yağ metabolizmasında rol oynar (Mertz, 1993; Anderson, 1989). Kromun biyotoksitesitesi büyük ölçüde biyolojik membranları geçme yeteneğinin ve oksitleme gücü kapasitesinin bir fonksiyonudur (NAS, 1974).

1.1.4. Hayvanlar

Cr(VI) bazı topraklarda bir hayli hareketlidir ve Cr(VI) ile kontaminasyon belki de insanlar dahil sucul ve karasal organizmalar için kaçınılmazdır. Krom eser miktarlarda insan ve hayvan beslenmesinde gerekli bir bileşendir (Jeejeebhoy ve ark., 1977; Mertz, 1969). Bu glukoz metabolizması ile ilişkilidir (Mertz, 1969) ve normal glukoz toleransını sürdürmek için gerekli bir faktör olan glukoz tolerans faktörü bütünleyici bileşeni (GTF) insülin regülasyonu için gereklidir. Krom hücreye insülin bağlanmasını artırarak insülin hareketini potansiyelize ederek ve düzenleyerek işlev görür (Anderson ve ark., 1987). Krom ayrıca hayvanlarda yağ metabolizmasında önemli bir bileşen olarak bilinir (Anderson, 1989). Kroma kronik maruziyet memelilerde karsinojene, teratogeneze, düşük ve erken ölü doğuma sebep olur. Bu ve bunun gibi toksik etkilerden dolayı Dünya Sağlık Örgütü (WHO) içme sularında kabul edilebilir maksimum krom konsantrasyonunu 0.05 mg/L (50 µg/L) olarak belirlemiştir (ACGIH, 2004; Kiilunen, 1994).

1.1.5. Bitkiler ve algler

Cr(VI)'nın canlı hücrelere ciddi zararlar verdiği kanıtlanmışken Cr(III) oldukça düşük çözünürlüğü nedeniyle çok daha az toksiktir. Bununla birlikte bitkilerde yapılan çalışmalarla, Cr(III)'ün Cr(VI)'dan daha yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu canlı dokularda ciddi hasarlara neden olabileceği gözlenmiştir (Cervantes ve ark., 2001).

Pratt (1966)'a göre düşük krom konsantrasyonları bitki büyümesini stimüle etmektedir. Ancak bitkilerde beslenme için kromun esansiyel bir bileşen olmadığı kesin olarak gösterilmiştir. (Huffman ve Allway, 1973). Cr(VI) etkisi, Cr(VI) yokluğunda çimlenmeyle karşılaştırıldığında, Cr(VI) varlığında gözlenen tohum çimlenmesinde indirgeme %80'den daha fazladır (Salunkhe ve ark., 1998). 5-60 mg/kg toprağın Cr(VI) konsantrasyonları köklere hasar verdiği için bitki büyümesini geciktirdiği gözlemlenmiştir (Anon, 1974). Bitkiler için toksik olan Cr(VI), kök indirgenmesi, fitomas, fotosentetik pigmentler, klorosis ve büyümeyi inhibe etmekte

ve sonuçta da bitkinin ölümüne neden olmaktadır (Tripathi ve Smith, 1996; Sharma ve ark., 1995; Gaur ve ark., 1994).

Arpa fidelerinin büyümesi üzerine 100 µM Cr (III) %40'lık bir inhibisyon etkisi yaratırken aynı derişimdeki Cr(VI), sürgünlerde %75, köklerde ise %90 büyümeyi inhibe etmiştir (Skeffington ve ark., 1976). Klorosis ve nekrosis bitkilerde Cr toksisitesi sonrasında gözlenen septomlardır. Arpa bitkilerinde 100 ppm Cr(VI)'nın 2 günlük etkileşimden sonra stress oluşturduğu ve 7-10 günden sonra tüm bitkileri öldürdüğü gözlenmiştir. Cr(VI) tarafından oluşan semptomlar Cr(III) tarafından oluşturulanlardan hem daha güçlü hem daha erken oluşmakta hem de daha düşük konsantrasyonlarda meydana gelmektedir (Hauschild, 1993). 50 ppm Cr(VI)'ya maruz kalan arpa bitkileri ise, görünüşleri değişmesine rağmen canlı kalmışlardır; 100 ppm'e maruz kaldıklarında 2 günden sonra strese girmiş, 7-10 günde tüm bitkiler ölmüştür (Carlos ve ark., 2001).

Krom etkisinde, bitkilerdeki protein içeriği ve nitrat redüktaz aktivitesindeki düşme in vitro olarak gözlenmiştir (Vajpayee ve ark., 1999). Mikronükleus oluşumu, kromozomal değişimler, *Vicia faba* ve *Allium cepa* kök uçlarında ağır metal etkisinde gözlenmiştir (Minissi ve ark.,1998; Rank ve Nielsen, 1998). Krom konsantrasyonlarıyla ilişkide mikronükleus oluşumu kontamine olmuş topraklardaki bitkilerde gözlenmişken topraktaki diğer ağır metal düzeylerinde bu durum gözlenmemiştir (Wang, 1999). Cr(III) daha az çözündüğü için yer altı sularına filtrelenmez ve bitkiler tarafından alımı da olmaz. Bununla birlikte, bitkilerle yapılan çalışmalar göstermiştir ki Cr(VI)'dan yüksek konsantrasyonlarda Cr(III) mevcudiyeti, canlı dokularında önemli problemlere neden olmaktadır.

Cr(VI)'nın alglerde büyümeyi, fotosentezi, morfolojiyi ve enzim aktivitesini etkilediği gösterilmiştir. 20 ile 10000 ppm arasında değişen Cr(VI) konsantrasyonları algler için toksik olduğu gösterildi (Schroll, 1978; Towill ve ark., 1978;; Rosko ve Rachlin, 1977; Silverberg ve ark., 1977; Anon, 1974)

Algler üzerine kromun etkileri Wong ve Trevors (1988) tarafından çalışılmıştır. Ortalama 3,6 mg/L kromun algler için toksik olduğu rapor edilmiştir (Healey, 1973). Hervey (1949), 3,2 mg/L Cr(VI)'nın *Chlorella*, 0,32 mg/L'nin ise *Euglenoidler* için inhibitör etki yarattığını rapor etmiştir. Meisch ve Smhmitt-Beckmann (1979), laboratuvar çalışmalarında 2 mg/L Cr'un *Chlorella pyrenoidosa* büyümesini ve

klorofil sentezini inhibe ettiğini gözlemlemiştir. *Spirogyra* ve *Mougeotia* alglerinde Cr(VI)'nın Cr(III)'e redüksiyonu in vivo koşullarda gözlenmiştir (Liu ve ark., 1995). Büyüme hızı bitkilerdeki krom toksisitesini belirlemek için sıklıkla kullanılmaktadır. Alglar için en düşük efektif konsantrasyon 0,3-3,6 mg/L arasında değişmektedir (Eifac, 1983).

Chlorella vulgaris büyümesi 45-100 ppm Cr(III) ya da Cr(VI) tarafından etkilenmemişken *Scenedesmus acutus*'ta 15 ppm'den daha yüksek Cr konsantrasyonlarında büyüme inhibe edilmiştir (Travieso ve ark., 1999). Bununla birlikte Brady ve ark. (1994a), 100 ppm Cr (III) etkisinde *Scenedesmus* ve *Selenastrum* alglerinin koloni büyümesi devam ederken 100 ppm'lik Cr(VI)'nın bu büyümeyi inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Cr tarafından fotosentezin inhibe edilmesi *Chlorella* (Wong ve Trevors, 1988) ve *Scenedesmus* (Corradi ve ark., 1998) için rapor edilmiştir.

1.1.6. Mikroorganizmalar

Hekzavalent kromun bakterilerde rapor edilen görülebilir etkileri arasında, hücre uzaması, genişlemesi ve genellikle hücre büyüme inhibisyonuna yol açan inhibe olmuş hücre bölünmeleridir (Coleman ve Paran, 1983; Theodou ve ark., 1976). Gram(+) ve gram(-) bakterilerin morfolojilerindeki değişimler Bopp ve ark. tarafından gözlemlenmiştir (Bopp ve ark., 1983). Araştırmacılar, *Staphylococcus aureus*, *S. Epidermidis*, *Bacillus cereus* ve *B. Subtilis* gibi birkaç bakteriyel tür kolonisinde farklı derecelerde dejenere olmuş hücrelerin varlığından bahsetmişlerdir (Bondarenko ve Ctarodooboua, 1981). 10-12 ppm'lik Cr(VI) konsantrasyonu sıvı besiyerindeki birçok toprak bakterisi için inhibitör etki gösterir ve genelde gram(-) bakteriler, gram(+) bakterilere göre Cr(VI)'ya daha hassastırlar (Ross ve ark., 1981). Cr(VI), *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, ve *Salmonella typhimurium*'da da mutajenik etkilere neden olmaktadır (Petrilli ve Flora, 1977; Nishioka, 1975; Venitt ve Levy, 1974). Kromun mutajenik etkileri sadece hücre membranından geçtiği zaman görülmektedir. Hücre membranlarından uzun inkübasyon ve yüksek konsantrasyon gibi ekstrem koşullarda difüze olabilen Cr(III)'ün aksine Cr(VI), hücre içine kolayca difüze olabilmektedir. Cr(VI)'nın hücre alımınının eşmolar çözeltilerdeki Cr(III)'e göre en az 10 kez daha fazla olduğu hücre kültürü çalışmalarında da görülmüştür (Cupo ve Wettrhahn, 1984; Levis ve ark., 1978; Gray ve Sterling, 1950). Ancak, hücre içinde Cr(VI)'nın çoğu askorbik asit, sodyum sülfid,

glutasyon, NADH ve NADPH gibi birtakım indirgeyici ajanlarla Cr(III)'e indirgenir (Petrilli ve Flora, 1978).

Bazı çalışmalara göre, trivalent kromun DNA iplikçik kırıklarına neden olduğu sonucuna varılmıştır (Bianchi ve Levis, 1984; Bianchi ve ark., 1984; DeFlora ve ark., 1984; Tsapakos ve ark., 1983; Tsapakos ve Wetterhahn, 1983; Levis ve ark., 1978; Tsuda ve Kato, 1977). Cr(VI) bakteri hücrelerinde baz çifti yer değiştirmesi ve çerçeve kayması mutasyonlarını içeren genotoksik etkilere neden olur (Petrilli ve Folar, 1977). DeFlora ve ark. (1984) dengelenmemiş nükleotit havuzlarının bir çok genel etkisinden bahsetmektedir. Aslında Cr(III) formu mutajeniteye yol açan moleküler olaylardan sorumlu büyük bir ajan olmasına rağmen, Cr(VI)'nın hücreye kolayca girmesi nedeniyle insan hayatında daha fazla risk oluşturduğu bilinmektedir.

Işıқта büyüyen *Euglena* hücrelerinin, karanlıkta büyüyen hücelere oranla Cr (VI)'ya daha hassas olduğu gözlemlenmiştir. Kromun daha düşük konsantrasyonları her iki türde de tolere edilmiştir (Cervantes ve ark., 2001). *Euglena gracilis*'te Cr (III)'ün büyüme hızını düşürdüğü ve Cr(VI)'nın lag büyüme safhasının uzattığı gözlenmiştir (Brochiero ve ark., 1984). *Euglena*'daki büyüme inhibisyonu, hücre döngüsünün G-2 fazında hücrelerin depresyonuyla solunum ve fotosentezin inhibisyonu sonucunda gerçekleşmiştir (Fasulo ve ark., 1983).

S. cerevisiae'de krom toksisitesi fermente edilebilir substanslardaki büyümeye oranla fermente edilemeyen karbon kaynaklarındaki hücre büyümesi üzerinde daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Henderson, 1989). Bununla birlikte diğer etkileri oksijen alınımının engellenmesi ve küçük mutasyonların oluşması şeklinde gerçekleşmiştir(Kharab ve Singh, 1987). Bu sonuçlar *S. Cerevisiae* mitokondrisinin krom için önemli bir hedef organel olduğunu göstermiştir (Henderson, 1989). Brady ve arkadaşları (1994a) *Scenedesmus* ve *Selenastrum* alg kolonisi büyümesinin, 100 ppm Cr(III)'den etkilenmediğini ancak 100 ppm Cr(VI)'da büyümenin gerçekleşmediğini kaydetmişlerdir. Bu mekanizma alglerin kroma karşı farklı hassasiyetleri olduğunu açığa çıkarmaktadır.

1.2. Remediasyon Stratejileri

Remediasyon stratejileri kamunun krom ile kontamine olmuş alanlara maruz kalma riskini en aza indirmek için çalışılmaktadır. Yaygın remediasyon stratejileri;

hareketsiz olma seçeneği, kontamine toprağı kazıma ve uzaklaştırma, hava basma ve işleme, toprak katılaştırması ve stabilizasyonunu içerir. Optimal remediasyon stratejisini uygulamak için kromun kimyasal durumunu ve gücünü etkileyen fiziksel ve kimyasal proseslerin anlaşılması gereklidir. Eğer çevrede potansiyel etki ve maruz kalma riski sınırdadır ise hareketsiz olma seçeneği kabul edilir. Toprak indirgeyici tiplerinin varlığının bilinmesi bu seçeneğin uygulanması için önemlidir. Kazı, basitçe kontamine toprağın bir yerden başka bir yere taşınımı sağlandığı için artık çok tercih edilen bir metottur. Havalandırma ve işleme metodu sucul remediasyonda en yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir. İyileştirme için kontaminantları yüzeylerden uzaklaştırmak ve uygunluk sınırları ötesinde kontaminantları engellemek için değişen kontrolü sağlamaktır. Bu metodun en önemli yanı artan konsantrasyondur. Bu konsantrasyon genellikle EPA'nın belirlediği maksimum kontaminat düzeyinden daha yüksektir. Toprak katılaştırma prosesi Cr(VI)'nın yer altı suyuna geçirgen olamayan znmeyen kimyasal forma dönüştürerek kontamine toprakların katılaştırmasını içerir (Sharma, 2002).

Cr(VI) remediasyonu için kullanılan kimyasal ve fiziksel işlemliler, kimyasal reaktif bariyerler, fiziksel-kimyasal geçirgen reaktif bariyerler ve biyolojik geçirgen reaktif bariyerler de ayrı bir öneme sahiptir (Molakwane, 2010). Atık sulardan Cr(VI)'yı uzaklaştırmak için kullanılan konvansiyonel yöntemler Tablo 2'de verilmiştir. Tabloda aynı zamanda bu yöntemlerin avantaj ve dezavantajları da belirtilmiştir.

Tablo 2: Atık sulardan Cr(VI) uzaklaştırma teknolojileri

Metot	Dezavantajları	Avantajları
Kimyasal Çökelme	<ul style="list-style-type: none"> • Zor ayırım • Toksik çamur problemi • Çok etkili değil • Metal ve su geri kazanımına dikkat edilmez. 	<ul style="list-style-type: none"> • Kolay • Nispeten ucuz
Elektrokimyasal arıtma	<ul style="list-style-type: none"> • Yüksek metal konsantrasyonları için uygulanması • Spesifik koşullara (girişim yapan bileşiklerin varlığı) karşı hassas olması • Yüksek ilk yatırım ve işletme maliyeti 	<ul style="list-style-type: none"> • Metal geri kazanımı
Ters osmoz	<ul style="list-style-type: none"> • Yüksek basınçta çalışması • Membran tıkanması • Pahalı 	<ul style="list-style-type: none"> • Çıkış suyu saftır(yeniden kullanılabilir).
İyon değişimi	<ul style="list-style-type: none"> • Partiküllere hassas • Reçinelerin pahalı olması 	<ul style="list-style-type: none"> • Etkili • Metal geri kazanımı mümkün
Adsorbsiyon	<ul style="list-style-type: none"> • Bazı metaller için etkili olmaması 	<ul style="list-style-type: none"> • Konvansiyonel sorbent kullanımı

Bu arıtma proseslerinin uygulanması, teknik veya ekonomik zorluklar nedeniyle zaman zaman mümkün olmaz. Ağır metal iyonlarının adsorpsiyonu için alg, bakteri, mantar ve mayaların biyosorbent olarak kullanılacakları kanıtlanmıştır (Nakiboğlu ve Sevindir, 2006; Srinath ve ark. 2002; Kıvanç ve ark. 1996). Bu yüzden yeni yöntemlerin araştırılmasına yönelim artmıştır.

1.3. Biyolojik Temizleme (Biyoremediasyon)

Endüstriyel atıklardan kaynaklanan atık ürünler her zaman çevre için ciddi problem olurlar, çünkü bu ürünler doğal olarak yüksek konsantrasyonlarda oluşmazlar (İsa ve ark., 2008). Kontamine olmuş toprak ve yer altı suları ile ilgili problemler, genellikle atık suları düzgün biçimde imhası için gerekli bilgi ve becerilerin eksikliğinden dolayı doğru iyileştirme olmaksızın endüstrilerin çevreye antropojenik katılımlarının bir sonucudur. Sonuç olarak bu kirliliğin mağduru su yüzeyleri ve topraktır, öyle ki insan ve hayvanların tüketimine bile yol açabilir (Krishna ve Philip, 2005). İnsan sağlığı için büyük bir tehdit olan bu durum endüstrilerce üretilen atıkların remediasyonunu gerektirir, bu ayrıca düzensiz kullanımdan dolayı yıllarca oluşan

atıkları da içerir (Spain, 2003; Vidali, 2001). Çevreye verdikleri bu zararı en aza indirmek için biyolojik ve biyolojik olmayan bir çok işlem yapılmaktadır. Biyolojik olarak yapılan temizleme çeşitli avantajlarından dolayı diğer yöntemlere tercih edilmektedir.

Biyoremediasyon işlemi, toprak ve yer altı sularında kirlilik yaratan organik bileşiklerin doğada doğal olarak bulunan mikroorganizmalar tarafından biyolojik olarak parçalanarak çevreye daha az zararlı bileşiklere dönüştürülmesi ile kirlenen bölgelerin temizlenmesi işlemidir. Biyoremediasyon yöntemi, mikrobiyal topluluğun yoğunluğu ve bileşimi, kirlilik yaratan organik bileşiklerin dönüşüm hızı, çevresel faktörler, substrat faktörleri ve mikrobiyal faktörlerden etkilenmektedir. Temel çevresel faktörler nem, havalandırma, sıcaklık, pH ve besin miktarıdır. Toksiklik, derişim, çözünürlük, uçuculuk ve kimyasal yapısı ile ilgili substrat özellikleri de biyolojik dönüşümü etkilemektedir. Mikrobiyal faktörler ise o bileşigi parçalayabilecek mikroorganizmanın varlığı, mikrobiyal topluluğun alıştırılması ve ekolojik faktörlerdir (Roberts, 1992).

Biyoremediasyon işleminin çevre kirliliğini gidermek için yararlanılan diğer yöntemlere göre çeşitli avantaj ve dezavantajları söz konusudur. Ekonomik olarak diğer yöntemlere göre daha ucuzdur. Çevre biyoremediasyon işlemlerinden sonra tamamıyla eski halini aldığından, ekolojik açıdan da kabul görmektedir. Hem su hem de toprakta uygulanabilir ve biyoremediasyon işlemi insan sağlığı açısından zararsızdır. Dezavantajları ise; etkinliğini tahmin etmek ve ölçek büyütme zordur. Sıcaklık, pH, nem içeriği, besin ve oksijen derişimi çevre koşulları ile değişebilmektedir. Kirleticilerin yüksek derişimleri, mikroorganizma üremesi üzerine toksik etki yapabilmektedir. Bazı kirleticiler biyodegradasyonla parçalanmamaktadır. Bu da diğer temizleme işlemlerine oranla daha uzun zaman alabilmektedir (Eweis ve ark.,1998)

1.4. Mikrobiyal Cr(VI) Biyoremediasyonu

Bioremediasyon birçok sanayi ülkesinde son otuz yıldır tamamen ticari teknoloji için laboratuarda gelişmiştir. Başarılı bir remediasyon düzeni mikrobiyal toprak popülasyonunun kontaminantları katabolize etme yeteneğine bağlıdır. Ağır metaller toprak biyokütlesi üzerinde toksik etki gösterirler ve anahtar mikrobiyal süreci etkileyerek mikroorganizmaların sayılarını ve aktivitelerini azaltırlar (Obbard, 2001).

Mikrobiyal populasyonun genellikle toprak ekolojisi üzerindeki insan kaynaklı etkilerin kolay ve duyarlı bir göstergesi olduğu ileri sürülmüştür. Cr(VI)'nın toprakta mikrobiyal populasyonun bileşiminde değişimlere sebep olduğu kesindir ve yüksek konsantrasyonları mikrobiyal hücre metabolizmasında zararlı etkilere neden olmaktadır. Ağır metallerin endüstriyel kaynaklı toprak kontaminasyonları hakkında oldukça az çalışma rapor edilmiştir (Schulin ve ark., 2007). 1970'lerde Cr(VI) indirgeme yeteneğine sahip ilk mikrobun keşfinden beri (Romanenko ve Korenkov, 1977), Cr(VI) indirgeyen mikroorganizma araştırması izole edilmiş çok sayıdaki suş ile hevesle takip edilmiştir. Son olarak aerobik bakterilerden izole edilen ve saflaştırılan Cr(VI) redüktazlara bağlı olarak anaerobik şartlar altında oluşan Cr(VI) indirgemelerini içeren prosesler de anlaşılmaya başlanmakta ve kromla kontamine bölgelerin iyileştirmesi için biyolojik prosesler çok umut verici hale gelmektedir. Cr(VI) remediasyonu ve azaltması için geliştirilen teknolojilerde, ya in situ mikrobiyal stratejileri ya da in situ biyoremediasyon stratejileri kullanılır.

Cr(VI)'yı Cr(III)'e indirgeme yeteneğindeki mikroorganizmaların keşfi bu stratejilerin gelişmesinde önemli bir potansiyele sahiptir. 1977'de ilk kez rapor edilen bakteriyel suşlar arasında *Pseudomonas*, Rus bilim adamları N.A. Romanenko ve V. Korenkov tarafından kromatla kontamine olmuş arıtma çamurundan izole edilmiştir. 1977'den beri *Bacillus cereus*, *B. Subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. ambigua*, *P. fluorescens*, *E. coli*, *Achromobacter eurydice*, *Micrococcus roseus*, *Enterobacter cloacae*, *Desulfovibrio desulfuricans* ve *D. Vulgaris* gibi kromat indirgeyen birtakım suşlar rapor edilmiştir (Lovley, 1994). Ayrıca *Bacillus spp.*, *E. coli* ATCC 33456, *Shewanella alga* BrY-MT ve birkaç kimliği tanımlanmamış suşun Cr(VI) indirgediği bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Camargo ve ark., 2003a; Guha ve ark., 2001).

Beveridge ve Mclean (2000) kromla kaplı bakır arsenatla kontamine olmuş bir bölgeden krom indirgeyen bakterinin izolasyonunu ve karakterizasyonunu çalışmıştır. Bu çalışma sonunda, çözünmeyen bir çökeltide heksavalent kromu indirgeme yeteneğine sahip olan, kromla kontamine bir bölgeden izole edilen ve böylece toksik krom türlerini solüsyondan uzaklaştıran gram negatif bir bakteri (CRB5) bilim dünyasına kazandırılmıştır. 16S rRNA analizleri, bu izolatın *Pseudomonas synxantha* ile yüksek bir benzerlikle *Pseudomonas* cinsine ait bir tür olduğunu ortaya çıkarmıştır. CRB5, kromatın yüksek konsantrasyonunu tolere edebilmekte olup, aerobik ve anaerobik şartlarda Cr(VI) indirgeyebilmektedir.

Ayrıca 48°C ve 37°C arasında, düşük besin şartları altında ve pH 4-9 düzeylerinde geniş bir oranda krom indirgeme verimliliği sergilemektedir. Donati ve arkadaşları (2001) *Thiobacillus ferrooxidans*'da Cr(VI) indirgemisini etkileyen faktörleri çalışmıştır. Enerji kaynağı olarak sülfür kullanan *T. Ferrooxidans* kültürlerinin Cr(VI) indirgeme yetenekleri yüksek indirgeme gücü ile sülfür bileşiklerinin (sülfid, tiyosülfat ve politiyonatlar) jenerasyonu ile ilişkilidir. Diğer Cr(VI) indirgeyen mikroorganizmaların aksine, *T. Ferrooxidans* düşük pH'da daha yüksek Cr(VI) indirgemesi gösterdi. Ayrıca kültürün yaşı ile beraber Cr(VI) indirgemesi de artmıştır. *T. Ferrooxidans* hücreleri terminal elektron akseptörü olarak Cr(VI) ile anaerobik şartlar altında büyüme kapasitesine sahiptir.

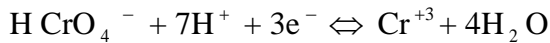
2003 yılında deri sanayinden izole edilen ve kroma dirençli bir suş olan *Candida maltosa* ile yüksek Cr(VI) konsantrasyonlarına direnci ve kimyasal olarak krom indirgeme yeteneği çalışıldı. *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Yarrowia lipolytica* gibi üç laboratuvar suşu ile karşılaştırıldığında *C. maltosa* 100 mg/mL kadar yüksek kromat konsantrasyonuna toleranslı olduğu bulundu. Ek olarak bu fenotipik özellik suşun Cr(VI) indirgeme yeteneğine sahip olduğunu gösterdi. Kromat indirgemesi hem hücre ekstraktlarında hem de bozulmamış hücrelerde (kromat içeren toprak ya da besiyeri kültüründe büyüyen hücreler) gözlemlendi. Raorathinam ve ark., (2007) karışık *Pseudomonas* kullanarak karsinojenik Cr(VI)'nın biyolojik uzaklaştırılmasını rapor etti. Bu çalışmada bataklık araziden izole edilen *Pseudomonas* kültürleri uygulanarak Cr(VI)'nin Cr(III)'e aerobik indirgemesi rapor edildi. Sıcaklık, pH, krom konsantrasyonunun rolü ve mikrobiyal Cr(VI) indirgemesindeki katkılar incelendi. 300 ppm'lik Cr(VI) konsantrasyonunda bile indirgemenin tamamlanması muhtemel olmaktadır. (SO⁴)²⁻ gibi iyonlar ve polifenoller Cr(VI) indirgemesi ile ilişkili metabolik aktiviteyi inhibe ettiler. Optimal koşullarda 100 mg/L Cr(VI) 180 dakika içinde tamamen indirgendi.

Okeke (2008) sudan izole tuz tolere eden bir bakteri, *Exiguobacterium sp.* GS1 ile hegzavalent kromun biyolojik uzaklaştırmasını çalıştı. Çalışma sonuçları izolatin 12 saat içinde önemli ölçüde hem düşük hem de yüksek konsantrasyonlarda (1-200 µg mL/1) Cr(VI)'yı uzaklaştırdığını gösterdi. Benzer olarak izolat geniş bir sıcaklık aralığında (18-45 °C) ve başlangıç pH(6-9)'da Cr(VI)'yı önemli ölçüde indirgedi. Optimum sıcaklık ve optimum başlangıç pH değerleri sırasıyla 35-40 °C ve 7-8'dir.

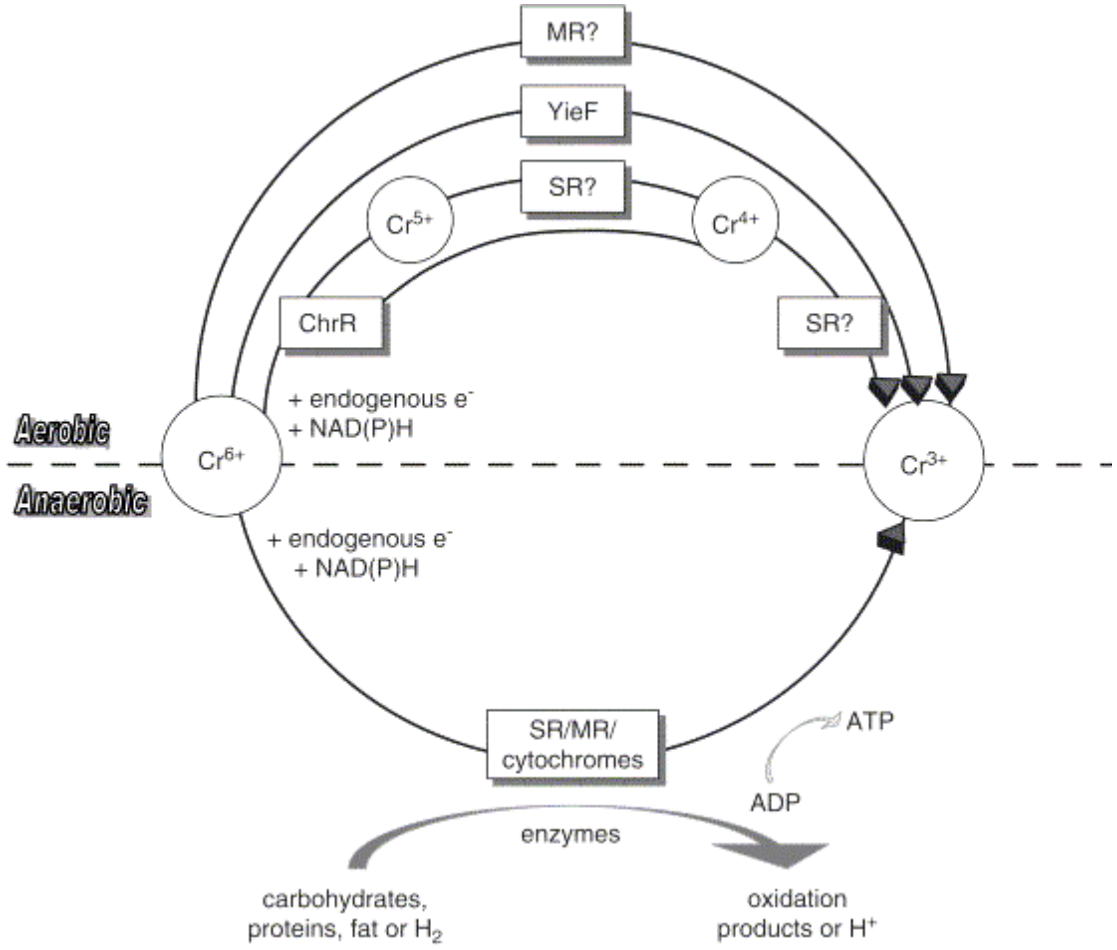
Yang ve ark., (2009) Çin'in Hunan şehrinde bir çelik-alaşım fabrikasında krom içeren cüruflla kontamine olmuş topraklarda doğal bakterilerle Cr(VI) remediyaşonunu rapor ettiler. Onların sonuçları kontamine topraklarda yeterli besin sağlandığında, 10 günde % 97.8 oranda azalma ile total Cr(VI) konsantrasyonu, başlangıç değeri 462.8 mg/kg'dan 10 mg/kg'a düşmüştür. Suda çözünen Cr(VI) başlangıç değeri 383.8 mg/kg'dan 1.7 mg/kg'a düşmüştür. Değıştirilebilir ve karbonat bağılı Cr(VI) sırasıyla %92.6 ve % 82.4 oranında uzaklaştırıldı.

1.5. Bakteriyal Cr(VI) İndirgemesi

Krom indirgeyen bakteriler yıllarca çalışılmasına rağmen, Cr(VI) indirgeme mekanizması ve biyokimyası hakkında çok azı için bilgi vardır. Cr(VI)'nın hücrelerce alınıp alınmadığı ya da sitoplazma veya periplazmada dışarıya transfer edilen elektronlarca indirgenip indirgenmediğı hala belirsizliğini korumaktadır. Hücreler ve metal oksitler arasındaki direk etkileşimin enerji korunum süreçlerini gerektirdiğı gösterilmiştir (Arnold ve ark., 1988). Topraklarda Cr(VI) indirgemesi genellikle elektron çukuru olarak hareket edebilen ve reaktif organik ve inorganik elektron kaynaklarından elektron kabul edebilen oksijen, nitrat, demir ve mangan gibi elektron akseptörleri varlığına bağıdır. Elektron donörleri fazla ve yukarıda bahsedilen elektron akseptörleri düşük olduğunda şartlar Cr(VI) indirgemesini destekleyecektir. Hekzavalent krom oksitleyici bir ajandır ve aşağıdaki eşitlikte gösterdiği gibi uygun elektron donörleri varlığında kolayca indirgenir (Sharma, 2002).



Bakteriler sitokromları içeren elektron transport sistemleri aracılığıyla aerobik ve anaerobik şartlar altında Cr(VI)'yı indirgeyebilirler. Cr(VI) indirgemesini içeren süreç aerobik ve anaerobik şartlar altında olabilir (Cheung ve Gu, 2007). Aerobik ve anaerobik şartlar altında enzimatik Cr(VI) indirgeme mekanizması Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2: Aerobik (üst hat) ve anaerobik (alt hat) şartlar altında enzimatik Cr(VI) indirgeme mekanizması (Wang ve Shen, 1995).

Aerobik şartlar altında iki-üç basamakta oluşan kısa ömürlü Cr(V) ve Cr(IV) oluşumundan sonra, Cr(VI) indirgemesinin stabil son ürünü olarak Cr(III) oluşur. Cr(V)'in Cr(IV)'e ve Cr(III)'e indirgenmesi enzim aracılı mı ya da kendiliğinden mi olduğu bilinmemektedir. Cr(VI) indirgemesi sürecinde NADH, NADPH ve endojen elektron rezervleri, elektron donörü olarak işlev görürler. ChrR enzimi geçici olarak bir elektron mekiği ile Cr(VI)'yı Cr(V)'e indirger, ara ürün Cr(V)'in bir kısmı reaktif oksijen türleri (ROT) üretmek için kendiliğinden tekrar oksitlenmesine rağmen bunu takiben iki elektron transferi ile Cr(III) üretilir. YieF enzimi ise üç elektronun Cr(III)'e verildiği ve birinin de oksijene transfer edildiği dört elektron transferi ile Cr(VI)'nın Cr(III)'e direkt indirgemesini katalize etmede eşsizdir (Cheung ve Gu, 2007).

Anaerobik koşullar altında sülfat indirgeyen bakterilerce üretilen H₂S gibi doğal anaerobik metabolitler oksijensiz ortamda etkili kimyasal Cr(VI) indirgeyicilerdir. Oksijen yokluğunda Cr(VI), solunum zincirinde karbohidratlar, proteinler, yağlar,

hidrojen, NAD(P)H ve endojen elektron rezervlerini içeren uzun bir dizi donörler için terminel elektron akseptörü olarak hizmet eder. Tipik anaerobik Cr(VI) indirgemesi şekil 2'de gösterilmiştir (alt hat). SR ve MR sırası ile çözünür ve membrana bağımlı redüktazları temsil ederler (Cheung ve Gu, 2007).

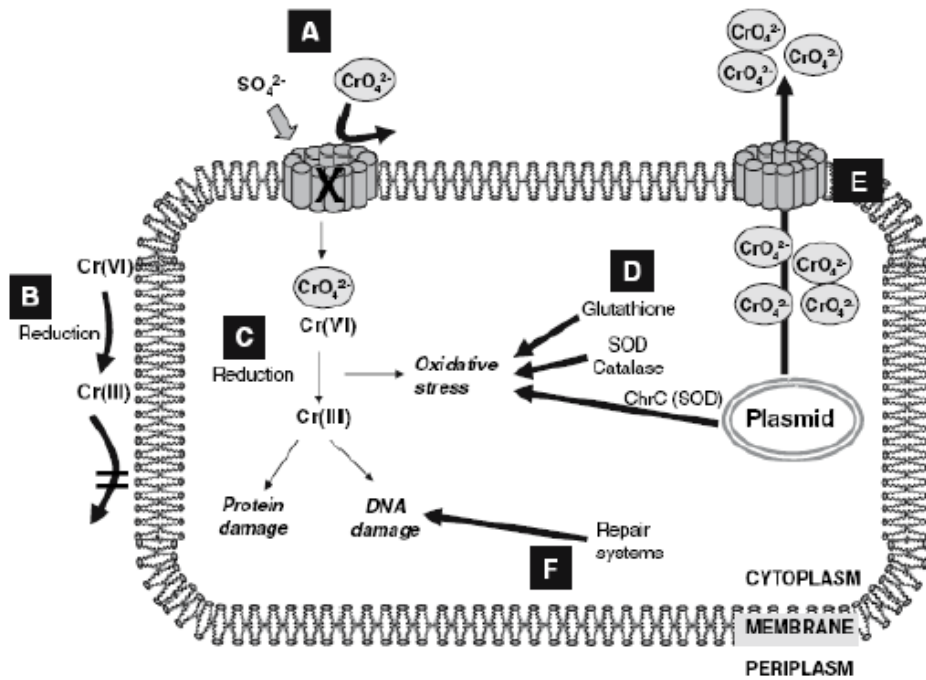
Bu güne kadar Cr(VI) indirgeme mekanizması çalışmaları *Vibrio fischeri* (Fulladosa ve ark., 2006), *Bacillus sphaericus* AND303 (Pal ve Paul, 2004), *Pseudomonas* (CRB5) (McLean ve Beveridge, 2001), *Escherichia coli* 33456 (Shen ve Wang, 1994a), ve *Enterobacter cloacae* (Wang ve ark., 1990) gibi bir çok tür üzerinde yapılmıştır. Ancak kromun ara ürün formları *Shewanella oneidensis* (Daulton ve ark., 2007; Neal ve ark., 2002) ve *Pseudomonas ambigua* G-1 (Suzuki ve ark., 1992) gibi birkaç bakteriyel suшта incelenmiştir (Codd ve ark., 2006).

1.6. Cr(VI) Dirençlilik Mekanizması

Çoğu mikroorganizma grubu Cr(VI)'ya hassastır, fakat bazı mikrobiyal türler dirençlidir ve yüksek düzeylerde kromatı tolere edebilirler. Bakterilerde Cr(VI) dirençliliği çoğunlukla plazmid kaynaklıdır. Farklı dirençlilik stratejileri tanımlanmıştır;

- Sülfat transport modifikasyonu (Brown ve ark., 2006; Hu ve ark., 2005, Thompson ve ark., 2007),
- Katalaz, süperoksit dismutaz gibi Reaktif Oksijen Türlerini temizlemek için kullanılan enzimleri aktive ederek oksidatif strese bağlı kromatla mücadele (Ackerley ve ark., 2006),
- RecA, RecG, RuvAB gibi SOS yanıtı enzimlerinin DNA hasar tamiri için üretimi (Hu ve ark., 2005; Llagostera ve ark., 1986; Miranda ve ark., 2005),
- Fenton reaksiyonu ile yüksek oranda reaktif hidroksil radikallerin üretimini engellemek için ayrı tutmaya hizmet eden demir alımının regülasyonu (Brown ve ark., 2006)
- Cr(VI)'nın, hücre yüzeyinde lipopolisakkarit ligantların fonksiyonel grupları ile reaksiyon veren Cr(III)'e hücre dışı indirgenmesi (Flemming ve ark., 1990; McLean ve ark., 1990; Snyder ve ark., 1978).

Bazı durumlarda Cr(VI) dirençliliği sülfat alınımlar mekik sistemi gibi alınımlar mekanizmalarının regülasyonu ile ilişkilidir. Kromatın yapısal olarak sülfata olan benzerliğinden dolayı, kromat bazı türlerde sülfat transport sistemini kullanarak hücreden geçer. Memranı geçtikten sonra çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan aktivitelerle, mutajeniteyi artıran DNA transkripsiyonu ile sonuçlanmasına aracılık eden Cr(III)'e indirgenir (Cervantes ve ark., 2001). Ek olarak, Cr(III) karboksil ve tiyol grupları ile reaksiyona girerek enzimlerin yapı ve aktivitelerini değiştirebilir ve çeşitli toksik etkilerini stoplazmada sergileyebilir (Cervantes ve ark., 2001). Hasar ve direnç mekanizmaları Şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil 3: Bakterilerde Cr(VI) dirençlilik mekanizması (Ramírez-Díaz ve ark., 2008).

Kromatın hücreyi geçmesi için kullanılan kromozom kodlu sülfat alınımlar yolu mutasyona uğradığında (X) kromatın transportu da azalır (A). Cr(VI)'nın extraselüler indirgenmesi Cr(III)'ün hücre membranından geçişini engeller (B). Cr(VI)'nın hücre içi indirgenmesi protein ve DNA hasarlarının yanı sıra oksidatif stresler de üretebilir (C). Detoksifiye edici enzimler kromatın toksik etkilerini minimize eden oksidatif strese karşı korumaya katılırlar (D). Plazmid kodlu transportörler kromatı stoplazmadan sızdırabilirler. DNA tamir sistemleri krom türevlerince oluşturulan hasarlardan korumaya katılırlar (F) (Ramírez-Díaz ve ark., 2008).

Çeşitli kromat dirençli bakteriyel izolatlar rapor edilerek Cr(VI) dirençlilik mekanizmasının ya kromozomal genlerle ya da plazmidlerle kodlanabildiği belirtilmiştir (Cervantes ve Campos-Garcia 2007). Genellikle plazmidlerde yerleşmiş olan genler kromat iyonunun direkt olarak stoplazmadan dışarı akmasına aracılık eden membran transportlarını kodlarlar. Diğer taraftan bakteriyel kromozomlarda kodlanan dirençlilik sistemleri genellikle spesifik ya da spesifik olmayan Cr(VI) indirgemesi, serbest radikal detoksifiye aktiviteleri, DNA hasar tamiri ve sülfür ve demir homeostazisi ile ilgili prosesler gibi stratejilerle ilişkilidir (Das, 2009).

Bazı metallerin ortamdaki kalıcı niteliği mikrobiyal topluluklarda ve aktivitelerinde önemli değişimlere yol açar. Ağır metallerin gerekli fonksiyonel grupları engelleyerek, esansiyel metal iyonlarının yerine geçerek ve biyolojik moleküllerin konformasyonlarını değiştirerek mikrobiyal büyümeyi ve diğer enzimatik aktiviteleri inhibe ettiği gösterilmiştir (Li ve Tan, 1994; Wood, 1984 Gadd ve Griffiths, 1978). Metallerle kontamine olmuş çevrelerde, mikrobiyal komünitelerin yanıtı, toksik ajanların konsantrasyonlarına bağlıdır. Bakterilerde ağır metal dirençliliği için önerilen dirençlilik mekanizmaları geçirgenlik bariyeri ile dışlama, aktif taşıma ile dışlama, hücreye bağlı proteinlerle hücre içi fiziksel ayırma, hücre dışı ayırma, toksik ve toksik olmayan metallerin kimyasal modifikasyonla detoksifikasyonunu içerir.

Mikroorganizmalar hücrel hedeflere metal hassasiyetini azaltmak için çeşitli stratejiler kullanabilirler:

- metal hassasiyetini azaltmak için mutasyonlar,
- hasarlı hücre bileşenlerin üretimi arttırma,
- hasarlı hücre bileşeni tamirinin verimliliğini arttırma,
- plazmid kodlu direnç mekanizmasının kullanımı

Bu mekanizmalar ya tek başlarına ya da çeşitli kombinasyonlarla oluşabilirler. Metallerin çevredeki sürekliliği dirençli ya da indirgeme kapasitesine sahip suşları seçer. Cr(VI) (kontamine metal) işleme-atık buharlaştırma havuzlarından izole edilen organizmaların krom toleransı bu bölge dışında karşılaştırılanlarda daha fazla olduğu bulunmuştur (Losi ve Frankenberger, 1994). Plazmid ilişkili bakteriyel dirençlilik *Streptococcus lactis* (Efstathion ve Mckay, 1977), *Pseudomonas sp* (Summers ve Jacoby, 1978) ve *Alcaligenes eutrophus*'da rapor edilmiştir. *Pseudomonas fluorescens* LB300 ile çalışmalar plazmid kaybı ile sonuçlanan Cr(VI) direnç kaybını ve suşun Cr(VI) direnç yeteneği kazanmasıyla sonuçlanan

saflaştırılmış plazmid DNA ile yapılan plazmidsiz suşun transformasyonunu göstermiştir(Bopp ve ark., 1983)

1.7. Cr(VI) İndirgeyen Bakteriler

Mikrobiyal Cr(VI) indirgemesi ilk kez 1970'lerin sonunda Romanenko ve Koron'Kev(1977) tarafından anaerobik koşullarda büyüyen *Pseudomonas sp.*'de gözlenen Cr(VI) indirgeme yeteneğiyle rapor edildi. Bu çalışmadan sonra bazı araştırmacılar çeşitli şartlar altında Cr(VI) indirgemisini katalize eden yeni mikroorganizmalar izole ettiler (Ackerley ve ark., 2004; Ramírez- Ramírez ve ark., 2004; Ganguli ve Tripathi, 2002; Chirwa ve Wang, 1997; Suziki ve ark., 1992; Baldi ve ark., 1990;Othake ve ark., 1990;). Bilinen Cr(VI) indirgeme bakterileri Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3: Bilinen krom(VI) indirgen bakteriler

Tür isimleri	İzolasyon Şartları	Referanslar
<i>Achromobacter sp.</i> StrainCh1	Anaerobik	Zhu ve ark., 2008
<i>Agrobacterium radiobacter</i> EPS-916	Aerobik-Anaerobik	Llovera ve ark., 1993
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Aerobik	Nies ve Silver, 1989
<i>Bacillus megaterium</i> TKW3	Aerobik	Cheung ve ark., 2006
<i>Bacillus sp.</i>	Aerobik	Chirwa ve Wang, 1997
<i>Bacillus sp.</i> ES 29	Aerobik	Camargo ve ark., 2003b
<i>Bacillus subtilis</i>	Anaerobik	Carlos ve ark., 1998
<i>Bacillus drentesis</i>	Aerobik	Molokwane ve Chirwa, 2009
<i>Bacillus mycoides</i>	Aerobik	Molokwane ve Chirwa, 2009
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Aerobik	Molokwane ve Chirwa, 2009

<i>Deinococcus radiodurans</i> R1	Anaerobik	Frederickson ve ark., 2000
<i>Enterobacter cloacae</i> Strain HO1	Anaerobik	Wang ve ark., 1989(a)
<i>Enterobacter sp.</i>	Aerobik	Molokwane ve Chirwa, 2009
<i>Escherichia coli</i> ATTC 33456	Aerobik-Anaerobik	Shen ve Wang, 1994b
<i>Lycini bacillus sphaericus</i>	Aerobik	Molokwane ve Chirwa, 2009
<i>Ochrobactrum sp.</i>	Aerobik	Zhiguo ve ark., 2009
<i>Pantoea agglomerans</i> SPI	Anaerobik	Francis ve ark., 2000
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Aerobik-Anaerobik	Bopp ve ark., 1983, Ohtake ve ark., 1987
<i>Pseudomonas fluorescens</i> LB300	Aerobik	Bopp ve Ehrlich, 1988
<i>Pseudomonas putida</i> MK1	Anaerobik	Park ve ark., 2000
<i>Pseudomonas sp.</i>	Aerobik	Gopalan ve Veeramani, 1994
<i>Pseudomonas spp.</i>	Anaerobik	Mclean ve Beveridge, 2001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aerobik	Aguilera ve ark., 2004
<i>Providencia sp</i>	Aerobik-Anaerobik	Thacker ve ark., 2006
<i>Shewanella alga</i> (BRYMT) ATCC 55627	Aerobik-Anaerobik	Guha ve ark., 2001
<i>Shewanella putrefaciens</i> MR-1	Anaerobik	Myers ve ark., 2000

1.8. Cr(VI) İndirgeme Yolları

Mikroorganizmalar bazı oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarına katılarak metabolizmaları için enerji elde ederler. Tüm mikrobiyal prosesleri yöneten itici güç olan elektron transferleri fotosentez ortamlarında meydana gelmez. Çevreye bağımlı mikroorganizmalar enerjinin korunumu için çeşitli oksidasyon-redüksiyon çiftlerine

aracılık etme yetenekleri uyarlanmış ve geliştirilmiştir. Bazı Cr(VI) dirençli bakteriler Cr(VI)'yı Cr(III)'e indirgeyerek büyüebilmektedir. Cr(VI) indirgemesi bazı bakterilerin hayatta kalmak için ortamın detoksifikasyonu ile savunma mekanizması olarak kullandığı tesadüfi indirgeme süreci olarak kabul edilir. Çoğu Cr(VI) indirgeyen bakteri (KİB) şimdiye kadar gram negatif olan bakteriler rapor edildi (Francis ve ark., 2000; Baldi ve ark., 1990). Son zamanlarda terminal elektron akseptörü olarak Cr(VI)'yı kullanma yeteneği sülfat indirgeyen bir bakteri grubunda ve *Pantoea agglomerans*'da gösterilmiştir (Francis ve ark., 2000; Tebo ve Obraztsova, 1998).

Cr(VI) indirgemesi bazı bakteri türlerinde ko-metabolik olarak (enerji korunumuna katılmaksızın) gösterilmiştir, fakat ağırlıklı olarak anaerobik koşullar altında katabolik ya da solunumla ilgilidir. Daha sonraki süreçlerde Cr(VI), büyüme ve hücre korunması için enerji korunumuyla sonuçlanan proses olan membran elektron-transport solunum yolağında bir terminal elektron akseptörü olarak işlev görür (Lovley ve Phillips, 1994; Ishibashi ve ark., 1990; Horitsu ve ark., 1987). Katabolik ya da solunumla ilgili süreçte elektronlar NADH elektron donöründen Cr(VI)'ya aktarılır (Chirwa ve Wang, 1997; Suzuki ve Fukuda, 1990).

Cr(VI) indirgemesinin katabolik doğası daha evvel Wang ve ark., (1990) tarafından yapılan indirgenmiş kromun ağırlıklı olarak besi yerinde bulunduğu ve *Enterobacter cloacae* HO1'in parçalanmış hücrelerinde sadece % 30'dan daha azı serbest bırakıldığı tüm hücre ve parçalanmış hücre deneylerinde gösterilmiştir. Shen ve Wang (1993) Cr(VI) indirgeyen *E.coli* ATCC 33456 ile çalışarak bu sonuçları doğrulamıştır. Daha sonraki deneylerde, indirgenmiş kromun sadece %10'u hücreler içerisinde biriktirilmiştir.

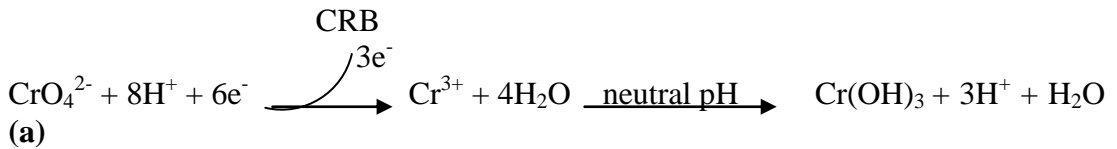
Şu anda mikrobiyal Cr(VI) indirgemesi direk enzimatik indirgeme ve indirek indirgeme olmak üzere iki mevcut modelle açıklanabilir. Enzimatik ve nonenzimatik bu iki indirgeme arasında ayırım yapmak zordur. Direk enzimatik indirgeme redüktaz sistemiyle indirgeme anlamına gelir. İndirek mekanizma ise esas olarak bakteriyel metabolitler gibi bakteriyel kaynaklarca sağlanan şartlarla indirgeme anlamına gelir.

1.8.1. Direk Enzimatik ve İndirek Cr(VI) indirgemesi

Shen ve Wang tarafından yürütülen çalışmalar (Shen ve Wang, 1993) *E. coli*'de çözümlü kromat redüktaz varlığını öne sürdü. Diğer bir grup gram negatif

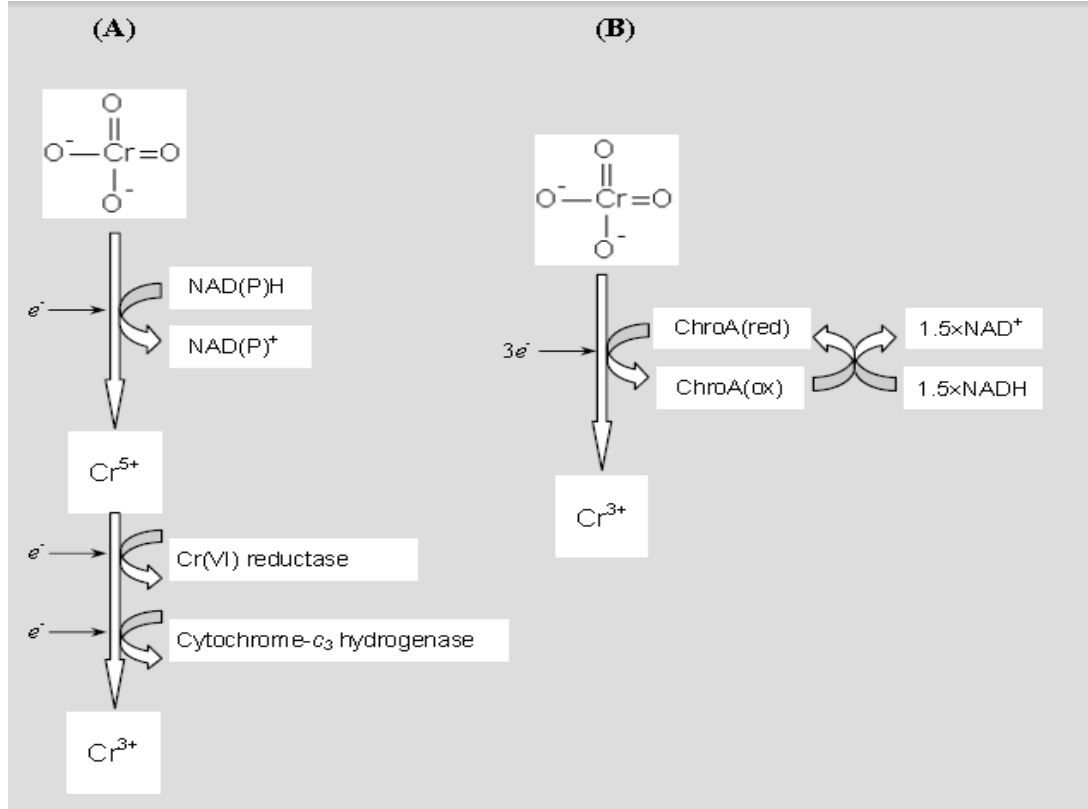
bakterilerde, *Pseudomonas sp* CRB5’de Cr(VI) indirgemesine stoplazmada yerleşmiş çözüdür bir enzimle aracılık ettiği bulundu (McClellan ve Beveridge, 2001). Gram negatif bakterilere ek olarak çözüdür enzim redüktazlar ayrıca gram pozitif suşlarda da gözlemlendi. *Bacillus coagulans*’da çözüdür enzimle kromat indirgemesi için elektron donörü olarak NADH tercih edilir (Philip ve ark., 1998).

Direk enzimatik indirgemedede okside NADH’ın mol başına iki mol elektron transfer edilir. ChroA redüktaz *Pseudomonas fluorescens* LB300’de Cr(VI) ile aktive olan ChroA geni kaynaklı kromozom kodlu olarak tanımlanmıştır. Mikroorganizmalarca Cr(VI) indirgemesi sıklıkla pH’nın yükselmesi ile sonuçlanan indirgeme eşdeğerlikleri olarak yüksek miktarda proton tüketimi ile sonuçlanır. pH’nın artması indirgenmiş kromun, eşitlik (a) ve (b)’de gösterildiği gibi krom hidroksit($\text{Cr}(\text{OH})_3$) olarak çökmesini kolaylaştırır (Brock ve Madigan, 1991; Zakaria ve ark., 2007).



Eşitlik (a) Cr(VI) indirgeyen bakterilerce katalizlenen jenerik bir Cr(VI) indirgeme reaksiyonunu gösterirken, eşitlik (b) elektron donörü olarak basit bir karbon kaynağıyla Cr(VI) indirgemelerini gösterir. Ayrıca diğer yağ asidi hidroliz biyoyürünleri Cr(VI) indirgemesi için elektron donörü olarak hizmet edebilir

Cr(VI) indirgemesi için yaygın iki yolak Şekil 5’de gösterilmiştir, bunlardan ilki Cr(VI)’nın Cr(III)’e direk olarak çözüdür ya da membran ilişkili bir redüktazla indirgenmesidir (B) (Chirwa, 2001), ikincisi ise stabil olmayan bir ara ürün olan Cr(V) formunu içeren Cr(VI) indirgemesidir (A) (Suzuki ve ark., 1990). İlk yolak yaygın biçimde aerobik şartlar altında çoğunlukla *Bacillus*’da gözlemlenmişken, ikincisi anaerobik şartlar altında *Pseudomonas* türlerinde gözlemlenmiştir.



Şekil 4: Cr(VI) indirgeme yolları: (A) NAD(P)H oksidasyonu ile kolaylaştırılmış geçici ürün Cr(V) aracılığıyla adım adım indirgeme (Suzuki ve ark., 1990) ve (B) NADH oksidasyonu ile kolaylaştırılmış çözümlü redüktaz Chro A ile direk indirgeme (Chirwa, 2001).

Cr(VI) indirgemesi diğer türlerde, spesifik olmayarak stokromların kroma elektron transferleri gibi redoks aktif biyomolekülleri olan tesadüfi bir reaksiyon olarak oluşur (Lovely ve Phillips, 1994). *Desulfotomaculum reducens* ve *Pantoea agglomerans* gibi iki bakteri türü büyüme için hidrojen ya da organik asitlerin oksidasyonu için çiftleşmiş Cr(VI) indirgemelerinden korunan enerji ile solunum elektron akseptörü gibi Cr(VI)'yı kullanarak enerji elde ettiği gösterilmiştir (Francis ve ark., 2000; Tebo ve Obraztsova, 1998). Bu gözlemler glukoz, pepton, ve biyolojik Cr(VI) indirgemelerini başarmak için her zaman gerekmeyen triptoz gibi yüksek oranda bozunabilir substratların varlığını gösterir. Daha uzun süreli bu gözlemlere göre, enerjice zengin moleküller hücrenin merkezi metabolik sistemi için ara ürün ya da karbon kaynağı gibi kritik olan daha basit metabolitlere dönüştürülebilir.

1.8.2. Kromat redüktazlar

Enzimatik Cr(VI) indirgemesi bazı krom indirgeyen bakterilerde gösterilmiştir (Ganguli ve Tripathi, 2001; Kaufman ve Lovley, 2001; Bae ve ark., 2000; Oh ve

Choi, 1997; Clark, 1994; Yamoto ve ark., 1993; Suziki ve ark., 1992). CRB'ler Cr(VI)'yı ya çözünür ya da membrana bağlı enzim sistemleriyle indirgeyebilirler. Membran ilişkili kromat reduktaz aktivitesi ilk kez hücre yüzeyinde gözlenen çözünmeyen formdaki indirgenmiş kromat çökeltilerinde yer alan *Enterobacter cloacae* HO1'de gözlemlendi (Wang ve ark., 1989b). Elektron donörü olarak fenazin metosülfat (PMS) indirgeyen askorbat varlığında *Enterobacter cloacae* HO1'in dış membran keseciklerinin sağ tarafında yüksek kromat indirgemesi gözlemlendi (Wang ve ark., 1989b). Daha sonra NADH'tan kromata elektron transfer eden membran ilişkili esas enzim Bopp ve ark. Tarafından açığa çıkarıldı (Bopp ve ark., 1983). *Shewanella putrefaciens* MR-1 kromat redüktaz aktivitesi anaerobik olarak büyüyen hücrelerin stoplazmik membranı ile ilişkilendirildi (Myers ve ark., 2000). Format ve NADH redüktaz için elektron donörü olarak hizmet etti. Elektron donörü olarak NADPH ve L-Laktat sağlandığında aktivite olmadığı gözlemlendi. Ancak bunun için, *Shewanella putrefaciens*'in aksine *Pseudomonas putida*'da NADPH bir elektron donörü olarak hizmet etti (Park ve ark., 2000).

1.8.2.1. Aerobik redüktazlar

Daha önce *pseudomonas* 'lardan Cr(VI) redüktaz saflaştırmasının yapıldığı çeşitli çalışmalar rapor edilmiştir. Ishibashi ve ark., (1990) *P. putida* PRS 2000'den çözünür bir Cr(VI) redüktazı kısmen saflaştırdı. Suzuki ve ark., (1992) *P. ambigua* G-1'den 38 kat daha saflaştırılmış çözünür bir Cr(VI) redüktaz rapor ettiler. Daha sonraki bir araştırmada, bu redüktazı kodlayan genin *Vibrio harveyi* KCTC 2720'in ayrıca Cr(VI) indirgeme aktivitelerine sahip olan nitroredüktazına %58 oranında yüksek bir nükleotit sekans homolojisi sergilediği bulunmuştur (Kwak ve ark., 2003). Park ve ark., (2000) *P. putida* MK1'den 600 kat daha çözünür bir Cr(VI) redüktazı, chrR'yi saflaştırdılar. ChrR'yi kodlayan chrR geni, saf enzimin N-terminal ve internal amino asit segmentlerinin bilinen amino asit sekanslarına dayalı olarak *P. putida* MK1'in genomik sekansından tanımlanmıştır (Park ve ark., 2002). Ackerley ve ark., (2004) ChrR'yi optimum olarak 70°C'de Cr(VI) indirgemisini katalizleyen dimerik bir flavoprotein olarak tanımladılar. Açık okuma çerçevesinde *E. coli* kromozomunda bir fonksiyonla görevlendirilmemiş yieF, ChrR ile yüksek bir homolojiye sahip olduğu bulunmuştur. Bu gen klonlandı ve kodlanan protein YieF, 35°C 'de maksimum Cr(VI) indirgemesi gösterdi (Park ve ark., 2002). Son zamanlarda bir

membran ilişkili Cr(VI) redüktaz da iki boyutlu jel elektroforezinde saptanan *B. Megaterium* TKW3'ün proteomundan tanımlanmıştır (Cheung ve ark., 2006).

1.8.2.2. Anaerobik redüktazlar

Anaerobik koşullar altında Cr(VI) indirgeme sürecine aracılık etmek için hem çözüdür hem de membran ilişkili enzimler bulundu. Aeroblardan izole edilen Cr(VI) redüktazların aksine, anaerobların Cr(VI) indirgeme aktiviteleri, solunum zincirleri boyunca hazır olarak elektron mekiği katalizleyen elektron transfer sistemleri ile ilişkilidir (Wang ve Shen, 1995). Stokrom b ve stokrom c gibi stokrom ailelerinin sıklıkla enzimatik anaerobik Cr(VI) indirgemesinde rol aldığı gösterilmiştir. Cr(VI) indirgeme aktivitelerine sahip olan anaerobların yaygın biçimde ortaya çıkması, reaksiyonu kolaylaştırmak için fiziksel şartların modülasyonu ve sadece besinlerin eklenmesini gerektirecek olan Cr(VI) ile kontamine sedimentlerin in situ biyoremediasyonu için büyük potansiyel sunar (Turick ve ark., 1996).

1.8.2.3. Krom varlığında kromat redüktazın indüklenmesi

SDS-PAGE kullanılarak günümüze kadar yapılmış ve kromat redüktazın moleküler ağırlığı hakkında bize fikir verebilecek birkaç çalışma mevcuttur. Park ve ark., 2000 yılında yapmış oldukları çalışmada *Pseudomonas putida* MK1'den saflaştırdıkları kromat redüktazın moleküler ağırlığının yaklaşık 20 kDa olduğunu belirlemişlerdir. Suzuki ve ark. (1992), *P. ambigua*'dan saflaştırılan kromat redüktazın SDS-PAGE ile moleküler ağırlığının 25 kDa ve Native-PAGE ile 65 kDa civarında olduğunu bildirmişlerdir (Suzuki ve ark., 1992). *P. aeruginosa* (Ganguli ve Tripathi, 2001) ve *Ochrobactrum* sp.(Thacker ve Madamwar, 2005)'de bu protein yaklaşık 30 kDa ağırlığındadır. 100µg/ml Cr(VI) varlığında geliştirilen *Bacillus* sp. JDM-2-1 ve *S. Capitis* bakterilerinde 25 kDa moleküler ağırlığına sahip bir protein bandının indüklendiği ve bu proteinin kromat redüktaz olduğu rapor edilmiştir (Zahor ve Rehman, 2009).

1.9. Mikrobiyal Krom İndirgemesini Etkileyen Faktörler

1.9.1. Hücre yoğunluğu

Cr(VI) indirgeme oranı hem aerobik hem de anaerobik şartlarda hücre yoğunluğu ile etkilendiği gösterildi. Wang ve ark., (1989a) anaerobik şartlarda hücre yoğunluğu

artışıyla Cr(VI) indirgeme oranında artışı tespit etti. Benzer gözlemler hem aerobik hem de anaerobik şartlarda *E. coli* kültürlerinde yapıldı. Ancak Cr(VI) indirgeme oranı hücre yoğunluğu artışı ile orantılı değildi ve spesifik Cr(VI) indirgeme oranı daha düşük yoğunluklarda nispeten daha yüksek olduğu bulundu (Shen ve Wang, 1994b). Bu gözlemler ayrıca *Enterobacter cloacae*, *Agrobacterium radiobacter*, *Pseudomonas fluorescens* LB300, *Bacillus coagulans*, ve *Microbacterium sp.* kültürlerinde de kanıtlandı.

1.9.2. Başlangıç Cr(VI) konsantrasyonu

Başlangıç Cr(VI) konsantrasyonuna bağlı olarak *Enterobacter cloacae* HO1'de tamamlanmış ya da tamamlanmamış indirgeme gözlemlendi (Fujie ve ark., 1990; Komori ve ark., 1989). Büyüyen kültüre Cr(VI) eklenmesiyle hücre canlılığında bir azalışa rağmen, bazı *Enterobacter cloacae* (Wang ve ark., 1989b), *E. coli* (Shen ve Wang, 1994b), *P. fluorescens* (Wang ve Xiano, 1995) ve *Bacillus sp.* (Wang ve Xiano, 1995) kültürlerinde başlangıç Cr(VI) oranının artmasıyla başlangıç Cr(VI) indirgeme oranı arttı. Benzer olarak, spesifik başlangıç Cr(VI) indirgeme oranı *E. coli* kültürlerinde de Cr(VI) konsantrasyonlarının artmasıyla arttı. Ancak Cr(VI) indirgemesi için gerekli zamanın artışı da ayrıca gözlemlendi (Shen ve Wang, 1994b).

1.9.3. Elektron akseptörlerinin etkisi

Bazı bakterilerde oksijen varlığı Cr(VI) indirgemelerini tamamen inhibe etmez, fakat *Agrobacterium radiobacter* EPS-916, *E. coli* ATCC 33456 ve *Pseudomonas stutzeri* CMG463'te olduğu gibi baskılar (Badar ve ark., 2000; Wang ve Shen, 1995; Shen ve Wang, 1994b; Llovera ve ark., 1993; Shen ve Wang 1993; Komori ve ark., 1989). Mikrobiyal Cr(VI) indirgemesi *Enterobacter cloacae* HO1'de olduğu gibi hücre büyümesi gözlenmesine rağmen aerobik şartlar altında tamamen inhibe edilir (Fujie ve ark., 1990). Zenginleştirme mikroorganizmaları ile yapılan çalışmalar, %84 indirgeme gözlenen anaerobik şartlar ile karşılaştırıldığında aerobik şartlarda sadece %41 indirgeme gösterdi (Marsh ve ark., 2000). Marsh ve ark. (2000) oksijen ve nitrat indirgemeyi inhibe ettiğinden dolayı Cr(VI) indirgemesi için daha düşük indirgeme şartlarının gerekli olduğu sonucuna vardılar.

Sülfat ve nitrat gibi doğal olarak oluşan elektron akseptörleri arasında Cr(VI) indirgemesi üzerine sırası ile 10 mM ve 16 mM konsantrasyonlarda çok az etkileri vardır. Bu konsantrasyonlar çeşitli bakteri türleri ile değişmez. *Pseudomonas putida*

ile yapılan krom indirgemesi 1 mM sülfat ve 0.2 mM nitrat konsantrasyonundan etkilenmemiştir. Etki etmeyen konsantrasyonlar sırasıyla *Bacillus sp.*'de 10 ve 16 mM, *E. coli*'de 83 ve 129 mM'dır. 50 mM'a kadar yüksek sülfat konsantrasyonu *Desulfovibrio vulgaris*'de Cr(VI) indirgemesini etkilememiştir (Lovley ve Phillips, 1994). Buna karşın *Enterobacter cloacae*'de sadece % 32'lik 25 µM sülfat ve % 84'lük 5 mM NaNO₃ varlığında Cr(VI) indirgemesi inhibe olmuştur. Marsh ve ark.(2000) Tarafından alternatif elektron akseptörleri ile yapılan zenginleştirme çalışmaları, nitrat indirgemesinin Cr(VI) indirgemesinden önde gittiğini göstermiştir.

1.9.4. Sıcaklık ve pH etkileri

Mikrobiyal Cr(VI) indirgemesi için bildirilen optimum sıcaklık ve pH şartları güçlü olarak indirgeme sürecinde büyüme ile ilişkili olduğu rapor edildi. Cr(VI) indirgemesi *Enterobacter cloacae* için pH 6-8.5, *E. coli* ve *Bacillus coagulans* kültürleri için pH 3-8 aralıklarında gözlenmiştir. Ancak maksimum başlangıç Cr(VI) indirgeme oranı her üç bakteri grubu için de, çoğu bakteri grubunun büyümesi için optimum olan pH 7'dir. *Enterobacter cloacae* ve *E. coli*'de 10-50 °C gibi geniş bir aralıkta gerçekleşen Cr(VI) indirgemesine rağmen, optimum sıcaklık sırasıyla 36 °C ve 30 °C'dir. Bu şartlar anaerobik büyüyen bakteriler için optimal olarak bulunmuştur. Sedimentlerle yapılan çalışmalar optimum sıcaklığın 22 °C ve 50 °C ve optimum pH'nın 6.8 olduğunu göstermiştir (Marsh ve ark., 2000).

1.9.5. Karbon kaynakları ve elektron donörleri

Organik maddeler elektron vericisi görevi yapıp Cr(VI) bileşiklerini Cr(III) bileşiklerine dönüştürmektedir (Losi ve ark., 1994; Wittbrodt ve Palmer, 1995, 1996; Gu ve Chen, 2003). Ancak literatürde reaksiyon mekanizmaları ve EPS, fulvik asit, humik asit gibi doğal organik asitlerde mevcut hangi fonksiyonel grupların Cr(VI) indirgenmesinde rol aldığı tam olarak bilinmemektedir. Gu ve Chen (2003) tarafından yapılan çalışmaya göre Cr(VI)'nın biyoredüksiyonu, çalışmada kullanılan doğal organik asitlerin molekül ağırlığı ve yapısına bağlı olarak farklılık göstermektedir. Cr(VI)'nın doğal organik asitler tarafından indirgenmesi ortamın pH'sına, sıcaklık, iyonik güç ve ortamda mevcut Fe ve Mn gibi diğer redoks reaktif metallere konsantrasyonuna bağlıdır (He ve ark. 2004; Zayed ve Terry, 2003; Wittbrodt ve Palmer 1995; 1996; Rai ve ark., 1987; Adriano, 1986).

Elektron donörleri ve Cr(VI) indirgeme oranı arasındaki ilişkileri kurmak ve denemek için çalışmalar yapılmıştır. Marsh ve ark. Tarafından topraklarla yaptığı zenginleştirme çalışmaları Cr(VI) indirgemesi için hidrojenin etkili bir elektron donörü olduğunu gösterdi. Ek olarak toprakta glukoz, format ve hidrojen gibi hidrojen biyoyararlanımını arttıran elektron donörleri, asetat, benzoat ve laktatla karşılaştırıldığında Cr(VI) indirgemesini sitümüle etmiştir (Marsh ve McLenerney, 2001).

Rege Cr(VI) indirgemesi için *Enterobacter cloacae* HO1'in karbon kaynağı olarak sükrozu kullandığını rapor ettiler (Rege, 1997). Cr, yeraltı sistemlerinde mevcut humik asit, fulvik asit gibi doğal organik asitler ile sitrik asit, alginik asit gibi mikrobiyal yollarla oluşan ligandlarla kuvvetli bileşikler oluşturur (Dubbin, 2004).

Krom-organik molekül interaksiyonlarını izah edebilmek için birkaç mekanizma ileri sürülmüştür. Wittbrodt ve Palmer (1995) ve Uygur ve Bekbolet (2004), Cr-organik ligand bileşiklerinin, ester oluşumu veya Cr(VI)'nın Cr(III)'e indirgenmesi ile oluştuğunu ifade etmektedir. Metaller ile organik ligandlar arasındaki kompleksleşme reaksiyonu, doğal organik asitlerde bulunan karboksil ve fenol grupları ile serbest metal iyonun oluşturduğu bir iyon değişimi prosesi olarak tanımlanmaktadır.

Puzon ve ark. (2005)'ına göre mikrobiyal prosesler sonucu ortaya çıkan organik moleküller Cr(III) ile kompleks oluşturarak Cr(III)'ü çözünmüş iyonlar halinde suda tutmaktadır. Mikrobiyal prosesler sonucu suda çözünmüş Cr-ligand bileşikleri olduğu gibi, çözünürlüğü düşük ve tanecik boyutu yüksek organik makromoleküller (6-15 kDa) ile Cr(III)'ün interaksiyona girdiği de görülmektedir (Puzon ve ark., 2005).

Yeraltı suyunda, toprakta ve atıklarda bulunan doğal organik moleküller ortam koşullarına bağlı olarak kromun biyoyararlılığını ve taşınımını etkileyebilmektedir (Puzon ve ark., 2005; Dubbin, 2004; Abollino ve ark., 2003; Zayed ve Terry, 2003; Kraemer ve ark., 2002). Organik asitler, genelde düşük pH' larda metal adsorpsiyonunu arttırırken, alkali koşullarda ise azaltırlar (Kantar ve Honeyman, 2005). Sitrik asit gibi organik asitlerin ya krom kolloidlerini yeniden mobilize ettiği ya da krom çözünürlüğünü arttırıp toprakta taşınımını hızlandırdığı bilinmektedir (Johnson ve ark., 2001; Bartlett ve Kimble, 1976). Bazı araştırmacılar tarafından elde

edilen bulgulara göre de Cr(III)' ün değişik organik asitler ile kompleks oluşturmasıyla bitkiler tarafından alınımının hızlandığı belirlenmiştir (Srivastava ve ark., 1999). Uygur ve Bekbolet (2004) tarafından yapılan bir çalışmada humik asitin Cr(VI)' nin TiO₂ adsorpsiyonunu azalttığı gözlemlenmiştir. Mayes ve ark. (2000)' na göre, bol miktarda organik madde ihtiva eden bir toprak kolonunda Cr(VI)' nin Cr(III)' e indirgenerek gecikmeye uğradığı saptanmıştır. Ayrıca araştırmacılar, toprak kolonunda organik maddelerin Cr(VI)' yı indirgeyici bir rol üstlendiğini ve indirgenme reaksiyonlarının zamana bağlı olduğunu da gözlemlemişlerdir.

Doğal organik maddeler elektron vericisi görevi yapıp Cr(VI) bileşiklerini Cr(III) bileşiklerine dönüştürmektedir (Wittbrodt ve Palmer, 1995; Gu ve Chen, 2003; Xu ve ark., 2004; Park ve ark., 2004). Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarla, kromun bakteriler tarafından indirgenmesinde doğal organik asitlerin yardımcı bir rol oynadığı belirlenmiştir (Gu ve Chen, 2003; Tokunaga ve ark., 2003). Doğal organik asitler, mikroorganizma ile metal veya metal oksit arasında bir elektron düzenleyici görevi üstlenmektedir (Lovely, 1996). Bazı anaerobik bakteriler tarafından indirgenen doğal organik asitler elektron vericisi olarak davranmakta ve metalleri indirgemektedir (Gu ve Chen, 2003).

1.9.6. Metal ve ağır metaller

Ağır metaller, yoğunlukları 5 g/cm³'den büyük olan elementlerin oluşturduğu bir grup olarak tanımlanmakta ve bu kategoriye giren yaklaşık 40 kadar elementten oluşmaktadırlar (Srivastav ve ark., 1994; Zenk, 1996).Bakır, inko,kadmiyum, Kurşun, Civa, Nikel, Kobalt ve gibi ağır metaller, endüstriyel aktiviteler, atık su deşarjları ve asit yağmurlarıyla su ekosistemlerine girmektedirler (Moiseenko ve Kudryavtseva, 2001). Su ortamlarına giren bu metaller, besin zincirinde birikmekte ve ekolojik zararlara neden olmakta ve hatta insan sağlığını tehdit edebilmektedirler (Ermoesele ve ark., 1995; Adams ve ark., 1992; Grimanis ve ark., 1978). Birçok insan hastalıklarının artan ağır metal kirliliğiyle ilişkili olduğu zaten bilinmektedir; örneğin, Hg nörolojik etkilere, Cd ve Pb kanserojenik etkilere, Sr kemik dokularında patolojiye ve Cu ise anemiye neden olmaktadır (IPCS,1992; Foulkes, 1990; Alabaster ve Lloyd, 1982; Kovalsky, 1974). Bununla birlikte ortamdaki tehlikeli ağır metal düzeylerini belirlemek şu nedenlerden dolayı oldukça güçtür;

- Çoğu metaller (Cu, Zn, Co, Sr ve Ni gibi) organizmada zaten doğal olarak mikro düzeylerde bulunur.
- Metal zehirlenmesi, hem metalin direkt toksisitesine hem de mutajenik, embriyotoksik, gonadotoksik ve kanserojenik etkilerini içeren uzun dönem biyobirikiminin sonucudur.
- Toksik etkiler, metalin özelliğine, metal kombinasyonlarına (yani sinerjik ve antogonistik etki) ve diğer faktörlere bağlıdır (Moiseenko ve Kudryavtseva, 2001).

Birçok ağır metal, d orbitallerinin tamamen dolu olması nedeniyle geçiş elementleridir. Bu d orbitalleri ağır metal katyonları ile redoks tepkimelerine girebilen veya giremeyen herhangi bir bileşik ile karmaşık yapı oluşturmasını sağlamaktadır. Bu nedenle, ağır metaller birer iz element olarak birçok karmaşık biyokimyasal reaksiyonda önemli rol oynamaktadır (Nies, 1999). Örneğin Ca^{+2} , Co^{+2} , Cr^{+6} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , K^{+1} , Mg^{+2} , Na^{+1} , Ni^{+2} ve Zn^{+2} gibi metaller esansiyeldir ve besiyerlerine eklenmeleri gerekmektedir. Bu metaller, mikro besin olarak redoks tepkimelerinde, moleküllerin elektrostatik etkileşimlerini kararlı tutmak ve ozmotik basıncı kontrol etmek için enzimlerin bileşenleri şeklinde kullanılırlar. Fakat Ag^{+1} , Al^{+1} , Au^{+2} , Cd^{+1} , Pb^{+2} ve Hg^{+2} gibi ağır metallerin biyolojik bir önemi yoktur ve bu metaller esansiyel değildir. Aynı zaman da besinsel değerleri de yoktur. Bununla birlikte, mikroorganizmalar için oldukça toksik etkileri bulunmaktadır. Bu toksik metaller önemli hücresel bileşenler ile kovalent ve iyonik bağlar yaparak etkileşime girmektedirler. Yüksek konsantrasyonlarda esansiyel olan ve olmayan bütün metaller; hücre zarı hasarına yol açıp, enzim spesifikliğini değiştirebilir, hücresel fonksiyonları bozabilir ve DNA'nın yapısına zarar verebilmektedir. Bu nedenle metallerin bütün canlı hücre metabolizmalarının dengede tutulmasında çok önemli bir yer oluşturduğu açıkça görülmektedir (Bruins ve ark., 2000; Nies, 1999).

Tekstil, deri, boya, metal ve kâğıt endüstrilerinden kaynaklanan atık sular fazla miktarda ağır metal içermektedir. Bu tip atık suların arıtılmadan kontrolsüz bir şekilde çevreye boşaltılmaları o çevredeki canlılara toksik ve mutajenik etki yapmaktadır. Çeşitli metaller bazı organizmalarda canlılığın devam ettirilmesi için çok az miktarlarda kullanılsalar da yüksek konsantrasyonları hücrede zararlı etkilere yol açmaktadır. Ag^{+1} , Al^{+1} , Au^{+2} , Cd^{+1} , Pb^{+2} ve Hg^{+2} gibi toksik metallerin ise biyolojik önemi bulunmamakla birlikte hücrede düşük konsantrasyonda bile

bulunmaları tehlikeli olmaktadır (Malik, 2004; Madigan ve ark., 2003; Mergeay ve ark., 2003; Nies, 2003; Bruins ve ark., 2000). Bu nedenle endüstriyel atık sulardan öncelikle ağır metallerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Yapılan birçok çalışmada, ağır metallerin çeşitli mikroorganizmalarla endüstriyel atıksulardan uzaklaştırıldığı gösterilmiştir. Mikroorganizmaların toksik, karsinojen ve mutajen olabilen ağır metal iyonlarına tolerans gösterip bu kirleticileri ortamdan uzaklaştırabilmesi ağır metallere direnç geliştirmeleri ile gerçekleşmektedir.

- Mikroorganizmalarca ağır metalin hücre içine alınmaması,
- Hücre içinde veya dışında tutulması,
- Kirleticinin daha az toksik forma çevrilmesi,
- Metalin hücre dışına aktif taşınması
- Mikroorganizmanın metale karşı daha duyarsız hale gelmesi

gibi direnç mekanizmaları bugüne kadar tanımlanabilmiş sistemlerdir (Aksu ve ark., 2007; Koçberber ve Dönmez, 2007; Diffels ve ark., 2006; Sultan ve Hasnain, 2006; Kourtev ve ark., 2006; Egler ve ark., 2005; Moller ve ark., 2005; Ksheminska ve ark., 2005; Malik, 2004; Bruins ve ark., 2000).

Ağır metallere dirençli mikroorganizmalar, bahsedilen bu direnç sistemlerinden birini veya birkaçını bir arada kullanarak ağır metalin toksik etkilerinden korunmaya ve canlılığını sürdürmeye çalışmaktadır. Bu direnç yollarında da stres koşuluna yanıt niteliğinde sentezi artan bazı proteinler anahtar rolü oynamaktadır. Ağır metal stresindeki bir mikroorganizma bu strese adapte olabilmek ve dayanıklılık sağlamak için bazı proteinlerin sentezini arttırma yoluna gidebilmektedir (Bar ve ark., 2007; Hongo ve ark., 2006; Sharma ve ark., 2006; Tosukhowon ve ark., 2005). Bu proteinler hem hücre içinde sentezlenen sitozol proteinleri hem de zar proteinleriyle birlikte hücre dışı bileşenleridir (Sharma ve ark., 2006; Schmidt ve ark., 2005).

1.9.6.1. Metal ve ağır metallerin sınıflandırılması

Ağır metal ve metaller metabolik fonksiyonlarındaki rollerine göre ikiye ayrılmaktadırlar. Bunlardan ilki esansiyal elementler diğer grubu ise Cd ve Hg gibi metallerin girdiği gereksiz metaller grubu olup hücrede herhangi bir fizyolojik görevleri olmayan ve düşük konsantrasyonlarda bile oldukça toksik olan metallerdir.

Mikroorganizmaların yaşamında metallerin bütünleyici bir rolü vardır. Kalsiyum, kobalt, bakır, krom, demir, potasyum, magnezyum, manganez, sodyum, nikel, çinko gibi bazı metaller esansiyeldir ve besinsel rolleri vardır. Gümüş, alüminyum, kadmiyum, altın, civa ve kurşun gibi metallerin ise biyolojik rolleri yoktur ve esansiyel değildirler. Esansiyel metaller; biyokimyasal reaksiyonları katalizlemek, protein yapısını ve bakteri hücre duvar yapısını stabilize etmek, osmotik dengeyi korumak, gen ekspresyonunu düzenlemek, biyomolekülleri aktive etmek, elektron alıcısı veya vericisi olarak enerji metabolizmasında önemli rol oynamaktadırlar (Bruins ve ark., 2000, Ehrlich 1997).

Demir, bakır, nikel gibi esansiyel geçiş metalleri redoks tepkimelerinde rol alırken, magnezyum ve çinko gibi esansiyel metaller elektrostatik güçleri sayesinde çeşitli enzimleri ve DNA'yı stabilize etmektedirler. Demir, nikel, magnezyum ve kobalt, düzenleyicilik görevi olan kompleks moleküllerin yapısında yer almaktadır. Potasyum ve sodyumun ise hücre içi osmotik basıncın düzenlenmesinde rolü vardır (Bruins ve ark., 2000).

Co^{+2} , Cu^{+2} , Ni^{+2} ve Zn^{+2} gibi esansiyel metal iyonlarının yüksek konsantrasyonu ve esansiyel olmayan metal iyonları mikroorganizmalar üzerinde toksik etki yaratmaktadır. Esansiyel olmayan metal iyonları, esansiyel metal iyonlarının bağlandığı doğal bağlanma bölgelerine bağlanarak veya ligandlar ile karşılıklı etkileşime girerek toksik etkilerini göstermektedirler. Bu tür metallerin, tiol (-SH) içeren gruplara veya oksijen bölgelerine olan affiniteleri, esansiyel metallerin affinitesinden daha yüksektir (Sandrin ve Maler 2003; Bruins ve ark., 2000; Silver 1998).

Metal iyonları yüksek konsantrasyonlarda canlı üzerine toksik etki de göstermektedir. Toksik etkileri arasında nükleik asitlerin ve proteinlerin yapısında değişikliklerin meydana gelmesi, oksidatif fosforilasyonu etkilemeleri ve osmotik dengenin bozulması sayılabilir (Bruins ve ark., 2000; Hassen 1998a;).

1.9.6.2. Ağır metal ve metallerin biyolojik bulunurluluğu, alım biyolojisi ve toksisitesi

Doğal ya da antropojenik kaynaklarla su ekosistemlerine giren ağır metaller, suda serbest iyon şeklinde veya inorganik ve organik anyonların çözülmüş kompleksleri şeklinde bulunmaktadır. Buna ek olarak çözünmemiş kompleks ya da organik

partiküller şeklinde de bulunabilmektedirler. Bunun sonucu olarak organizmalar ağır metallerin serbest iyon şeklinde olanlarını sudan doğrudan alırken ağır metallerin bazılarını besin zinciri yoluyla, bazılarını da sedimentten doğrudan aldıkları belirlenmiştir (Klerks ve Fraleigh, 1997; Hodson, 1988). Hücreler, metal iyonlarını hücre içine aktif ya da pasif taşıma ile hücre yüzeyi aracılığıyla almaktadırlar.

İlk aşamada ağır metal iyonları mikroorganizmanın dış yüzeyini teşkil eden hücre duvarı veya hücre zarında uygun bağlanma bölgelerinde bağlanarak tutulur. Bu pasif tutunma, biyolojik mekanizmadan bağımsızdır ve biyosorpsiyon olarak tanımlanır. Biyosorpsiyon biyolojik türleri oluşturan bileşikler ve metal türleri arasında meydana gelen fiziko-kimyasal etkileşimler sonucu gerçekleşir. K, Ca, Mg gibi A sınıfı metallere, oksijen bakımından zengin ligandlara (karboksil grupları gibi), B sınıfı metallere (Hg, Pb, Pt, Au gibi) sülfür ve nitrojen bakımından zengin ligandlara (amino asitler gibi) bağlanarak hücre içine alınırken Cd, Cu, Zn gibi geçiş metalleri, B sınıfı metalleri gibi davranarak hücre içine girerler (Niebor ve Richardson, 1980). Bu aşamada pasif birikim, adsorpsiyon, iyon değişimi, koordinasyon, kompleks oluşumu, şelat oluşturma ve mikro presipitasyon gibi prosesleri içerir.

Mikroorganizmaların canlı olması durumunda bazı ağır metal iyonları metal bağlayıcı proteinlere ya da diğer hücre içi bölgelere bağlanarak hücre içerisine girerler. Bu metal tutma biçimine hücre içi veya aktif yakalama adı verilir (Dönmez ve Aksu, 2002) Aktif ve pasif tutmanın her ikisinin birlikte gerçekleştiği durum, biyoakümülyasyondur. Bu nedenle ölü hücrelerle metal tutulmasında pasif tutulma; canlı hücreler ile metal tutulmasında ise pasif ve aktif tutulmanın her ikisi de söz konusudur (Shumate ve Strandberg, 1985).

Genelde ağır metal alım kapasiteleri çalışılan türe bağlı olarak önemli farklılıklar göstermektedirler. Divalent ağır metal iyonları için rapor edilen bu değerler; bakteriler için 0,05-0,2 mmol/g, mantar ve mayalar için 0,2-0,5 mmol/g, tatlı su algleri için 0,5-1,0 mmol/g ve deniz algleri için 1-1,5 mmol/g aralığındadır (Yu ve ark., 1998).

Kennish'in (1992) listesinde deniz flora ve faunası üzerine ağır metallerin göreceli toksisiteleri şöyle sıralanmıştır; Hg>Cd>Cu>Zn>Ni>Pb>Cr>Al>Co. Ağır metallerin biyolojik bulunurlulukları sedimentin katyon değiştirme kapasitesine, su ve sedimentin pH'sına, redoks potansiyeline, suyun sıcaklığına, tuzluluğuna, organik

içeriğine ve diğer ağır metallerin konsantrasyonuna bağlıdır (Ward, 1989; Wahbeh, 1984).

Ortamda bulunan ağır metal iyonları canlılar için oldukça toksiktir. Aşırı metal konsantrasyonları:

- Hücre membranının permabilitesini değiştirerek
- (-SH) sülfidril gruplarıyla reaksiyona girerek
- Fosfat grupları ve aktif ADP ya da ATP gruplarıyla reaksiyon affiniteleriyle
- Gerekli iyonlarla yer değiştirerek toksisiteye

neden olmaktadır (Patra ve ark., 2004). Sunda ve Huntsman (1998) ağır metallerin toksik etkilerinin genellikle, metabolik bölgelerdeki besin elementleri ile toksik metallerin yer değiştirmesi sonucu gerçekleştiğini bulmuşlardır. Metallerin toksik etkileri; metalin kimyasal formuna, biyolojik bulunurluğuna, alım yoluna, metalin aksiyon etkisine ve metabolizmasına, diğer metallere etkileşimine, metalin akut ve kronik etkisine, toksik etkisini göstereceği hedef bölgeye, hücre içi fizyolojik proseslere (solunum, fotosentez gibi) ve genetik adaptasyonlara bağlıdır.

Metallerin bu toksik etkilerine karşı gösterilen yanıt mekanizmaları;

- Özel olarak üretilen organik bileşiklerce metallerin depolanması
- Bazı hücre bölümlerindeki kompartmantalizasyonu
- Metal iyonlarının tekrardan dışarı atılmasıyla olmaktadır.

Metallothioneinler, ferritinler ve fitoşelatinler gibi canlı organizmalarda bulunan yapılar, metalleri bağlayarak metallerin hücreye vereceği zararlı etkileri önlemektedirler (Patra ve ark., 2004).

1.9.6.3. Ağır metal ve metallerin hücre içine alınması

Hücre yapısı üç temel kısımdan meydana gelir. Bunlardan hücreyi çevreleyen hücre dışı besin maddesi (ES), hücre zarı (HZ) ve hücre materyalidir (Hİ). Mikroorganizmalar bunun dışında hücreyi çevreleyen bir su sınır tabakasına da sahiptirler (Smith ve Vesilind, 1995).

Şekil 5’de; 1. yol ağır metal veya metal iyonunun mikroorganizmaya doğru ilk hareketini gösterir. Su sınır tabakasını geçen ağır metal, hücre dışı besin maddeleri ile etkileşecektir.

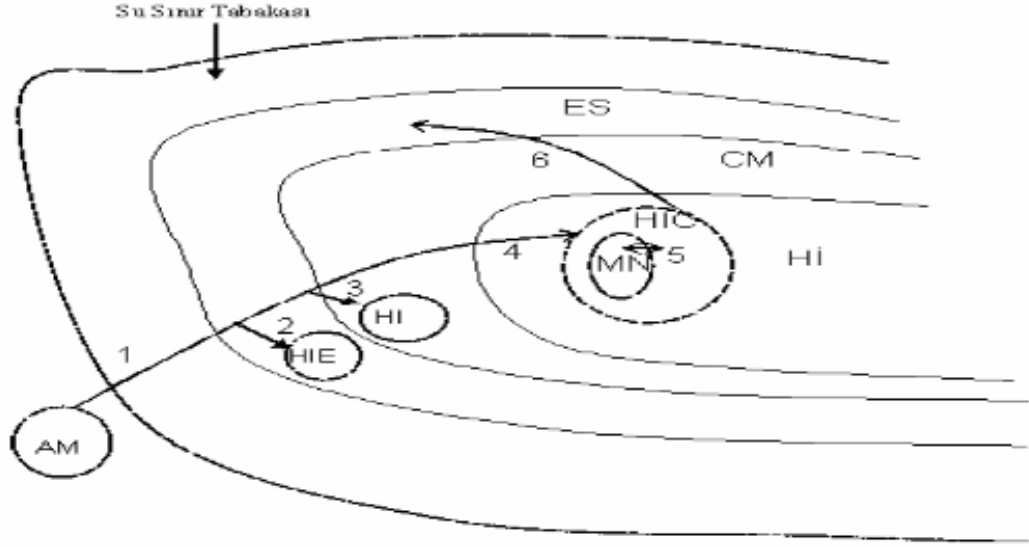
2. yol hücre dışı besin maddeleri tarafından alıkonulan metal ve ağır metalleri göstermektedir. Metal ve ağır metallerin hücre dışı besin maddeleri ile etkileşimi sonucu oluşan kompleks bileşikler çökelerek mikroorganizmanın etrafından uzaklaşır. Bunlar HIE ile sembolize edilmiştir.

3. yol hücre dışı besin maddelerinden geçen metal ve ağırmetal iyonları hücre zarı ile etkileşir. Bu etkileşim sonucu hücre yüzeyinde tutulan metal ve ağır metal ile hücre zarı etkileşimi HI ile temsil edilmektedir.

4. yol Karboksil, hidroksil, fosfat, amin ve amid gibi yüklü fonksiyonel gruplar hücre yüzeyi üzerinde ve hücre dışı besin maddeleri tarafından ağır metal ve metal iyonlarının tutulmasında önemli rol oynar (Gadd, 1988). Metal iyonlarının biyosorpsiyonu hücre dışı tutulma olan HI ve HIE yi içerir (Shumate ve Strandberg, 1985). Hücre içeriği tarafından metal ve ağır metallerin tutulması HIC ile belirtilir. Hücre zarından içeriye geçen metal ve ağır metaller ya hücre metabolizmasında kullanılır ya da hücre içinde bağlara tutunarak kompleks yapıda yer alırlar.

5. yol HIC ve MN (hücresinin metabolik olarak ihtiyaç duyduğu metal ve ağır metal miktarını temsil etmektedir) arasında metal iyonlarının dönüşümünü göstermektedir.

6. yol Bir mikroorganizmanın elektronegatifliğindeki dengesizliğe, hücre materyali tarafından tutulan metaller neden olur. Hücre, potasyum veya hidrojen iyonlarını bünyesinden dışarıya atarak bu dengesizliği ortadan kaldırmaya çalışır.



Şekil 5: Ağır metal ve metal iyonlarıyla mikroorganizmanın etkileşimi

Şekil 5’de AM(s); Ağır Metalleri, HIE; ES de alıkonan metalleri, HIM; Hücre zarı ile metallerin etkileşimini, HIC; Hücre materyali ile metallerin etkileşimini, Hİ; Hücre materyalini, MN; mikrobiyal metabolizma için gerekli ağır metali, EPS; hücre dışı besin maddeleri, HZ ise hücre zarını temsil etmektedir (Fuhrmann ve Rothstein, 1968).

1.10. Ağır Metallerin Krom İndirgemeye Etkisi

Na^+ ve Cu^{+2} metal iyonları *Pseudomonas* sp. G1DM21’de Cr(VI) redüktaz aktivitesini sırayla %16 ve %33 oranında teşvik ettiği tespit edilmiştir (Desai ve ark., 2008). Cu^{+2} nin kromat redüktaz aktivitesi üzerine teşvik edici etkisi *Bacillus* sp.ES 29 (Camargo ve ark., 2003b) ve *Pseudomad* CRB5 (Mclean ve Beveridge, 2001) suşlarında da görülmüştür. Ancak bu ağır metal varlığında *Enterobacter cloacea*’daki membrana bağlı kromat redüktaz aktivitesinin inhibe olduğu rapor edilmiştir (Ohtake ve ark., 1990). Bunun aksine Zn^{+2} , Ni^{+2} , Co^{+2} , ve Ba^{+2} gibi divalent katyonların redüktaz aktivitesi üzerine önemli bir etkisi bulunmamaktadır. Ek olarak; *Bacillus sphericus* AND303 suşunda Ni^{+2} ve Cu^{+2} metalleri redüktaz aktivitesi üzerine güçlü bir inhibe etki göstermiştir. *Ochrobactrum* sp. (Sultan ve Hasnain 2007), *Ochrobactrum intermedium* SDCr-5 (Sultan ve Hasnain 2007), *Bacillus* sp. (Elangovan ve ark., 2006) ve *E. coli* ATCC 33456 (Bae ve ark., 2005) suşlarında Zn^{+2} metal varlığında Cr(VI) indirgemesinin inhibe olduğu rapor edilmiştir.

Yapılan Cr(VI) indirgeme çalışmalarında Pb^{+2} ve Cd^{+2} metallerinin her ikisinin de sırasıyla %14 ve %25 oranında *Ochrobactrum intermedium* SDCr-5 suşu üzerinde indirgemeyi inhibe etkisi bulunmuştur. Aynı suşun Cu^{+2} , Co^{+2} , Mn^{+2} ve Ni^{+2} varlığında meydana gelen indirgemedede ise bir artışın olduğu belirlenmiştir (Sultan ve Hasnain 2007). Buna ilaveten *Bacillus sphaericus* AND 303 suşunda Cr(VI) redüktaz aktivitesi 100 μ M Ni^{+2} , Cu^{+2} ve Cd^{+2} varlığında % 70 oranında düşerken *B. Sphaericus* AND 303 suşunda 100 μ M Co^{+2} varlığında Cr(VI) redüktaz aktivitesi %7 oranında azalmıştır (Pal ve ark., 2005).

E. coli bakterisinde Zn^{+2} ve Cu^{+2} varlığında Cr(VI) indirgemesinin %16 ve %33 oranında azaldığı bulunmuştur. Ancak düşük konsantrasyonlar için aynı sonuçun geçerli olmadığı rapor edilmiştir (Shen ve Wang, 1994b). Başka bir çalışma da *B. Sphaericus* suşunda Cr(VI) indirgeme üzerine Ni^{+2} , Co^{+2} , Cd^{+2} ve Pb^{+2} 20 mg/ml'nin altındaki, 100 mg/ml 'nin üstündeki konsantrasyonlarda inhibe edici bir etkisinin olduğu tespit edilmiştir (Pal ve Paul, 2004)

Bacillus sp. ES 29 suşunun kromat redüktaz aktivitesinin, ortamda monovalent Na^{+} 'nin bulunması ile %26 oranında arttığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışma da Zn^{+2} 'nin kromat redüktaz aktivitesi üzerine teşvik edici veya inhibe edici herhangi bir etkisi bulunmazken Mn^{+2} ve Co^{+2} metallerinin az da olsa enzimi teşvik edici bir etkisinin olduğu rapor edilmiştir. *Bacillus* sp. ES 29 suşunun Cell Free ekstratlarında Cu^{+2} metalinin kromat redüktaz enzimini önemli derece de teşvik ettiği anlaşılmıştır. İlk kez Camargo ve ark. (2003b) *Bacillus* sp. ES 29 suşunun Cell Free ekstratlarında Cu^{+2} 'nin Cr (VI) indirgeme üzerinde teşvik edici bir etkisinin olduğunu söylemiştir. Oysaki çoğu çalışmada Cu^{+2} 'nin Cr(VI) indirgeme üzerine inhibe edici etkisi olduğu rapor edilmiştir.

Ohtake ve ark. Anaerobik şartlar altında membran ile ilişkili kromat redüktazın 0,5 mM Cu^{+2} varlığında %36 oranında inhibe olduğunu bulmuştur. Ancak aerobik şartlar altında 5-25 mM Cu^{+2} kromat redüktaz aktivitesi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını tespit etmiştir (Park ve ark., 2000; McLean ve Beveridge, 2001) McLean ve Beveridge 0,4 mM Cu^{+2} ilavesinde *Pseudomonad*'larda Cr(VI) indirgemesini az da olsa arttırdığını bulmuştur.

Cu^{+2} metalinin kromat redüktaz aktivitesini nasıl stimüle ettiği henüz tam olarak açıklanamamıştır. Ancak Cu^{+2} metali bir geçiş metalidir ve çoğu redüktaz enziminin

prostetik gurubunu oluşturmaktadır. Cu^{+2} 'nin temel fonksiyonu; ilgili trasport sistemini korumaktır. Bazı durumlarda da, tek elektron redoks merkezi gibi hareket ederek protein alt üniteleri arasında elektron transferinde görev almaktadır (Abe ve ark., 2001)

Diğer bir çalışmada yaklaşık 1mM Cu^{+2} 'nin mikroorganizmalar için toksik olabileceği düşünülürken, 1mM Cu^{+2} 'nin Cr(VI) indirgemesini arttırdığı rapor edilmiştir. Çünkü Cu^{+2} metalinin kromat redüktaz enzimini O^{+2} 'den koruduğu bulunmuştur (Ettinger, 1984).

34 tane kroma dirençli bakteriden oluşan bir grup ile yapılan Cr(VI) indirgeme deneyinde Ni^{+2} , Co^{+2} , Cd^{+2} ve Pb^{+2} gibi metal iyonlarının varlığında Cr(VI) indirgemesinin önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur. Bu çalışmada Ni^{+2} 20mg/L de çok toksik olduğu ve Co^{+2} ise yüksek konsantrasyonlarda Cr(VI) indirgemesini inhibe ettiği bulunmuştur (Pal ve Paul 2004).

Acinetobacter haemolyticus bakterisi ile yapılan Cr(VI) indirgeme çalışmasında 30mg/L Zn^{+2} ve Cd^{+2} varlığında Cr(VI) indirgemesinin %90 'dan daha fazla oranda Pb^{+2} ise %82,54 oranında azaldığı bulunmuştur (Zakaria ve ark., 2007).

1.11. Biyosorpsiyon

1.11.1. Biyosorpsiyon teorisi ve mekanizmaları

Biyosorpsiyon prosesinin mekanizmaları iyon değişimi, jelatinleşme, koordinasyon, kompleks oluşumu, adsorpsiyon ve mikropresipitasyondur. Bu mekanizmalar, biyokütle metabolik olarak inaktif iken ve fiziko-kimyasal metotlarla öldürülmüş bile olsalar meydana gelir. Prosesin gerçekleşmesi için gerek aktif membran taşınım mekanizmasına ve gerekse metabolik bir enerjiye ihtiyaç duyulmaz. Proseste fizikokimyasal süreçler baskındır (Guibal ve ark., 1992).

Canlı hücrelerle metallerin biyosorpsiyonunda hücre içi birikim ve hücre yüzey bileşiklerine metallerin bağlanması, iki temel mekanizma olarak bilinir. Hücre içi birikim veya metabolik prosesler, ortamdaki metallerin nispeten yüksek miktarlarının bir sonucudur. Bu proseslerin hızı yavaştır ve çoğu zaman çevresel şartlara ve besinlere bağlıdır. Yüzey ve hücre duvarlarına bağlanma ise pasif bir prosestir: Canlı ve ölü biyokütlenin her ikisi üzerinde de gerçekleşir. Metabolik olmayan yüzeysel bağlanma çok hızlıdır. Genelde birkaç dakikadan daha az bir sürede gerçekleşir. Bu

tip metal tutmada, hücre duvarlarında bulunan özel kimyasal bölgelerdeki iyon değişimi mekanizması baskındır (Şencan 2006).

Hücre yüzeyinde veya hücre duvarı üzerinde metal bağlama kapasitesine sahip özel bölgelerin bulunduğu bilinmektedir. Hücre öldüğü zaman hücre duvarları üzerinde daha fazla metal bağlama bölgeleri söz konusu olabilir. Bir biyolojik kütlede pek çok potansiyel bağlar içeren karboksilat, amin, fosfat, hidroksil, sülfidril ve diğer fonksiyonel gruplar mevcuttur. Amin, fosfat, sülfidril, karboksil veya hidroksil gruplarının metal iyonları adsorplaması için potansiyel adsorpsiyon bölgeleri oluşturdukları yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir (Gadd, 1990). Tobin ve ark.(1984), metal bağlanmasının değişik bölgelerde değişik oranlarda olduğunu ifade etmişlerdir. Her bir fonksiyonel grup farklı metalleri farklı oranlarda tutabilir. Biyoması oluşturan hücrelerin hücre zarı polimerik yapılar, protein, karbonhidrat, nükleik asit ve lipit içerir. Bu temel yapı elemanları bünyelerinde mevcut olan karboksilik, alifatik, aromatik ve amino gibi organik grupların ve hidroksil ve sülfat gibi inorganik grupların iyonlaşması sonucu negatif yüke sahip olurlar. Bux ve Kassan (1994), metal iyonlarının biyosorpsiyonu için temel itici gücün biyomasın sahip olduğu net negatif yükü olduğunu ve daha yüksek elektronegatifliğe sahip biyomasın ağır metaller için daha cezbedici ve uygun olduğunu ifade etmişlerdir. Bu yüzden pH değerleri bu fonksiyonel grupların performansını etkilemektedir. *R. Arrhizus* ile metal tutma çalışmalarında Tobin ve ark. (1984) pH 4'te aminlerin pozitif yüklü ve metal iyonları ile etkileşmediklerini gözlemişlerdir. pH 3'ün üzerinde olduğunda çoğu fosfat ve karboksilat grupları negatif yüklüdür ve bu gruplar pH 3'ün üzerinde metal bağlamaya katkı sağlarlar. Hidroksil ve amin grupları, metal iyonları ile zayıf bağlar yaparlar ve zayıf bazlardır (Zhang ve ark., 1998).

Özel kimyasal bağlanma bölgelerinde metal bağlanması, iyon değiştirme prosesi ile gerçekleşir. Diğer bir ifade ile iyon değişimi, metal tutmada önemli bir mekanizmadır. *Ganoderma lucidum* türü üzerinde bakır biyosorplama sırasında kalsiyum ve hidrojen iyonları çözeltiliye yayıldığı gözlenmiştir (Muraleedharan ve Venkobachar, 1994). Kapoor ve Viraraghavan (1998) *A. Niger* ile metal iyonlarının biyosorpsiyonunda ortama potasyum, kalsiyum, hidrojen ve magnezyum iyonları yayıldığını gözlemlemişlerdir. Bu olayın da iyon değiştirme mekanizmasının bir kanıtı olduğunu belirtmişlerdir.

Aktif çamur prosesi, pekçok endüstriyel ve evsel atıksuların arıtılmasında en çok kullanılan biyolojik süreçtir. Arıtma sırasında oluşan fazla çamur sistemden belli aralıklar ile atılır. Atılan bu çamur bol miktarda mikroorganizma içerir ve biyosorbent olarak kullanılması uygundur. Atıksu arıtma sistemlerinde oluşan aktif çamur, büyük ölçüde bakteri ve protozoa içerir. Bakterilerin hücre duvarlarında karboksil, asidik polisakkaritler, lipitler ve amino asitler gibi değişik organik bileşikler mevcuttur. Belirtildiği üzere bu organik maddeler ağır metallerin biyosorpsiyonunda etkin rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra aktif çamurdan izole edilen bazı bakteri türlerinin ağır metalleri yüksek düzeyde biyosorbe ettiği gözlemlenmiştir. Protozoalar ise nispeten büyük, hareketli ve tek hücreli gelişmiş canlılardır. Lipit ve protein içeren ince bir zara sahiptirler. Bu özelliklerinden dolayı biyosorpsiyon sürecinde görev alabilirler (Aksu ve ark., 2002).

Belirli tipteki mikrobiyal kütle, fiziksel veya kimyasal metotlar ile metabolik olarak aktif olmayan hale getirilse hatta hayatsal faaliyetleri durdurulsa bile ağır metalleri pasif olarak bağlayabilir veya biriktirebilir. Aktif olmayan veya ölü mikroorganizmalar kolay depolanabilir ve ağır metallerin toksik etkisinden etkilenmezler. Bu mikrobiyal kütle patojenik türleri ihtiva etse bile, hayatsal faaliyetleri durdurulduğu için sağlığa olabilecek olumsuz etkileri ortadan kaldırılmış olur. Bunun yanı sıra ilave nütriye ihtiyacı duymayacaklar ve kullandıkları prosesin kontrolü daha kolay olacaktır. Ölü veya aktif olmayan biyolojik kütle kullanıldığı biyosorpsiyon prosesleri kolayca yenilenebilmekte ve bu mikrobiyal materyal tekrar tekrar kullanılabilir. Ayrıca bazı durumlarda yüksek tutma kapasitesine sahip olurlar. Tüm bu avantajlarından dolayı, ölü veya aktif olmayan hale getirilmiş biyolojik kütle ağır metalleri çözeltilerden uzaklaştırmak, geri kazanmak ve konsantre hale getirmek için yüksek kapasiteli biyosorbent olarak değerlendirilirler (Brady ve ark., 1994b).

Tobin ve Roux (1998) bir deri sanayi atıksuyundan krom gidermek için atık *Mucor meih* biyomasını kullanmışlar ve pH 4 ve 2 değerlerinde biyosorpsiyon seviyesini 0.7 ve 1.15 mmol/g olarak gözlemişlerdir. Bu değerlerin deri endüstrisi atıksuyundan krom gideriminde ticari güçlü asidik iyon değiştirme reçinelerinin kullanılması ile elde edilen değere çok yakın olduğunu ifade etmişlerdir. Fourest ve ark. (1994), *Rhizopus arrhizus*, *Mucor miehei* ve *Penicillium chrysogenum* gibi ölü biyomasın

Zn⁺², Cd⁺², Ni⁺², Pb⁺², Cr⁺⁶, Ag⁺² metal iyonlarına karşı bir yatkınlığının olduğunu ifade etmişlerdir.

Tobin ve Roux (1998), *Mucor meihi* ile krom biyosorpsiyonunda Langmuir modelini kullandıklarında biyosorpsiyon verileri doğrusal olmayan bir grafik meydana getirmiştir. Grafiğin doğrusal olmaması, çok tabaka içeren, interaktif veya çoklu bağlanma bölgesi veya bu olayların kombinasyonunu içeren kompleks bir adsorpsiyon prosesinin göstergesidir.

Aktif olmayan ve ölü biyokütle canlı biyomasın ön işlemden geçirilmesi ile elde edilebilir. Fiziksel muamele seçenekleri hava veya buz ile kurutmak, kaynatmak, otoklavda bekletmek ve mekanik olarak karıştırmaktır. Kimyasal işlemler organik ve inorganik bileşiklerin kullanılması ile yapılabilir. Ön işlem biokütlenin metal giderim kapasitesini artırır ve biyosorpsiyonun özelliğini değiştirir (Siegel ve ark., 1990).

1.12. *Pseudomonas* Cinsinin Genel Özellikleri

Pseudomonas cinsi, *Pseudomonadaceae* ailesine ait olup, düz veya hafif kıvrık çubuk şeklindedir. Uzunlukları 1,5-5,0 µm, genişlikleri 0,5-1,0 µm arasındadır. Hareket, bir veya birkaç polar flagella ile sağlanır, bazı türleri farklı uzunlukta lateral flagellaya sahiptir, nadiren hareketsizdirler. Polar flagellaların sayısı önemli bir taksonomik karakterdir. Gram-negatif ve zorunlu aerobik bakterilerdir. Fakat bazı türleri nitratın varlığında anaerobik olarak gelişirler. Oksidaz pozitif veya negatif, katalaz pozitiflerdir (Sneath, 1986; Collier ve ark., 1998; Jamir ve ark., 2004).

Pigmentasyon, *Pseudomonas* cinsinin genel bir karakteridir, ancak pigment oluşturmayan türlere de sahiptir. Bazı türleri ayırt edici koloni morfolojisi gösterirler (Murray ve ark., 1995). Bazı türleri 4°C'de gelişebilir, ancak çoğu 30-37 °C arası optimal gelişim sıcaklığına sahip mezofilik bakterilerdir. Bir çok türü, asidik şartlarda gelişemezler(Sneath, 1986).

Bir çok *Pseudomonas* türü amonyum tuzlarının ve tek bir karbon kaynağının bulunduğu ortamlarda gelişebilirler. Sadece birkaç tür organik gelişim faktörlerine ihtiyaç duyar. Kemoorganotrofiklerdir, fakat bazı türleri ototrofik şartlar altında da gelişebilir. Hiç bir türü fermentatif ve fotosentetik değildir(Collier ve ark., 1998).

Çok güçlü metabolizmaları bulunan *Pseudomonas* cinsi bakterilerin çoğunun direkt izolasyonu yapılabilmektedir. Bunda doğada özellikle havada, toprakta ve sularda

yaygın bulunmaları büyük rol oynar. Cins üyelerinin bir kısmı bitkiler, hayvanlar ve insanlar üzerinde patojenik özellikler gösterirler. Özellikle memeli hayvan ve insanların bağırsağında az sayıda bulunan *Pseudomonas aeruginosa* son zamanlarda fırsatçı bir patojen olarak kabul edilmektedir (Tortora, 1991). *P. aeruginosa*'nın patojenliği insanda çeşitli enfeksiyonlara neden olan virülens faktörlerinden kaynaklanmaktadır. Bu virülens faktörlerden bazıları ekzotoksin A, fosfolipaz C, proteaz, pili, ekzopolisakkarit kapsül, pigmentler ve ramnolipidlerdir (Asthana ve ark.,1997). Bu virülens faktörlerden ekzopolisakkarit kapsül, pigmentler ve ramnolipidler *Pseudomonas*' lar tarafından üretilen sekonder metabolitler olarak adlandırılmaktadırlar (Norman, 2004; Demain, 1999). Bu metabolitler *Pseudomonas*' ların hayatta kalmalarını ve diğer bakterilerle rekabet etmelerini sağlamaktadır. Örneğin, suda çözünebilen bir sekonder metabolit olan piyosyanin, çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Norman, 2004). *Pseudomonas* bakterileri genetik çalışmalarda özel bir ilgiye sahiptir. Bunun nedenleri, geniş bir yayılım alanına, medikal öneme, beslenme ve biyokimyasal çok yönlülüğe sahip olmaları ile laboratuvar ortamlarında geliştirilebilmeleri için gerekli şartların basit olmasıdır (Tortora, 1991). Genetik araştırmalar yönünden *P. aeruginosa* PAO1 suşu oldukça detaylı çalışılmıştır ve bu suşun genom dizisi belirlenmiştir. Bakterinin genom büyüklüğünün 6 264 403 bp olduğu belirlenmiştir (Mandelbaum ve ark., 1995).

Bir çok organik bileşik *Pseudomonas* türleri tarafından mineralize edilebilir. Bu bakteriler bu bileşikleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanırlar. Buna bağlı olarak *Pseudomonas* türleri, biyoremediasyonunda kullanım potansiyeline sahiptir (Essar ve ark., 1990).

1.12.1. Habitatları

Pseudomonas'lar toprak, su ve çürümekte olan organik maddelerde bulunan mikroorganizmalardır. Bu ortamlar dışında sulak alanlarda yetiştirilen tarım ürünlerinde, lağım çukurlarında, tuvaletlerde, hastane ortamı ve hastanelerde kullanılan temizlik maddelerinde, solunum ve diyaliz cihazlarında ve hatta dezenfeksiyon solüsyonlarında bile bulunurlar (Carson ve ark., 1973).

Yapılan çalışmalarda nehir suyundan *Pseudomonas spinosa*, distile sudan *Pseudomonas huttiensis*, *Pseudomonas cepacia* ve *Pseudomonas lanceolata* türleri izole edilmiştir (Carson ve ark.,1973; Vachee ve ark., 1997).

Çeşitli bitkilerden de izole edilen *Pseudomonas* türleri bulunmaktadır. Çavdar, zeytin, fasulye, leylak, patates ve şeker pancarından *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringae* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşları izole edilmiştir (Hirano ve Upper 2000).

Ayrıca deniz kaplumbağasının (*Caretta caretta* L.) derisinden *Pseudomonas fluorescens* izole edilmiştir (Cabanes ve ark., 1997). Sadhukhan ve ark. (1997), balık solungacından ve midesinden *Pseudomonas* türleri izole etmişler ve bakterinin HgCl₂'ye dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

Pseudomonas'ların geniş bir yayılım göstermeleri çok basit gelişim ihtiyaçlarına gereksinim duymalarındandır. Minimal besin varlığında 4-43°C gibi geniş bir sıcaklık aralığında gelişebilirler. Cinsin bir çok türünün gelişme gösterdiği optimum sıcaklık 30°C'dir. Türlerin tamamı nötral veya alkali pH (7.0-8.5) aralığında daha iyi gelişmektedir (Cowan ve ark., 1974).

1.12.2. Morfolojisi ve hücre yapısı

0,5-1,0×1,5-5,0 µm boyutunda düz veya hafif eğimli basillerdir. *Pseudomonas* suşlarının, mikroskopik görünümleri nadiren büyük ve şekil olarak normalden çok farklı olabilirler. Bazı türlerin hücreleri oval şekilli olabilirken bazı bitki patojenlerinin hücreleri 4 µm'den daha uzundurlar. Sahip oldukları bir veya birden fazla polar flagella ile hareket ederler. Hareket için gerekli olan enerjiyi aerobik metabolizmadan sağlarlar. Nadiren hareketsiz olan *Pseudomonas* suşları da mevcuttur (Cowan ve ark., 1974).

1.12.3. Pigmentasyon

Pigmentasyon, bakteriler tarafından renkli koloni üretimi veya besiyeri yüzeyine pigment salgılanması olup pigment üreten *Pseudomonas* türlerinin ayrımında kullanılan önemli bir özelliktir (Keskin ve Ekmekçi, 2003). *Pseudomonas*'lar tarafından üretilen pigmentlerin antibiyotik ve bakteriyosin özelliğine sahip olduğu belirtilmiştir (Vachee ve ark., 1997). Bakteriyel pigmentler sekonder metabolitlerden olup, optimum şartları çok değişken olmakla birlikte, gelişme sıcaklığı, ortamı ve

besiyeri içeriklerine bağlı olarak farklı renklerde oluştururlar (Kanner ve ark., 1978). Hassen ve ark. (1998b), çalışmalarında kullandıkları *Pseudomonas* cinsine ait türlerin, çinko varlığında piyoverdin pigmentini daha fazla sentezlediklerini ve çinkonun pigment üretimini arttırdığını göstermişlerdir (Hassen ve ark., 1998b).

Pseudomonas aeruginosa, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. syringae*, *P. cichorii* gibi türler, düşük demir içerikli besiyerlerinde bol miktarda fluoresans pigmentleri üretmektedirler (Meyer ve Hohnadel 1990, Vachee ve ark., 1997). Günümüzde King A (*Pseudomonas* Agar F) ve King B (*Pseudomonas* Agar P) gibi spesifik besiyerleri kullanılarak *Pseudomonas* cinsine ait türlerinin fluoresans pigmentleri üretilip üretilmediği tespit edilebilmektedir (Vachee ve ark., 1997, Keskin ve Ekmekçi 2003). *P. fluorescens*'in King B besi ortamında fluoresin ürettiği bildirilmiştir (Baumann ve ark., 1972).

Fenazinler *Pseudomonas*'ların suda çözünebilir pigmentleridir. Suda çözünen pigmentler içinde en çok bilinenleri piyoverdin ve piyocyanindir. Diğer fenazin pigmenti ise, özellikle *P. chlororaphis* için karakteristik olan, suda diğer pigmentlere kıyasla daha az çözünebilir ve koloni etrafında kristalize olma özelliğine sahip yeşil bir pigment olan klororafin (chlororaphin)dir (Kanner ve ark., 1978).

Lemonnierin *P. lemonnierin* suşu için karakterize olan hücre içinde bulunan çözünmeyen bir pigmenttir (Fuller ve Mellows 1971).

Karotenoidler genellikle sarı veya turuncu renkli, suda çözünmeyen ve *P. alcaligenes*, *P. mendocina*, *P. versicularis*, *P. flava*, *P. pseudoflava*, *P. palleronii*, *P. rhodos*, *P. echinoides*, *P. radora* gibi birçok tür tarafından üretilen pigmentlerdir (Fuller ve Mellows 1971).

Yaşlı *Pseudomonas* kültürlerinde (10 günlük) melanin pigmentlerinin üretildiği de tespit edilmiştir (Hassen ve ark., 1998b).

1.12.4. Gelişme ortamları ve fizyolojik özellikleri

Pseudomonas'ların birçok türü amonyum iyonları veya nitrat ile enerji veya karbon kaynağı olarak tek bir organik madde içeren çok basit mineral besiyerlerinde gelişebilmektedir (Baumann ve ark., 1972). Virülans faktörü olarak hemolizine sahip olan *P. aeruginosa* suşları kanlı besiyerlerinde hemoliz oluştururlar. Glukoz ve bazı karbohidratları oksidasyon yolu ile parçalayıp asit oluştururlar. Laktoz ve sukroza

etki etmezler. İndol ve H₂S oluşturmazlar. Metil kırmızısı ve Voges proskauer testleri negatiftir. Kemoorganotrofik türleri fakültatif kemolitotrof olup enerji kaynağı olarak hidrojen ve karbonmonoksiti kullanabilirler. Çoğunluğu aerobik olup bazı türleri nitratı kullanarak anaerobik olarak gelişebilir. Üreyi amonyak haline ya da amonyağı üreye çevirebilirler ve bunları azot kaynağı olarak kullanabilirler. Çoğu asidik ortamlarda gelişemezler. Oksidaz pozitif veya negatif olabilirler. Katalaz pozitif olup lizin ve ornitini dekarboksile etmezler. *Pseudomonas* türlerinin tek karbon kaynağı içeren basit besiyerlerinde gelişebilme yetenekleri karakterizasyon yapılması için temel oluşturmaktadır. Bu organik bileşiklerin sayı ve tiplerinin değiştirilmesi ile gelişmeyi sağlayan bileşikler tespit edilerek, sabit kimyasal içerikli besiyerlerine bu bileşiklerin ilavesi ile izole edilen türlerin tanımlanmasına önemli katkılar sağlanmıştır (Cowan ve ark., 1974).

1.12.5. Plazmid DNA

Pseudomonas'lar antibiyotiklere, metallere, antibakteriyel ajanlara, bakteriofajlara, bakteriosinlere, fiziksel ajanlara karşı dirençlilik sağlayan ve farklı metabolik özellik kazandıran, plazmidlerce taşınan genler bakımından oldukça zengindirler. Plazmidlerin bazıları gelişme şartlarında rol alırken, bazıları çeşitli ajanlara (R plazmidleri) karşı dirençliliğe, bazıları daha önce kullanılmamış karbon kaynaklarını kullanabilme kapasitesine etki ederler (Bruins ve ark., 2003). Böylece bu cinsin üyelerine çok yönlü fayda sağlamış olur. Son zamanlarda *Pseudomonas* cinsine ait birçok plazmid yapısı açıklanmıştır. En iyi bilineni bazı *P. putida* suşlarında bulunan TOL adındaki katabolik plazmid olup toluen, ksilen ve benzer aromatik bileşikler varlığında gelişme yeteneğini kodlamaktadır (Silver, 1992).

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Materyal örnekleri

Bu çalışmada Pamukkale Üniversitesi Bakteriyoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonundan temin edilen bakteriler kullanılmıştır. Bakterilerin kodları ve izolasyon kaynakları Tablo 4’de verilmiştir

Tablo 4: Bakterilerin kodları ve izole edildiği kaynaklar

Suş kodu	Bakteri Adı	İzolasyon kaynağı
P1	<i>Pseudomonas sp.</i>	Aliğa Petrol Rafinerisi /İzmir Toprak
P8	<i>Chryseomonas luteola</i>	Aliğa Petrol Rafinerisi /İzmir Su
P14	<i>Pseudomonas sp.</i>	Karagöl / Denizli Toprak
P15	<i>Chryseomonas luteola</i>	Karagöl / Denizli Toprak
P18	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Aritım Tesisi / Denizli Su
P22	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aritım Tesisi / Denizli Su
P27	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Güzelköy / Denizli Su
P37	<i>Chryseomonas luteola</i>	Sığma / Denizli Toprak
P39	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Korucuk / Denizli Su
P43	<i>Pseudomonas putida</i>	Zeytinyağı Fabrikası / Aydın Toprak
P44	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Zeytinyağı Fabrikası / Aydın Toprak
P46	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Zeytinyağı Fabrikası / Aydın Toprak
P52	<i>Pseudomonas sp.</i>	Zeytinyağı Fabrikası / Aydın Toprak

2.1.2. Araştırmada kullanılan besiyerleri ve kimyasallar

Nutrient Broth (NB) (Merck)

- Peptone 5 g
- Yeast extract 2 g
- Meat extract 1 g
- Sodyum klorür 5 g
- Distile su 1000 ml

Maddeler 1 litre distile su içerisine ilave edilmiştir. Besiyerinin pH değeri $7,0\pm 0,2$ 'ye 6 N HCl ve 6 N NaOH ile ayarlanmıştır. Besiyeri 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Tryptic Soy Broth (TSB) (BBL-TM,Merck, Fluka)

- Pepton from casein 17 g
- Pepton from soymeal 3 g
- D(+) glucose 2,5 g
- Sodyum klorür 5 g
- Di-Potassium hydrogen phosphate 2,5 g
- Distile su 1000 ml

Maddeler 1 litre distile su içerisine ilave edilmiştir. Besiyerinin pH değeri $7,0\pm 0,2$ 'ye 6 N HCl ve 6 N NaOH ile ayarlanmıştır. Besiyeri 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Luria Bertani (LB)

- Tripton 10 g
- Yeast extract 5 g
- Sodyum klorür 10 g
- Distile su 1000 ml

Maddeler 1 litre distile su içerisine ilave edilmiştir. Besiyerinin pH değeri $7,0\pm 0,2$ 'ye 6 N HCl ve 6 N NaOH ile ayarlanmıştır. Besiyeri 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Tryptic Soy Agar (TSA) (Merck, Biolife)

- Pancreatic Digest of Casein 15 g
- Soy Pepton 5 g
- Sodium Chloride 5 g
- Agar 15 g
- Distile su 1000 ml

Maddeler 1 litre distile su içerisinde ilave edilmiştir. Besiyerinin pH değeri $7,0\pm 0,2$ 'ye 6 N HCl ve 6 N NaOH ile ayarlanmıştır. Besiyeri $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. İzole edilen suşlar, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika sterilize edilmiş TSA içeren tüplerde $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

Potasyum Dikromat Çözeltisi (1000 ppm) ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) (Merck)

- Potasyum dikromat 0,2829 g
- Distile su 100 ml

1000 mg/L Cr (VI) stok çözeltisi distile suda hazırlanarak $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika steril edilmiştir. Bunun için 100 ml distile suda 0,2829 g $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ olacak şekilde tartım yapılmıştır. Çözeltinin pH değeri 6 N NaOH ile $7\pm 0,1$ 'ye ayarlanmıştır. Steril stok çözeltisi renkli şişede $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında maksimum 1 ay tutulmuştur. Arzu edilen Cr çözeltilerini içeren besiyerlerini hazırlamada, steril stok Cr (VI) kullanılmıştır.

Difenil-karbazid (DPC) (Merck)

- DPC 0,5 g
- Aseton 100 ml

Belirtilen miktarlarda difenil karbazit asetonda çözülür, $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de renkli şişelerde 1 hafta saklanır.

%10'luk Sülfirik asit Çözeltisi (H₂SO₄) (Merck)

- H₂SO₄ 10 ml
- Distile su 90 ml

10 ml Sülfirik asit ölçülür, 100 ml distile suya tamamlanır. Renkli şişede muhafaza edilir.

NaHCO₃ Tanponu

- NaHCO₃ 0,05 g
- Distile su 1000 ml

5,86x10⁻⁴ M olacak şekilde 0,05 g NaHCO₃ tartılır ve 1000 ml distile su içerisinde çözülerek hazırlanır. +4 ° C'de 1 ay saklanabilir. Bu tanpon pH 6 ve 7 için kullanılmıştır.

NH₃-NH₄ Tanponu

- 8.00 ml NH₃
- 107 g NH₄Cl

Yukarıda belirtilen miktarlara uyarak çalışılacak pH değerine ayarlanır. pH 7.5, 8, 8.5, 9 ve 9.5 için bu tanpon kullanılmıştır.

SDS-PAGE İÇİN KULLANILAN STOK ÇÖZELTİLER

Akrilamid + N, N' – Metilen Bis Akrilamid Stoğu (%30'luk)

- Akrilamid (Sigma) 28,8 g
- Bis akrilamid (Sigma) 1,2 g

Maddeler 75 ml distile su içerisinde çözülerek, 100 ml'ye tamamlanır. Whatman No: 1 filtre kağıdından süzülerek, renkli cam şişelerde +4°C'de en fazla 1 ay muhafaza edilir.

Ayırma Jel Tamponu (1,5 M Tris-HCl, pH: 8,6)

- Trizma base (Sigma) 18,165 g
- SDS (Sigma) 0,4 g

Maddeler, 75 ml distile suda çözüldükten sonra 6 N HCl ile pH=8,6'ya ayarlanır. Son hacim 100 ml'ye saf su ile tamamlandıktan sonra 121°C'de 15 dk. Sterilize edilir ve +4°C'de saklanır.

Yığıma Jel Tamponu (0,5 M Tris-HCl, pH: 6,8)

- Trizma base 6,05 g
- SDS 0,4 g

Maddeler 75 ml distile suda çözüldükten sonra 6 N HCl ile pH=6,8'e ayarlanır. Son hacim 100 ml'ye saf su ile tamamlandıktan sonra 121°C'de 15 dk. Sterilize edilir ve +4°C'de saklanır.

Koşturma Tamponu(5X)

- Trizma base 1,21
- Glisin 5,76
- SDS 1,0

Maddeler 1000 ml distile suda çözülür.

Örnek Tamponu (2X)

- 1 M Tris-HCl, pH=7,6 2 ml
- Gliserol 3 ml
- SDS 0,5 g
- 2-β ME 2,0 ml
- Bromofenol blue 4 mg

Karışımın hacmi 10 ml'ye tamamlanır. 6 N HCl ile pH=6,8'e ayarlanır. Çözelti renkli cam şişede oda sıcaklığında saklanır.

Boyama Çözeltisi

- Coomassie Brilliant Blue R250 1,5 g
- Glasiyal Asetik Asit 70,0 ml
- Metanol 50,0 ml
- Distile su 880,0 ml

Boya çözüldükten sonra Whatman No:1 filtre kağıdından süzülür ve renkli cam şişede oda sıcaklığında saklanır.

Boya Giderici Çözelti

70 ml Glasiyal asetik asit, 50 ml Metanol ve 880 ml Distile su karıştırılarak hazırlanan çözelti oda sıcaklığında renkli cam şişede saklanır.

Moleküler Ağırlık Standardı

Proteinlerin moleküler ağırlıklarını hesaplamak için molekül ağırlıkları sırasıyla 200,150, 120, 100, 85, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10 kDa olan MBI Fermentas SM0661 kiti kullanıldı.

Ayırma Jelin Hazırlanışı

- Akrilamid/Bis Akrilamid (%30'luk) 5,78 ml
- Distile su 7,13 ml
- 1,5 M Tris-HCl pH=8,6 4,33 ml
- % 10'luk APS 86,70 µl
- TEMED 8,16 µl

Maddeler 1 mm aralığa sahip iki cam arasına dökülür, üst kısım doymuş butanol veya saf su ile kaplanarak hava ile teması önlenir ve polimerize olması için beklenir.

Yığılma Jelin Hazırlanışı

- Akrilamid/Bis Akrilamid (%30'luk) 0,82 ml
- Distile su 2,93 ml
- 0,5 M Tris-HCl pH=6,8 1,25 ml
- % 10'luk APS 30,00 µl
- TEMED 5,00 µl

Bu karışım, polimerize olan ayırma jelin üzerindeki distile su uzaklaştırıldıktan ve tarak yerleştirildikten sonra dökülür. Jel polimerize olduktan sonra tarak çıkarılır, kuyular koşturma tamponu ile yıkandıktan sonra tanka sabitlenir ve hazne koşturma tamponu ile doldurulur.

2.2. Metot

2.2.1. Besi ortamı belirlenmesi

İzolatların geliştikleri en iyi besi ortamını belirlemek için NB, TSB ve LB besi ortamları kullanılmıştır. Her üç besi ortamına da %2'lik bakteri ekimi yapılmış ve 37 °C de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücre yoğunluklarını belirlemek için spektrofotometrede 600 nm'de ölçüm yapılmıştır. Ölçüm sonunda en yüksek OD'ye sahip olan besiyeri bundan sonraki krom indirgeme deneylerinde kullanılmıştır.

2.2.2. Bakteri tiplendirmesi

Sekans analizi REFGEN (Ankara)'e yaptırılmıştır. Analize gönderilecek izolatlar, 37 °C'de 24 saat TSB besi ortamında geliştirilmiş ve sonrasında petri ekimleri yapılarak tür düzeyinde tiplendirilmelerinin yapılması için 16S rRNA sekans analizine gönderilmiştir.

2.2.3. Bakterilerin hekzavalent krom dirençliliğinin belirlenmesi

Bakterilerin krom dirençliliği, Minimum İnhibisyon Konsantrasyonuna (MİK) göre belirlenmiştir. Krom konsantrasyonu 10-500 ppm aralığında tutularak toplam hacim 5 ml olacak şekilde broth dilusyon yöntemi kullanılmıştır. MİK deneyleri üç tekrarlı yapılmıştır.

2.2.4. Bakterilerin krom indirgemesi

Kesikli krom (VI) indirgeme çalışmalarında, *Pseudomonas mendocina* PASS3 –P18 ve *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX-P22 suşları TSB besiyerinde 37 °C'de geliştirilmişlerdir. Bakteriler, steril Cr(VI) stok çözeltisinden 100 mg/L olacak şekilde krom içeren besiyerlerinde geliştirilerek bakterilerin krom indirgeme özellikleri belirlenmiştir. Sabit pH'da (7±0,2) yapılan deneylerde indirgenme reaksiyonu ile birlikte pH'da meydana gelen değişimleri sabitlemek için NaHCO₃ tamponu (0,11 mM) kullanılmıştır.

2.2.5. Analitik metot

Krom indirgeme çalışması için geliştirilen bakteri kültürlerinden, belli aralıklarla (6 ve/veya 12 saat) steril pipet yardımı ile alınan örnekleri 6000 x g'de 20 dakika santrifuj edilmiştir. Elde edilen örneklerin Cr(VI) içerikleri UV spektrofotometrede

(UV Lange DR5000) 540 nm'de difenilkarbazid kullanılarak kolorimetrik olarak belirlenmiş ve örnekteki Cr(VI) miktarı ise standart Cr(VI) değeri ile karşılaştırılarak tespit edilmiştir (APHA, 1995). Standart eğrinin çıkarılması için 1×10^{-5} ile 3×10^{-7} arasındaki konsantrasyonlarda dilüsyon tüpleri hazırlanmıştır. R^2 değeri 0.99'un altındaki değerler kabul edilmemiştir.

2.2.6. pH'nın etkisi

Krom indirgemesine pH'nın etkisini belirlemek için, 6 N HCl ve NaOH ile pH 6.0, 7.0, 7.5, 8.5, 9.0, 9.5'a ayarlanmış olan TSB besi ortamlarına pH 6.0 ve 7.0 için NaHCO_3 , pH 7.5, 8, 8.5, 9.0 ve 9.5 için $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ tamponları ilave edilerek hazırlanmıştır.

2.2.7. Metal ve ağır metallerin etkisi

Farklı metal ve ağır metallerin indirgemeye olan etkisini belirlemek için Mn^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Ba^{+2} , Al^{+2} , Ni^{+2} , Co^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} , Pb^{+2} 'nin saf suda çözünebilen konsantrasyonları dikkate alınmıştır. Son hacim 100 ml olacak şekilde ilgili besi ortamlarına Cr(VI) ile birlikte ilave edilmişlerdir. Tampon ile pH ayarlaması yapılarak 37 °C'de inkübe edilen kültürdeki krom miktarı, belli inkübasyon aralıklarında alınan örneklerden difenilkarbazid-sülfürik asit metoduna göre spektrofotometrede 540 nm'de ölçüm yapılarak hesaplanmıştır.

2.2.8. Başlangıç krom konsantrasyonunun indirgemeye etkisi

Farklı krom konsantrasyonunun indirgemeye olan etkisini belirlemek amacıyla besiyerine başlangıç krom konsantrasyonları stok Cr(VI) solüsyonundan *Pseudomonas mendocina* PASS3 –P18 bakterisi için 30 ve 50 ppm, *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisi için 15 ve 25 ppm olacak şekilde ilave edilmiştir.

2.2.9. Biyosorpsiyon

Pseudomonas mendocina DS0601-FX-P22 ve *Pseudomonas mendocina* PASS3 – P18 bakterileri 1000 ml'lik TSB besi ortamında 24 saatlik inkübasyondan sonra, 6000 rpm +4 °C'de 20 dakika sanrüfuj edilmiştir. Elde edilen pelet, Pastör fırınında antiseptik koşullarda 12-16 saat 120 °C'de kurutulmuştur. Biyokütle miktarı ölçülerek 1gr/L olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki (P18 bakterisi için 30 ve

50, P22 bakterisi için 15 ve 25 ppm) 100 ml'lik Cr(VI) çözeltilerine ilave edilmiştir. Örnekler 37 °C'de inkübasyona bırakılarak, belirli aralıklarla difenilkarbazid metoduna göre krom konsantrasyonu belirlenmiştir.

2.2.10. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

2.2.10.1. Kromat redüktaz enziminin indüklenmesi

Krom varlığında, krom redüktazın indüklenip indüklenmediğini belirlemek için bakteriler farklı krom konsantrasyonlarında (P18 bakterisi için 30, 50, 80, 110 ppm ve P22 bakterisi için 10, 15, 20, 25 ppm) ve kontrol grubu olarak krom içermeyen besiortamında geliştirilmiştir. Hücrelerin periplazmik fraksiyonlarının protein profillerini karşılaştırmak için, konsantre periplazmik fraksiyonlar 100 µl örnek dilüsyon tamponunda süspansiyon edilmiştir (0,0625 M Tris, pH=6.8; %2 SDS, %10 Gliserol, %5 β-merkaptetanol ve %0,001'lik bromo fenol blue). Kaynatılan örnekler Laemmli (1970)'nin metoduna göre SDS-PAGE(Biolab 20X20,5)'de yürütülmüştür.

Bakterilerden periplazmik fraksiyon elde etmek için osmotik şok metodu kullanılmıştır (Poole ve Hancock, 1984; Ganguli ve Tripathi, 2001). Bunun için bir gecelik kültürler 10000g'de (7000 rpm) 4°C'de 10 dakika santrifüj edilerek toplanmıştır. Pellet 8 ml 0,05 M Tris HCl (pH=7,3), 0,2 M MgCl₂ ile süspansiyon edilip 10 dk 30°C'de inkübe edilmiştir. Soğuk su banyosunda soğutulan örnekler tekrar 10 dk 30 C'de ısıtılmıştır. Buz banyosunda soğutulan ve periplazmik proteinleri içeren süpernetant, filtrelili santrifüj tüpü ile (Amnicon MW 10 000 Da) konsantre edilmiştir. Ortamdaki MgCl₂'ü uzaklaştırmak için 0,05 M HCl pH: 7.3'e karşı diyaliz uygulanmıştır.

2.2.10.2. Poliakrilamid jel elektroforezinin yapılışı

Elektroforez işlemi Laemmli (1970)'ye göre yapılmıştır.

2.2.10.3. Protein elektroforezin yapılışı ve jellerin boyanması

Proteinler Yığılma Jel ve Ayırma Jelde 200 V'ta ortalama 5 saat koşturulur. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jeller, Coomassie Brilliant Blue R-250 içinde 24 saat bekletilerek boyanır. Daha sonra boya giderici solusyonda bırakılarak jellerin zemininde bulunan boyanın uzaklaştırılması sağlanır. Jeller, %7'lik Asetik asit içerisinde saklanır.

2.2.10.4. Proteinlerin moleküler ağırlıklarının hesaplanması

Ayırma jelde proteinin koştığı mesafenin izleme boyasının bulunduğu mesafeye oranı bize Rf değerini verir. Molekül ağırlıklarını bildiğimiz standart proteinlerin her birinin Rf değeri bulunur. Yarı logaritmik kağıtta Rf değeri apsisine, proteinlerin moleküler ağırlıkları da ordinata konarak bir doğru çizilir. Daha sonra moleküler ağırlığı hesaplanacak proteinin moleküler ağırlığı da hesaplanır.

2.2.10.5. Scanning elektron mikroskop ile görüntüleme

P.mendocina PASS3-P18 bakterisinin kromlu ve kromsuz ortamda SEM resimleri Akdeniz Üniversitesi TEMGA birimine çektirilmiştir. SEM için 110ppm Cr(VI) içeren ve içermeyen 50ml'lik TSB besi ortamları hazırlanmış ve bu besi ortamına %2'lik ekim yapılarak 37°C, 125rpm'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen kültürler polilizin kaplı lamlara yayılarak SEM takibi için aşağıdaki prosedür sırayla uygulanmıştır.

- %2,5 luk Gluteraldehit (2 saat, +4°C)
- 0,1 M lik Sorenson fosfat tamponu (10 dakikaX3, oda ısısı rotator)
- % 0,1 Osmiyum Tetroxide (2 saat, oda ısısı rotator)
- 0,1 M lik Sorenson fosfat tamponu (10 dakikaX3, oda ısısı rotator)
- % 30 Etanol (10 dakikaX3, +4°C)
- % 50 Etanol (10 dakikaX3, +4°C)
- % 70 Etanol (10 dakikaX3, +4°C)
- % 80 Etanol (10 dakikaX3, +4°C)
- % 90 Etanol (10 dakikaX3, +4°C)
- % 100 Etanol (10 dakikaX3, +4°C)
- % 100 Etanol: Amil Asetat (3:1) (30 dakika, +4 °C)
- % 100 Etanol: Amil Asetat (1:1) (30 dakika, +4 °C)
- % 100 Etanol: Amil Asetat (1:3) (30 dakika, +4 °C)
- Saf Amil asetat (+4 °C)

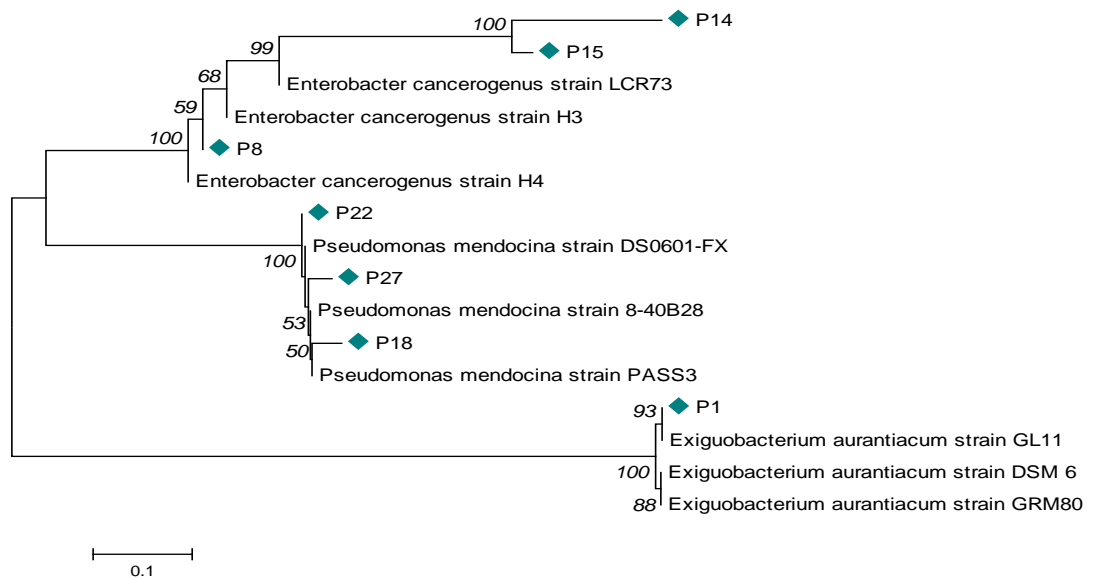
3. BULGULAR

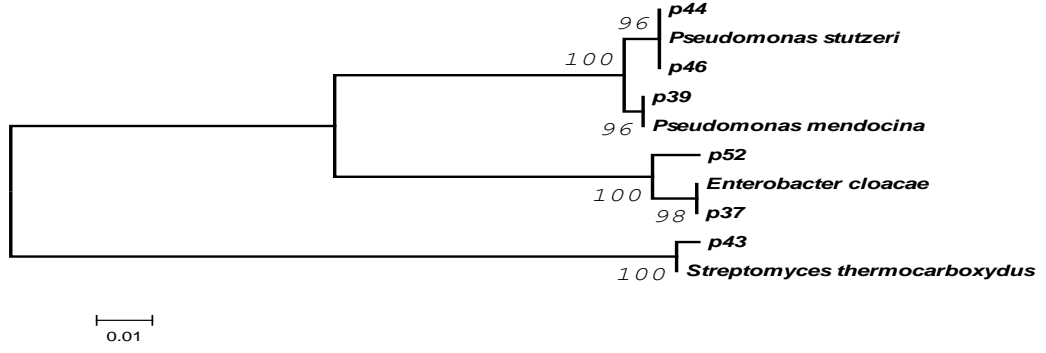
3.1. Besi Ortamı Belirlenmesi

İzolatların en iyi geliştikleri besi ortamı Triptic soy broth (TSB) olarak belirlenmiştir. Belirlenen bu besi ortamına farklı konsantrasyonlarda ağır metal ve metaller (Cu^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} 52ppm, Ba^{+2} , Al^{+2} , Ni^{+2} , Pb^{+2} 100ppm, Co^{+2} ve Cd^{+2} 20ppm) ilave edilmiştir.

3.2. Bakterilerin Tiplendirilmesi

İzolatların 16S rRNA sekans analizi sonuçlarının değerlendirilmesi sonucunda toplam 13 izolat içinde 6 farklı tür olduğu tespit edilmiştir. Bu izolatların 3'ü *Enterobacter cancerogenus*, 3'ü *Pseudomonas mendocina*, 1'i *Exiguobacterium aurantiacum*, 2'si *Pseudomonas stutzeri*, 2'si *Enterobacter cloacae* ve 1 tanesinin de *Streptomyces thermocarboxydus* olduğu görülmüştür. Teşhisi yapılan bakteriler içinde gram pozitif bir bakteri olan *Streptomyces thermocarboxydus* olması dikkati çekmiştir. Teşhis sonrası kontrol amacıyla yapılan gram boyama sonunda bakterinin gram negatif olduğu teyit edilmiştir. Bu bakteri ile ilgili REFGEN'den kaynaklı bir hata olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle bu bakteri stoklardan çıkarılmıştır. 16S rRNA sekans analizi ile tiplendirilen suşların tür adı ve izolasyon kaynakları Tablo 4'de, 16S rRNA sekans analizi ile ilgili filogenetik ağaç Şekil 6'da verilmiştir.

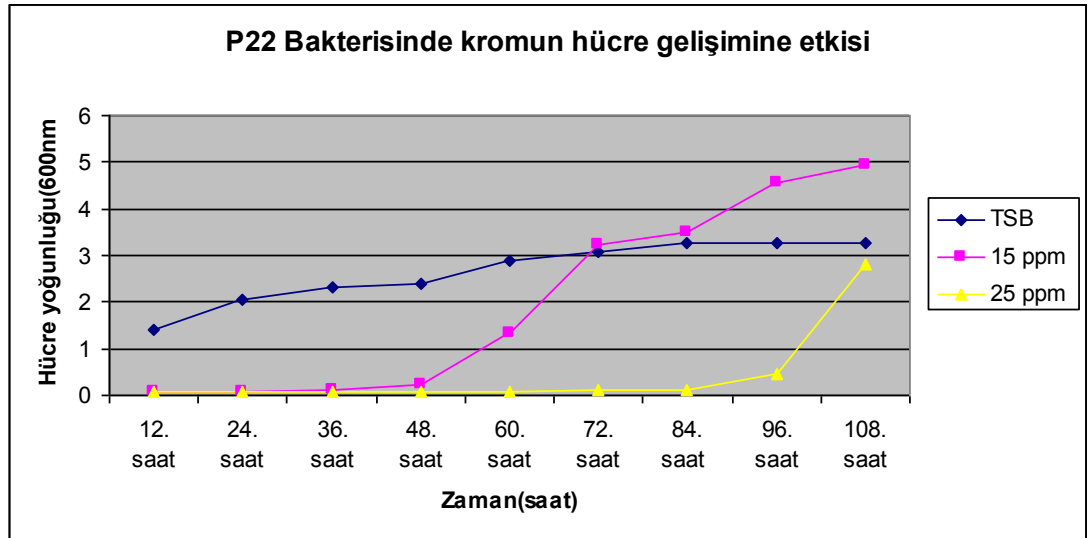




Şekil 6: İzolatların 16S rRNA analizine göre filogenetik ağacı

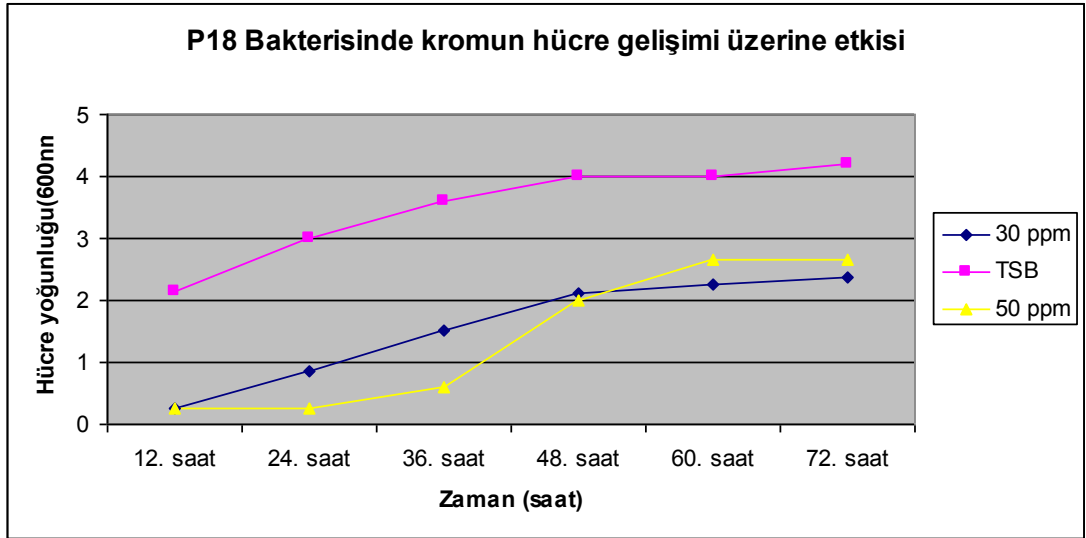
3.3. Kromun Hücre Gelişimine Toksik Etkisi

Krom organizmalar için essensiyel bir element (Bailar, 1997) olmasının yanında kanserojenik (Venitt ve Levy, 1974), mutajenik (Nishioka, 1975) ve yüksek toksik (Sharma ve ark., 1995, Petrilli ve Flora, 1977) özelliklerinden dolayı ortamda miktarının artmasıyla organizmalar üzerinde olumsuz etkilere sebep olur.



Şekil 7: *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisinde kromun hücre gelişimine etkisi

Şekil 7'de her iki konsantrasyon hücre yoğunluğu kontrol grubu ile kıyaslandığında kromun hücre gelişimi üzerinde olumsuz bir etkisi olduğu açıkça görülmektedir. Ortamdaki Cr(VI) miktarı sıfırlandığında yani 15 ppm için 72. saat ve 25 ppm için 96. saat sonrasında ise hücre gelişiminin arttığını görebiliyoruz.



Şekil 8: *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 bakterisinde kromun hücre gelişimine etkisi

Şekil 8'de görüldüğü gibi 30 ve 50 ppm krom konsantrasyonlarındaki hücre yoğunluğu kontrol grubu ile kıyaslandığında daha az olduğu açıkça görülmektedir.

3.4. Bakterilerin Hekzavalent Krom Dirençlilik Mekanizmalarının Belirlenmesi

Bakterilerin krom dirençliliği, minimum inhibisyon konsantrasyonuna göre belirlenmiştir. Krom konsantrasyonu 10-500 ppm aralığında tutularak toplam hacim 5 ml olacak şekilde broth dilusyon yöntemi kullanıldı. Gözle görülür bir gelişmenin olmadığı minimum konsantrasyon MİK olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca sonuçlar petri ekimi yapılarak da doğrulanmıştır. Sonuçlar Tablo 6'da verilmiştir. Krom indirgeme deneyleri için yapılan ön denemelerimiz sonunda krom ve ağır metallerin hücre üzerine olan toksik etkisi nedeniyle 110 ppm ve 25 ppm MİK değerine sahip olan *P. mendocina* PASS3-P18 ve *P. mendocina* DS0601-FX-P22 suşları seçilmiştir.

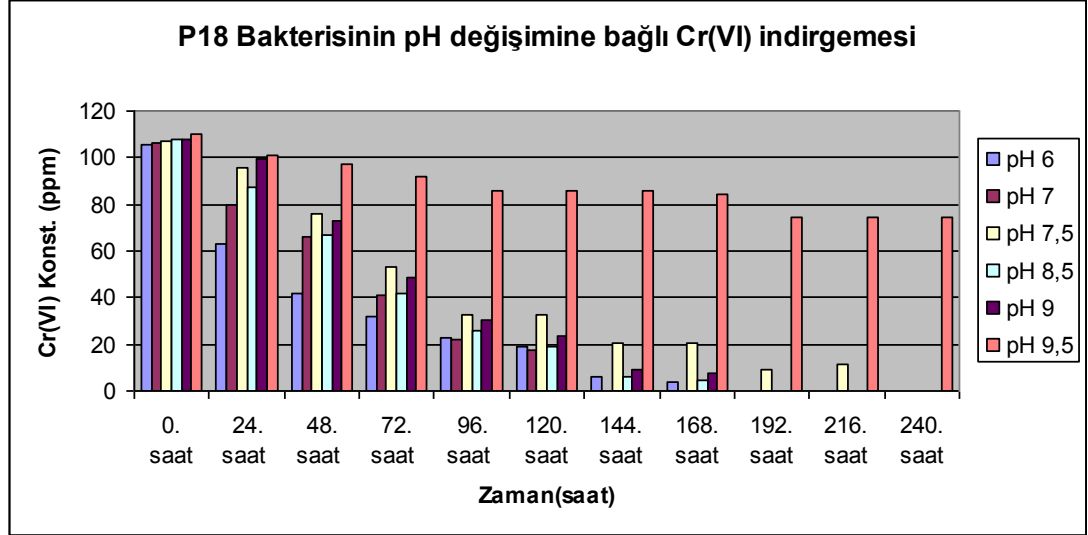
Tablo 5: Bakterilerin hegzavalent krom dirençlilikleri

Suş Adı ve Kodu	Cr(VI) Konsatrasyonu (ppm)
<i>Exiguobacterium aurantiacum</i> DSM6 (P1)	30
<i>Pseudomonas cancerogenus</i> H4 (P8)	60
<i>Pseudomonas cancerogenus</i> LCR73 (P14)	60
<i>Pseudomonas cancerogenus</i> LCR73 (P15)	50
<i>Pseudomonas mendocina</i> PASS3 (P18)	110
<i>Pseudomonas mendocina</i> DS0601-FX (P22)	25
<i>Pseudomonas mendocina</i> 8-40B28 (P27)	20
<i>Enterobacter cloacae</i> (P37)	450
<i>Pseudomonas mendocina</i> (P39)	90
<i>Streptomyces thermocarboxydus</i> (P43)	110
<i>Pseudomonas stutzeri</i> (P44)	30
<i>Pseudomonas stutzeri</i> (P46)	30
<i>Enterobacter cloacae</i> (P52)	60

3.5. Krom İndirgeme DeneYleri

3.5.1. Krom indirgemeye pH'ın etkisi

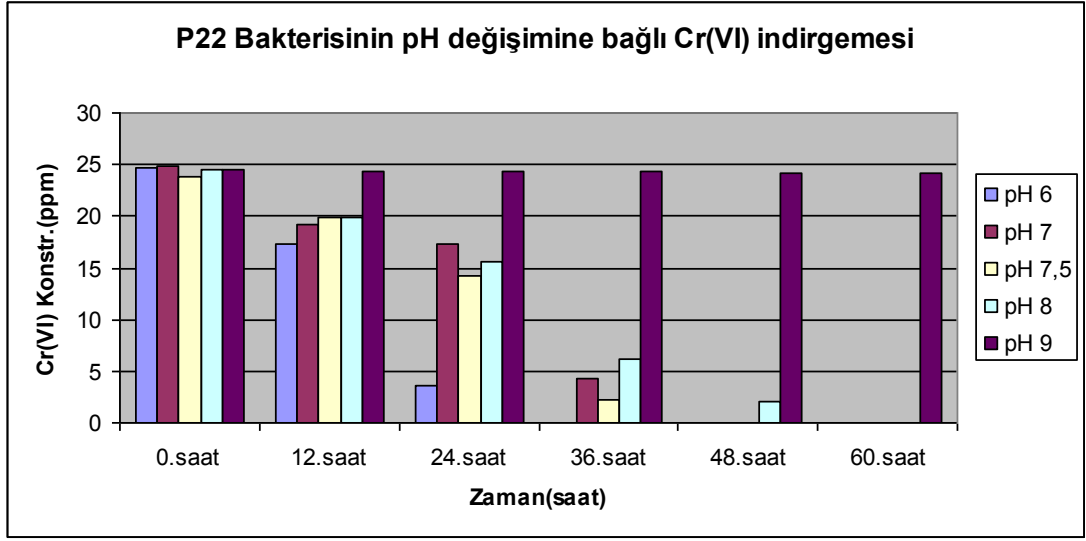
Krom indirgemeye pH'nın etkisinin belirlenmesi amacıyla pH'sı 6, 7, 7.5, 8.5, 9 ve 9.5'a ayarlanan TSB besiyerlerine önceden aktifleştirilen *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 suşu %2 oranında inoküle edilmiştir. Besiyerlerinin pH'sı NaHCO₃ tamponu kullanılarak sabitlenmiştir. Çalışma sonunda elde edilen sonuçlara göre, *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 bakterisi 110 ppm Cr(VI)'u pH=7'de inkübasyonun 144. saatinde sıfırlamıştır. Diğer pH aralıklarında bakterinin kromu sıfırlama zamanının ortalama olarak 192. ve 240. saatler olduğu bulunmuştur. Krom indirgeme deneyleri için en iyi pH'nın 7 olduğu belirlenmiştir. Bundan sonraki tüm krom indirgeme deneyleri pH=7'de yapılmıştır. Sonuçlar Şekil 9'da verilmiştir.



Şekil 9: *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 bakterisinin pH değişimine bağlı Cr(VI) indirgemesi

Pseudomonas mendocina DS0601-FX-P22 suşunda farklı pH'ların krom indirgemeye etkisini belirlemek için pH'sı 6.0, 7.0, 7.5, 8.0 ve 9.0'a ayarlanan TSB besiyerlerine önceden aktifleştirilen *P. mendocina* DS0601-FX-P22 suşu %2 oranında inoküle edilmiştir. Besiyerlerinin pH'sı NaHCO₃ tamponu kullanılarak arzu edilen pH'ya sabitlenmiştir. Çalışma sonunda elde edilen sonuçlara göre, *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisi 25 ppm Cr(VI)'u pH=6'da inkübasyonun 36. saatinde sıfırlamıştır. Diğer pH aralıklarında bakteri ortalama 48. ve 60. saatlerde Cr(VI)'yı sıfırlamıştır. Krom indirgeme deneyleri için en iyi pH'nın

6 olduğu belirlenmiştir. Bundan sonraki tüm krom indirgeme deneyleri pH=6'da yapılmıştır. Sonuçlar Şekil 10'da verilmiştir.



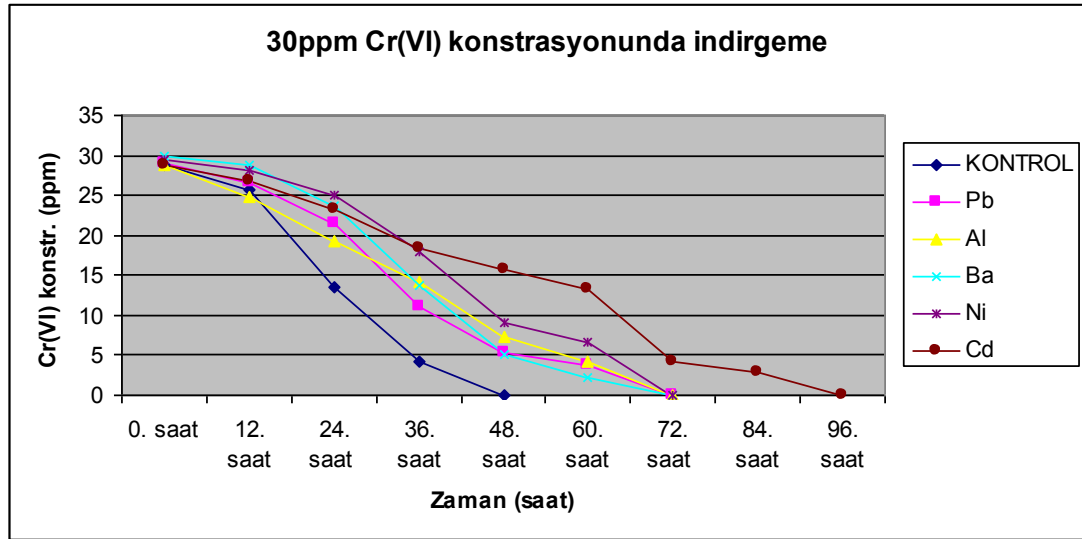
Şekil 10: *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisinin pH değişimine bağlı Cr(VI) indirgemesi

3.5.2. Farklı ağır metal ve metal varlığında krom indirgeme deneyleri

Farklı ağır metal ve metallerin bulunduğu TSB besi ortamlarında *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 bakterisi için krom indirgeme deneyleri yapılarak 30 ppm'lik kromlu ortamlardaki indirgeme sonuçları Tablo 7 ve 8'de verilmiştir. Bazı Ağır metal ve metal varlığında krom indirgeme süreleri azalırken, bazılarında ise krom indirgeme sürelerinde artış olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubunda krom indirgeme zamanı 48 saat olarak belirlenirken, bu süre Cu^{+2} varlığında 24 saate, Fe^{+2} varlığında ise 36 saate düşmüştür (Şekil 12). Kontrol ile kıyaslandığında, metallere Al^{+2} , Pb^{+2} , Ba^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} , Co^{+2} ve Cd^{+2} gibi ağır metal ve metallere krom indirgemesini olumsuz yönde etkilemişlerdir (Şekil 11 ve 12). Al^{+2} , Pb^{+2} , Ba^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} varlığında krom sıfırlama zamanı 72 saat olarak belirlenirken Cd^{+2} varlığında 96 saat Co^{+2} varlığında ise 60 saat olarak belirlenmiştir.

Tablo 6: *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 bakterisinin 30 ppm krom konsantrasyonunda, ağırmetal ve metal varlığında Cr(VI) indirgeme sonuçları(A)

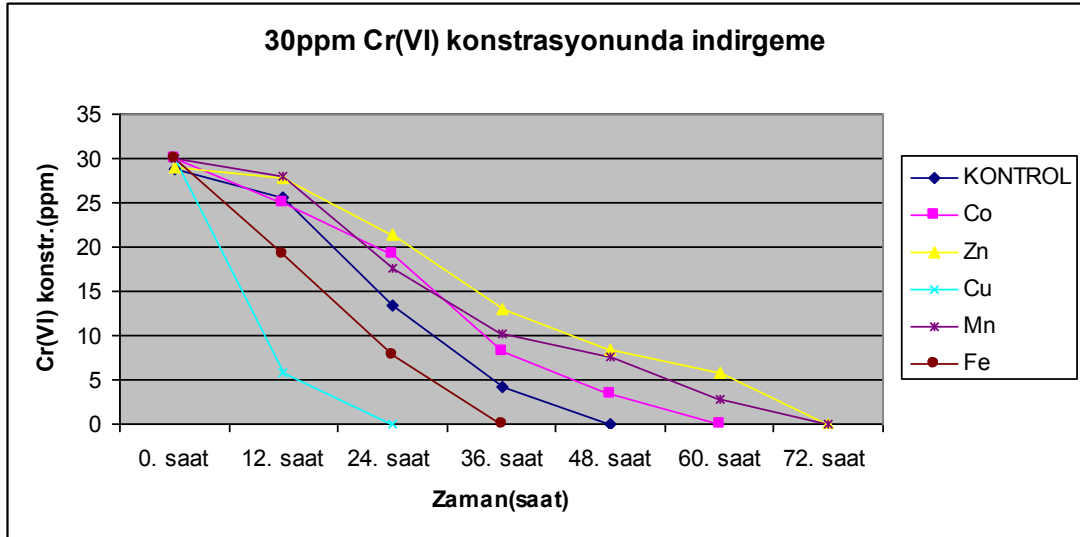
ZAMAN	KONTROL	Pb ⁺²	Al ⁺²	Ba ⁺²	Ni ⁺²	Cd ⁺²
0. saat	28,72 ± 0,67	28,99 ± 0,13	28,86 ± 0,54	29,90 ± 0,00	29,53 ± 0,40	28,72 ± 0,67
12. saat	25,62 ± 0,00	26,56 ± 0,95	24,81 ± 0,27	28,86 ± 0,27	28,05 ± 0,00	26,83 ± 0,40
24. saat	13,47 ± 1,08	21,43 ± 0,68	19,27 ± 0,68	23,72 ± 0,82	25,08 ± 0,00	23,19 ± 0,27
36. saat	4,15 ± 1,75	11,04 ± 0,54	14,28 ± 0,27	13,74 ± 0,54	17,92 ± 0,40	18,33 ± 0,54
48. saat	-	5,37 ± 0,81	7,26 ± 0,81	5,10 ± 0,54	9,15 ± 0,27	15,63 ± 0,00
60. saat		3,75 ± 0,27	4,15 ± 2,02	2,13 ± 0,00	6,72 ± 0,27	13,33 ± 0,41
72. saat		-	-	-	-	4,29 ± 0,00
84. saat						2,80 ± 0,13
96. saat						-



Şekil 11: *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 bakterisinin 30 ppm krom konsantrasyonunda ağırmetal ve metal varlığında Cr(VI) indirgemesi (A)

Tablo 7: *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 30 ppm krom konsantrasyonunda, ağırmetal ve metal varlığında Cr(VI) indirgeme sonuçları(B)

ZAMAN	KONTROL	Co ⁺²	Zn ⁺²	Cu ⁺²	Mn ⁺²	Fe ⁺²
0. saat	28,72 ± 0,67	29,94 ± 0,00	28,99 ± 0,95	29,94 ± 0,00	29,94 ± 0,00	29,94 ± 0,00
12. saat	25,62 ± 0,00	24,94 ± 1,48	27,78 ± 1,08	5,77 ± 0,67	27,91 ± 0,68	19,27 ± 0,41
24. saat	13,47 ± 1,08	19,14 ± 3,24	21,43 ± 0,95	-	17,65 ± 0,95	7,80 ± 1,35
36. saat	4,15 ± 1,75	8,20 ± 0,68	13,06 ± 0,14		10,23 ± 0,27	-
48. saat	-	3,47 ± 0,27	8,47 ± 0,67		7,53 ± 0,27	
60. saat		-	5,90 ± 0,80		2,78 ± 0,11	
72. saat			-		-	



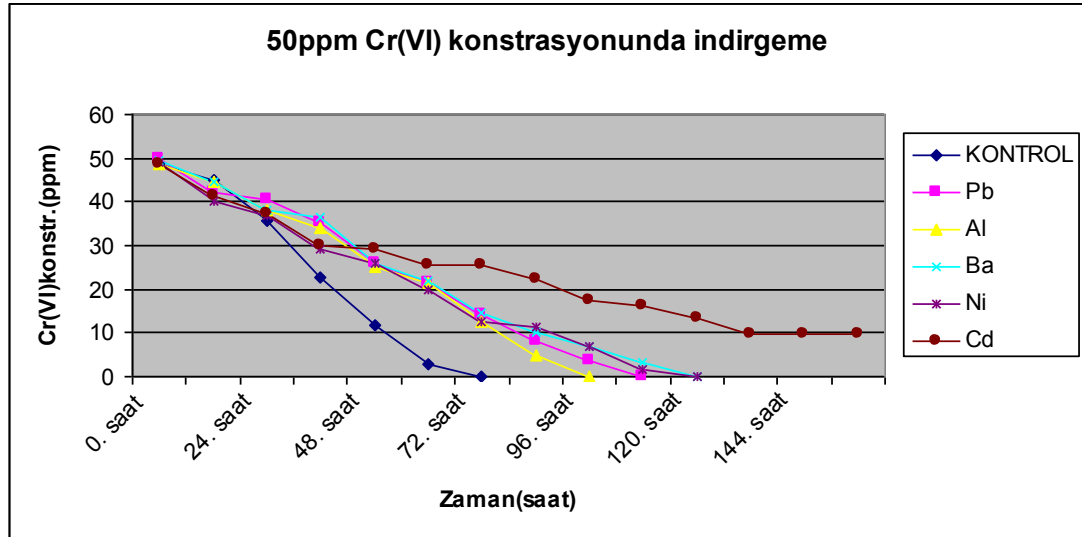
Şekil 12: *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 bakterisinin 30 ppm krom konsantrasyonunda ağırmetal ve metal varlığında Cr(VI) indirgemesi (B)

Farklı ağır metal ve metallerin bulunduğu TSB besi ortamlarında *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 bakterisi için krom indirgeme deneyleri yapılarak 50 ppm'lik kromlu ortamlardaki indirgeme sonuçları Tablo 9 ve 10'da verilmiştir. Bazı ağır metal ve metal varlığında krom indirgeme süreleri azalırken, bazılarında ise krom indirgeme sürelerinde artış olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubunda krom indirgeme zamanı 72 saat olarak belirlenirken, bu süre Cu⁺² varlığında 36 saate, Fe⁺² varlığında ise 48 saate düşmüştür (Şekil 14). Kontrol ile kıyaslandığında, metallerden Al⁺², Pb⁺², Ba⁺², Ni⁺², Zn⁺², Mn⁺², Co⁺², ve Cd⁺² krom indirgemesini olumsuz yönde etkilemişlerdir. Pb⁺² varlığında krom sıfırlanma zamanı 108 saat, Al⁺² varlığında 96

saat iken, Mn^{+2} ve Co^{+2} varlığında 84 saat, Ba^{+2} ve Ni^{+2} varlığında bu süre 120 saate uzamıştır (Şekil 13 ve 14). Zn^{+2} ve Cd^{+2} ,un varlığında ise bakteriyal krom indirgemesi belli miktara kadar devam etmiş, ilerleyen inkübasyon süresince kromun sıfırlanmadığı ve sabitlendiği belirlenmiştir

Tablo 8: *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 bakterisinin 50 ppm krom konsantrasyonunda, ağırmetal ve metal varlığında Cr(VI) indirgeme sonuçları(A)

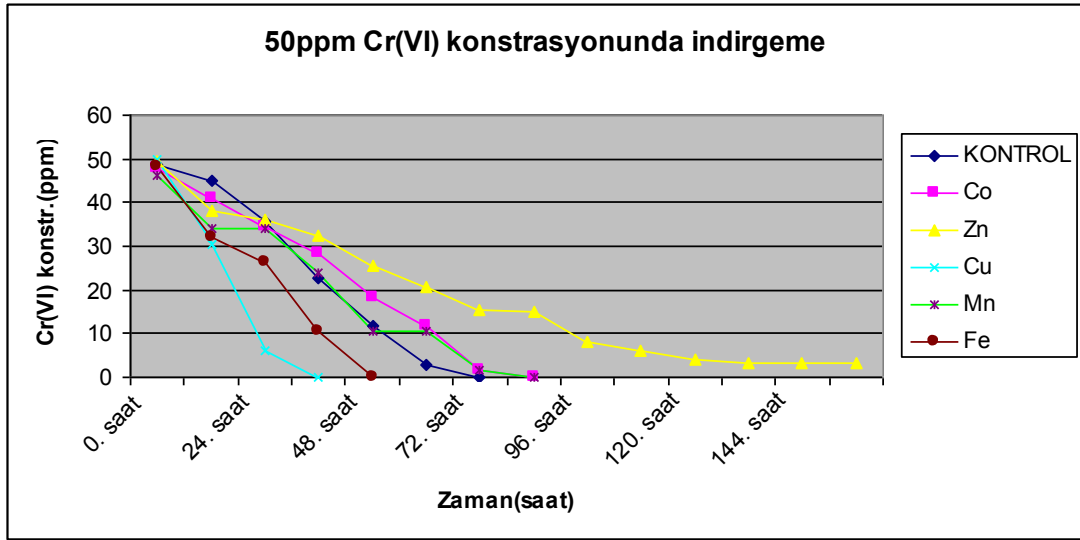
ZAMAN	KONTROL	Pb^{+2}	Al^{+2}	Ba^{+2}	Ni^{+2}	Cd^{+2}
0. sa	48,77 ± 0,22	49,9 ± 0,00	48,77 ± 0,22	49,45 ± 0,45	49 ± 0,90	48,55 ± 0,45
12. sa	44,95 ± 4,05	42,25 ± 0,00	44,72 ± 0,23	44,72 ± 1,13	40 ± 0,45	41,35 ± 0,90
24. sa	35,50 ± 0,90	40,67 ± 0,22	38,2 ± 0,00	38,2 ± 0,90	37,07 ± 0,67	37,3 ± 0,45
36. sa	22,67 ± 1,13	35,27 ± 0,68	34,15 ± 1,35	36,62 ± 1,58	29,2 ± 0,90	29,87 ± 0,67
48. sa	11,87 ± 0,68	25,82 ± 0,68	25,15 ± 0,00	25,82 ± 2,48	25,82 ± 0,22	29,20 ± 0,45
60. sa	2,65 ± 0,45	21,55 ± 1,80	21,55 ± 0,45	21,77 ± 2,03	19,75 ± 0,90	25,60 ± 0,90
72. sa	-	14,35 ± 0,45	12,55 ± 0,90	14,57 ± 2,48	12,55 ± 0,45	25,60 ± 0,90
84. sa	-	8,05 ± 0,45	4,67 ± 1,13	10,07 ± 2,48	11,42 ± 0,22	22,45 ± 0,00
96. sa	-	3,55 ± 0,45	-	6,7 ± 2,70	6,7 ± 1,80	17,27 ± 1,13
108. sa	-	-	-	3,1 ± 1,80	1,75 ± 0,00	16,37 ± 0,23
120. sa	-	-	-	-	-	13,22 ± 2,02
132. sa	-	-	-	-	-	9,85 ± 1,35
144. sa	-	-	-	-	-	9,80 ± 1,35
156. sa	-	-	-	-	-	9,85 ± 1,35



Şekil 13: *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 bakterisinin 50 ppm krom konsantrasyonunda ağırmetal ve metal varlığında Cr(VI) indirgemesi (A)

Tablo 9: *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 bakterisinin 50 ppm krom konsantrasyonunda, ağırmetal ve metal varlığında Cr(VI) indirgeme sonuçları(B)

ZAMAN	KONTROL	Co ⁺²	Zn ⁺²	Cu ⁺²	Mn ⁺²	Fe ⁺²
0. sa	48,77 ± 0,22	47,65 ± 0,45	49,45 ± 0,45	49,9 ± 0,00	46,07 ± 1,58	48,10 ± 0,90
12. sa	44,95 ± 4,05	40,90 ± 2,25	38,20 ± 0,45	30,32 ± 1,12	33,92 ± 0,67	31,90 ± 0,90
24. sa	35,50 ± 0,90	34,06 ± 0,45	35,95 ± 0,00	6,02 ± 2,02	33,92 ± 0,67	26,27 ± 0,67
36. sa	22,67 ± 1,13	28,30 ± 1,35	32,57± 0,22	-	23,80 ± 0,90	10,52 ± 0,67
48. sa	11,87 ± 0,68	18,40 ± 0,90	25,37 ± 2,02		10,52 ± 0,23	-
60. sa	2,65 ± 0,45	11,65 ± 0,00	20,87 ± 1,58		10,52 ± 0,23	
72. sa	-	1,60 ± 0,60	15,25 ± 0,00		1,70 ± 0,00	
84. sa		-	14,80 ± 0,45		-	
96. sa			8,27 ± 1,57			
108. sa			6,25 ± 0,45			
120. sa			4,22 ± 0,22			
132. sa			3,32 ± 0,22			
144. sa			3,32 ± 0,22			
156. sa			3,32 ± 0,22			

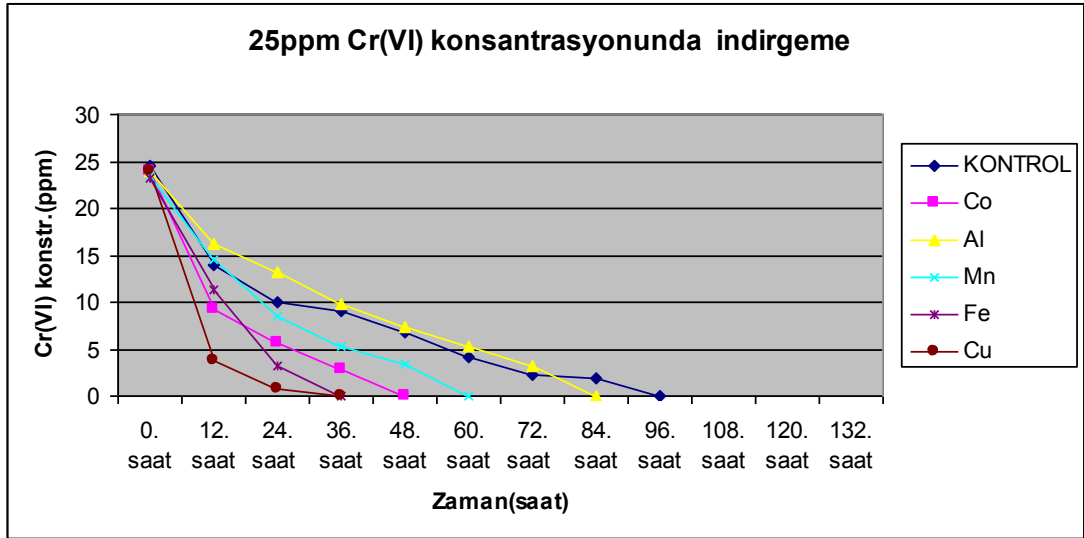


Şekil 14: *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 bakterisinin 50 ppm krom konsantrasyonunda ağırmetal ve metal varlığında Cr(VI) indirgemesi (B)

Farklı ağır metal ve metallerin bulunduğu TSB besi ortamlarında *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisi için krom indirgeme deneyleri yapılarak 25 ppm'lik kromlu ortamlardaki indirgeme sonuçları Tablo 11 ve 12'de verilmiştir. Bazı ağır metal ve metal varlığında krom indirgeme süreleri azalırken, bazılarında ise krom indirgeme sürelerinde artış olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubunda krom indirgeme zamanı 96 saat olarak belirlenirken, bu süre Cu^{+2} ve Fe^{+2} varlığında 36 saate, Co^{+2} varlığında ise 48 saate, Al^{+2} varlığında 84 saate ve Mn^{+2} varlığında 60 saate düşmüştür (Şekil 15). Kontrol ile kıyaslandığında, metallere, Pb^{+2} , Ba^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} ve Cd^{+2} gibi ağır metal ve metaller krom indirgemelerini olumsuz yönde etkilemişlerdir (Şekil 16). Pb^{+2} , Zn^{+2} ve Cd^{+2} varlığında krom sıfırlanma zamanı 120 saate uzamıştır. Ba^{+2} ve Ni^{+2} 'in varlığında ise bakteriyal krom indirgemesi belli miktara kadar devam etmiş, ilerleyen inkübasyon süresince kromun sıfırlanmadığı ve sabitlendiği belirlenmiştir

Tablo10: *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisinin 25 ppm krom konsantrasyonunda, ağırmetal ve metal varlığında Cr(VI) indirgeme sonuçları (A)

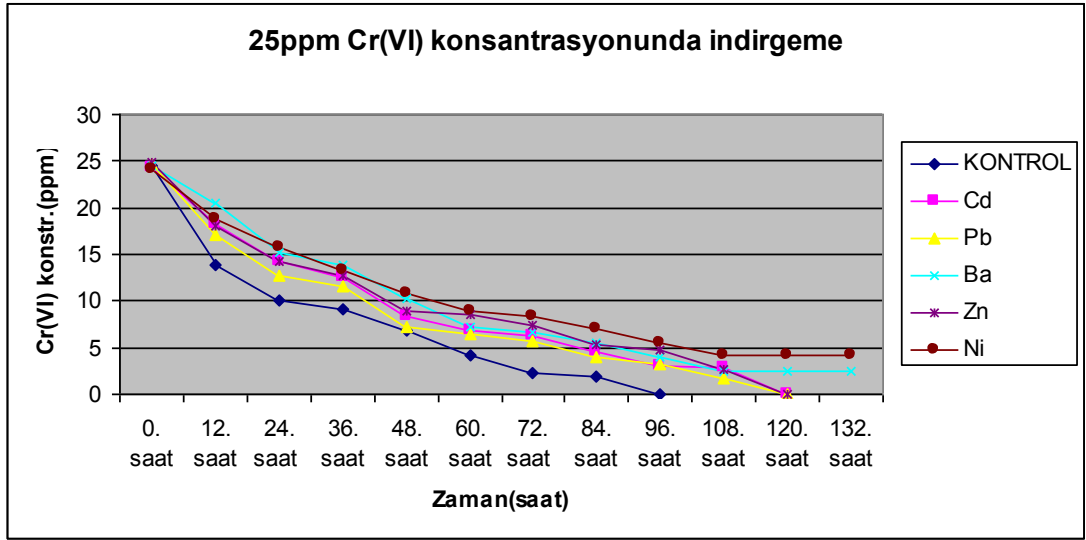
ZAMAN	KONTROL	Co^{+2}	Al^{+2}	Mn^{+2}	Fe^{+2}	Cu^{+2}
0. saat	24,50 ± 0,00	23,93 ± 0,52	24,05 ± 0,20	23,37 ± 0,20	23,15 ± 0,20	24,05 ± 0,20
12. saat	13,92 ± 2,25	9,19 ± 0,67	16,28 ± 0,12	14,59 ± 1,12	11,33 ± 0,34	3,80 ± 0,45
24. saat	9,98 ± 2,13	5,60 ± 0,00	13,24 ± 0,22	8,52 ± 0,00	3,23 ± 0,11	0,76 ± 0,11
36. saat	9,08 ± 1,68	2,90 ± 0,45	9,87 ± 0,22	5,26 ± 0,34	-	-
48. saat	6,83 ± 1,68	-	7,40 ± 0,00	3,35 ± 0,90		
60. saat	4,13 ± 1,68		5,37 ± 0,23	-		
72. saat	2,30 ± 1,50		3,12 ± 0,00			
84. saat	1,86 ± 1,26		-			
96. saat	-					



Şekil 15: *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisinin 25 ppm krom konsantrasyonunda ağırmetal ve metal varlığında Cr(VI) indirgemesi (A)

Tablo 11: *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisinin 25 ppm krom konsantrasyonunda, ağırmetal ve metal varlığında Cr(VI) indirgeme sonuçları(B)

ZAMAN	KONTROL	Cd ⁺²	Pb ⁺²	Ba ⁺²	Zn ⁺²	Ni ⁺²
0. saat	24,50 ± 0,00	24,27 ± 0,22	24,72 ± 0,22	24,50 ± 0,00	24,95 ± 0,00	24,05 ± 0,00
12. saat	13,92 ± 2,25	18,31 ± 0,11	17,07 ± 0,45	20,44 ± 0,22	18,08 ± 0,11	18,76 ± 0,34
24. saat	9,98 ± 2,13	14,26 ± 0,11	12,79 ± 1,58	15,16 ± 0,11	14,26 ± 0,11	15,72 ± 0,23
36. saat	9,08 ± 1,68	12,57 ± 0,23	11,56 ± 0,11	13,81 ± 0,56	12,80 ± 0,90	13,36 ± 0,11
48. saat	6,83 ± 1,68	8,41 ± 0,34	7,28 ± 0,34	10,21 ± 0,11	8,86 ± 0,34	10,77 ± 0,90
60. saat	4,13 ± 1,68	6,83 ± 0,34	6,50 ± 0,00	7,17 ± 0,22	8,52 ± 0,67	8,97 ± 0,00
72. saat	2,30 ± 1,50	6,27 ± 0,23	5,71 ± 0,11	6,72 ± 0,22	7,40 ± 0,00	8,3 ± 0,00
84. saat	1,86 ± 1,26	4,58 ± 0,79	3,91 ± 0,11	5,48 ± 0,33	5,26 ± 0,11	6,94 ± 0,23
96. saat	-	3,12 ± 0,23	3,20 ± 0,30	3,91 ± 1,24	4,70 ± 0,45	5,47 ± 0,57
108. saat	-	2,78 ± 0,12	1,66 ± 0,34	2,56 ± 0,11	2,67 ± 0,00	4,13 ± 0,57
120. saat	-	-	-	2,56 ± 0,11	-	4,13 ± 0,57
132. saat	-	-	-	2,56 ± 0,11	-	4,13 ± 0,57

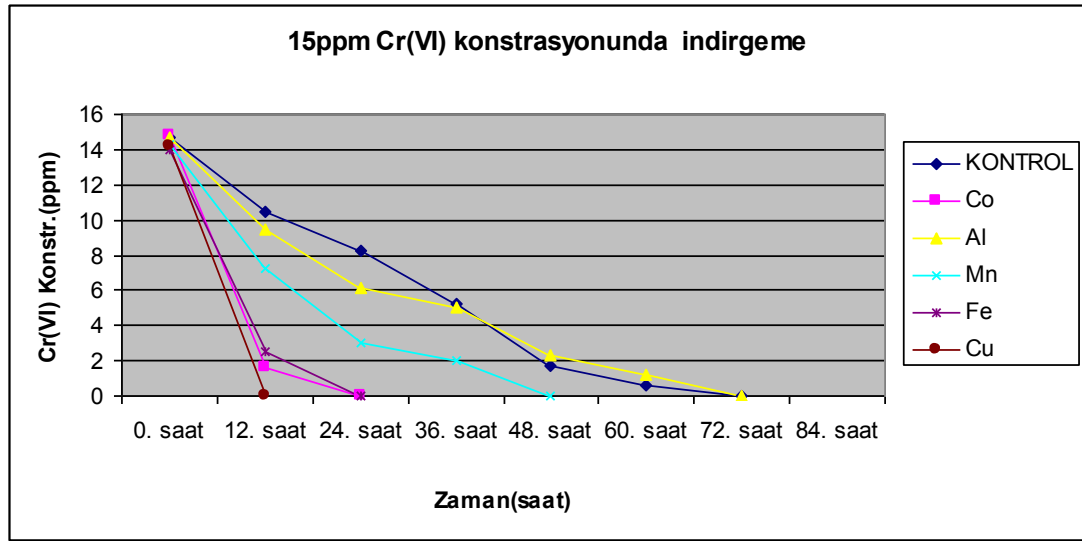


Şekil 16: *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisinin 25ppm krom konsantrasyonunda ağırmetal ve metal varlığında Cr(VI) indirgemesi (B)

Farklı ağırmetal ve metallerin bulunduğu TSB besi ortamlarında *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisi için krom indirgeme deneyleri yapılarak 15 ppm'lik kromlu ortamlardaki indirgeme sonuçları Tablo 13 ve 14' de verilmiştir. Bazı Ağır metal ve metal varlığında krom indirgeme süreleri azalırken, bazılarında herhangi bir değişme olmadığı, bazılarında ise krom indirgeme sürelerinde artış olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubunda krom indirgeme zamanı 72 saat olarak belirlenirken, bu süre Cu^{+2} varlığında 12 saate, Fe^{+2} ve Co^{+2} varlığında 24 saate, Mn^{+2} varlığında ise 48 saate düşmüştür (Şekil 17). Kontrol ile kıyaslandığında, metallere Al^{+2} 'nin bakteriyel krom indirgeme zamanında herhangi bir etkilerinin olmadığı gözlenmiştir. Pb^{+2} , Ba^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} ve Cd^{+2} gibi ağır metaller krom indirgemesini olumsuz yönde etkilemişlerdir. Pb^{+2} ve Cd^{+2} varlığında krom sıfırlanma zamanı 96 saat iken, Ba^{+2} , Ni^{+2} ve Zn^{+2} varlığında bu süre 108 saate uzamıştır (Şekil 18).

Tablo 12: *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisinin 15 ppm krom konsantrasyonunda, ağırmetal ve metal varlığında Cr(VI) indirgeme sonuçları(A)

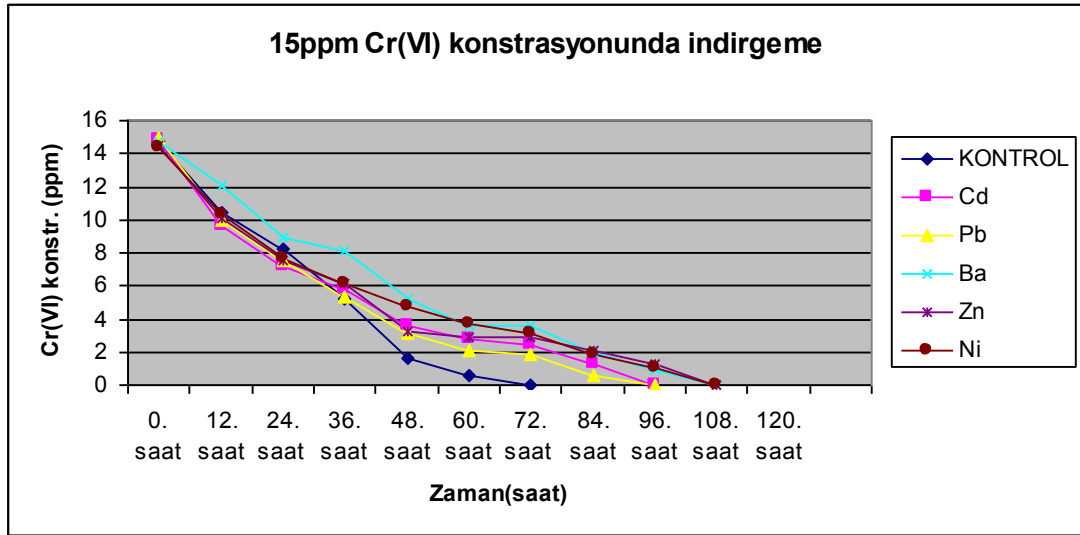
ZAMAN	KONTROL	Co ⁺²	Al ⁺²	Mn ⁺²	Fe ⁺²	Cu ⁺²
0. saat	14,70 ± 0,00	14,83 ± 0,13	14,70 ± 0,00	14,29 ± 0,14	14,03 ± 0,00	14,16 ± 0,00
12. saat	10,44 ± 0,48	1,60 ± 0,41	9,43 ± 0,13	7,20 ± 0,20	2,48 ± 0,61	-
24. saat	8,28 ± 0,34	-	6,12 ± 0,21	3,02 ± 0,34	-	
36. saat	5,25 ± 0,27		5,04 ± 0,20	2,01 ± 0,00		
48. saat	1,67 ± 0,88		2,34 ± 0,75	-		
60. saat	0,62 ± 0,57		1,20 ± 0,00			
72. saat	-		-			



Şekil 17: *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisinin 15 ppm krom konsantrasyonunda ağırmetal ve metal varlığında Cr(VI) indirgemesi (A)

Tablo 13: *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisinin 15 ppm krom konsantrasyonunda, ağırmetal ve metal varlığında Cr(VI) indirgeme sonuçları(B)

ZAMAN	KONTROL	Cd ⁺²	Pb ⁺²	Ba ⁺²	Zn ⁺²	Ni ⁺²
0. saat	14,70 ± 0,00	14,83 ± 0,13	14,97 ± 0,00	14,70 ± 0,00	14,50 ± 0,00	14,43 ± 0,00
12. saat	10,44 ± 0,48	9,63 ± 0,60	9,97 ± 0,40	12,07 ± 0,34	10,04 ± 0,48	10,31 ± 0,20
24. saat	8,28 ± 0,34	7,14 ± 0,00	7,54 ± 0,00	8,96 ± 0,47	7,54 ± 0,41	7,67 ± 0,14
36. saat	5,25 ± 0,27	5,85 ± 0,33	5,31 ± 0,21	8,08 ± 0,13	6,19 ± 0,13	6,19 ± 0,00
48. saat	1,67 ± 0,88	3,63 ± 0,27	3,09 ± 0,00	5,24 ± 0,13	3,29 ± 0,34	4,70 ± 0,13
60. saat	0,62 ± 0,57	2,75 ± 0,20	2,14 ± 0,00	3,62 ± 0,40	2,95 ± 0,00	3,69 ± 0,21
72. saat	-	2,48 ± 0,47	1,80 ± 0,00	3,62 ± 0,40	2,95 ± 0,00	3,08 ± 0,40
84. saat		1,33 ± 0,13	0,59 ± 0,23	2,01 ± 0,27	2,07 ± 0,20	1,87 ± 0,00
96. saat		-	-	0,90 ± 0,00	1,33 ± 0,00	1,06 ± 0,00
108. saat				-	-	-



Şekil 18: *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisinin 15 ppm krom konsantrasyonunda ağırmetal ve metal varlığında Cr(VI) indirgemesi (B)

Tablo 14: *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 bakterisinin 50 ppm Cr(VI) konsantrasyonunda farklı ağırmetal ve metal varlığında hücre yoğunlukları (OD₆₀₀)

ZAMAN	Cd ⁺² +Cr(VI)	Cd ⁺²	Pb ⁺² +Cr(VI)	Pb ⁺²	Ba ⁺² +Cr(VI)	Ba ⁺²	Zn ⁺² +Cr(VI)	Zn ⁺²	Ni ⁺² +Cr(VI)	Ni ⁺²	KTRL Cr(VI)	KNTR TSB
12. saat	0,12	1,01	0,10	1,62	0,10	1,10	0,13	1,38	0,14	1,21	0,26	2,13
24. saat	0,23	2,29	0,10	3,31	0,10	2,26	0,29	2,92	0,14	1,70	0,26	3,00
36. saat	0,23	2,52	0,15	3,70	0,11	2,92	0,34	3,05	0,18	1,72	0,60	3,59
48. saat	0,23	2,72	1,00	3,82	0,97	3,01	1,32	3,10	1,04	2,17	2,01	4,00
60. saat	0,34	2,85	1,41	4,06	1,18	3,20	1,45	3,10	1,29	2,25	2,65	4,00
72. saat	0,50	2,85	2,07	3,52	1,55	3,79	1,73	3,10	1,85	2,45	2,67	4,20
84. saat	0,50	2,85	2,36	3,47	1,70	3,97	2,06	3,37	2,13	2,50		
96. saat	0,68	2,85	2,42	3,15	1,70	3,65	2,92	3,57	2,38	2,50		
108. saat	0,92	2,85	2,79	3,10	1,97	3,50	2,92	3,57	2,38	2,50		
120. saat	1,86	2,85	2,95	3,35	2,00	3,70	3,02	3,57	2,42	2,74		
132. saat	2,40	2,99					3,24	3,59	2,65	2,83		
144. saat	2,40	3,00					3,24	3,66	2,65	2,83		

Tablo 14'in devamı

ZAMAN	Co ⁺² +Cr(VI)	Co ⁺²	Al ⁺² +Cr(VI)	Al ⁺²	Mn ⁺² +Cr(VI)	Mn ⁺²	Fe ⁺² +Cr(VI)	Fe ⁺²	Cu ⁺² +Cr(VI)	Cu ⁺²	KTRL Cr(VI)	KNTR TSB
12. saat	0,15	1,10	0,08	1,52	0,20	1,48	0,22	1,45	0,36	3,09	0,26	2,13
24. saat	0,22	1,96	0,10	2,88	0,26	3,14	0,48	3,43	1,22	4,00	0,26	3,00
36. saat	0,34	1,96	0,11	3,50	1,00	3,52	1,94	3,90	1,26	4,13	0,60	3,59
48. saat	1,64	2,51	1,01	3,50	1,69	3,99	2,65	3,35	2,60	4,18	2,01	4,00
60. saat	2,08	2,70	1,24	4,13	2,45	4,64	3,09	3,51	3,29	4,22	2,65	4,00
72. saat	2,69	2,88	2,44	3,36	3,16	4,83	3,34	3,07	3,58	4,25	2,67	4,20
84. saat	2,69	3,07	2,44	2,91	3,16	4,83		2,83				
96. saat	3,14	3,19	2,63	3,28				2,52				
108. saat	3,14	3,20	2,82	2,55								
120. saat	3,14	3,30	3,02	2,70								
132. saat	3,16	3,43										
144. saat	3,66	3,47										

Tablo 15: *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 bakterisinin 30 ppm Cr(VI) konsantrasyonunda farklı ağırmetal ve metal varlığında hücre yoğunlukları (OD₆₀₀)

ZAMAN	Cd ⁺² +Cr(VI)	Cd ⁺²	Pb ⁺² +Cr(VI)	Pb ⁺²	Ba ⁺² +Cr(VI)	Ba ⁺²	Zn ⁺² +Cr(VI)	Zn ⁺²	Ni ⁺² +Cr(VI)	Ni ⁺²	KTRL Cr(VI)	KNTR TSB
12. saat	0,12	1,01	0,21	1,62	0,15	1,10	0,19	1,38	0,14	1,21	0,26	2,13
24. saat	0,12	2,29	0,91	3,31	0,15	2,26	0,54	2,92	0,14	1,70	0,85	3,00
36. saat	0,12	2,52	1,62	3,70	1,03	2,92	1,22	3,05	0,24	1,72	1,52	3,59
48. saat	0,19	2,72	1,95	3,82	1,82	3,01	1,56	3,10	1,32	2,17	2,12	4,00
60. saat	0,54	2,85	2,10	4,06	1,96	3,20	1,95	3,10	1,47	2,25	2,25	4,00
72. saat	1,35	2,85	2,35	3,52	2,25	3,79	2,35	3,10	1,72	2,45	2,38	4,20
84. saat	2,05	2,85	2,60	3,47	2,55	3,97	2,65	3,37	1,95	2,50		
96. saat	2,47	2,85	2,97	3,15	2,70	3,65	3,40	3,57	2,52	2,50		

ZAMAN	Co ⁺² +Cr(VI)	Co ⁺²	Al ⁺² +Cr(VI)	Al ⁺²	Mn ⁺² +Cr(VI)	Mn ⁺²	Fe ⁺² +Cr(VI)	Fe ⁺²	Cu ⁺² +Cr(VI)	Cu ⁺²	KTRL Cr(VI)	KNTR TSB
12. saat	0,13	1,10	0,33	1,52	0,12	1,48	0,17	1,45	0,84	3,09	0,26	2,13
24. saat	0,65	1,96	0,33	2,88	1,10	3,14	1,37	3,43	1,50	4,00	0,85	3,00
36. saat	1,65	1,96	1,09	3,50	2,11	3,52	1,90	3,90	1,95	4,13	1,52	3,59
48. saat	1,95	2,51	1,81	3,50	2,46	3,99	2,30	3,35	2,50	4,18	2,12	4,00
60. saat	2,12	2,70	2,00	4,13	2,62	4,64	3,00	3,51	2,80	4,22	2,25	4,00
72. saat	2,50	2,88	2,00	3,36	2,99	4,83	3,50	3,07	3,22	4,25	2,38	4,20
84. saat		3,07		2,91		4,83		2,83				
96. saat		3,19		3,28				2,52				

Tablo 16: *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisinin 15 ppm Cr(VI) konsantrasyonunda farklı ağırmetal ve metal varlığında hücre yoğunlukları (OD₆₀₀)

ZAMAN	Cd ⁺² +Cr(VI)	Cd ⁺²	Pb ⁺² +Cr(VI)	Pb ⁺²	Ba ⁺² +Cr(VI)	Ba ⁺²	Zn ⁺² +Cr(VI)	Zn ⁺²	Ni ⁺² +Cr(VI)	Ni ⁺²	KTRL Cr(VI)	KNTR TSB
12. saat	0,08	1,40	0,10	1,07	0,08	1,22	0,07	1,35	0,09	1,15	0,07	1,42
24. saat	0,08	1,47	0,10	1,45	0,08	1,47	0,07	1,48	0,09	1,25	0,08	2,05
36. saat	0,15	1,90	0,18	2,01	0,16	2,04	0,09	2,20	0,11	1,75	0,10	2,32
48. saat	0,15	1,92	0,18	2,01	0,16	2,04	0,09	2,27	0,11	2,00	0,21	2,40
60. saat	0,15	2,80	0,18	2,50	0,16	2,04	0,09	3,05	0,11	2,30	1,33	2,87
72. saat	0,15	2,80	0,18	2,40	0,16	2,04	0,12	3,05	0,19	2,50	3,22	3,07
84. saat	0,15	2,72	0,18	2,41	0,16	2,45	0,12	3,20	0,20	2,50	3,50	3,25
96. saat	0,25	2,72	0,18	2,41	0,27	2,45	0,24	3,39	0,25	2,55	4,57	3,25
108. saat	0,25	2,85	0,18	2,50	0,30	2,60	0,24	3,18	0,25	2,80	4,95	3,25

ZAMAN	Co ⁺² +Cr(VI)	Co ⁺²	Al ⁺² +Cr(VI)	Al ⁺²	Mn ⁺² +Cr(VI)	Mn ⁺²	Fe ⁺² +Cr(VI)	Fe ⁺²	Cu ⁺² +Cr(VI)	Cu ⁺²	KTRL Cr(VI)	KNTR TSB
12. saat	0,08	1,17	0,06	0,92	0,09	1,25	0,10	1,20	0,13	1,20	0,07	1,42
24. saat	0,13	2,00	0,06	1,92	0,09	2,70	0,11	2,00	0,19	1,82	0,08	2,05
36. saat	1,05	2,00	0,10	1,92	0,09	2,77	1,17	2,00	1,37	1,95	0,10	2,32
48. saat	1,30	2,62	0,08	2,40	1,03	3,60	2,15	2,50	1,82	2,30	0,21	2,40
60. saat	1,52	2,80	0,08	2,40	1,75	3,63	2,52	2,50	1,85	2,30	1,33	2,87
72. saat	1,64	3,00	1,40	2,40	2,40	4,00	2,90	3,00	2,27	2,30	3,22	3,07
84. saat	1,75	3,20	1,92	2,85	2,86	4,22	3,12	3,20	2,27	2,70	3,50	3,25
96. saat	1,75	3,30	2,57	3,00	2,86	4,25	3,04	3,20	2,10	3,00	4,57	3,25
108. saat	2,05	3,37	2,57	3,05	3,51	4,27	3,25	3,20	2,25	3,25	4,95	3,25

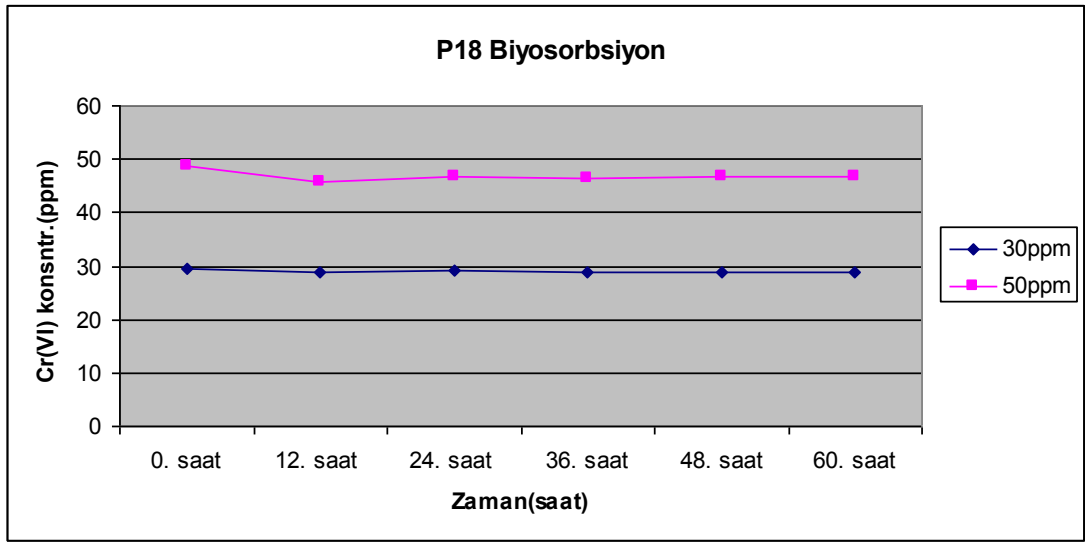
Tablo 17: *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisinin 25 ppm Cr(VI) konsantrasyonunda farklı ağırmetal ve metal varlığında hücre yoğunlukları (OD₆₀₀)

ZAMAN	Co ⁺² +Cr(VI)	Co ⁺²	Al ⁺² +Cr(VI)	Al ⁺²	Mn ⁺² +Cr(VI)	Mn ⁺²	Fe ⁺² +Cr(VI)	Fe ⁺²	Cu ⁺² +Cr(VI)	Cu ⁺²	KNTR Cr(VI)	KNTR TSB
12. saat	0,12	1,17	0,09	0,92	0,12	1,25	0,14	1,20	0,19	1,20	0,07	1,42
24. saat	0,15	2,00	0,10	1,92	0,13	2,70	0,16	1,90	0,71	1,82	0,07	2,05
36. saat	0,26	2,00	0,13	1,92	0,27	2,77	0,29	2,00	1,47	1,95	0,07	2,32
48. saat	2,25	2,62	0,16	2,40	0,48	3,60	2,50	2,50	2,20	2,00	0,09	2,40
60. saat	2,30	2,80	0,14	2,40	1,72	3,63	2,50	2,50	2,20	2,30	0,09	2,87
72. saat	3,00	3,00	1,00	2,40	2,00	4,00	3,00	3,00	2,60	2,30	0,10	3,07
84. saat	3,40	3,20	1,30	2,85	2,82	4,22	3,50	3,20	2,87	2,70	0,11	3,25
96. saat	3,50	3,30	2,00	3,00	3,00	4,25	3,70	3,20	2,90	3,00	0,46	3,25
108. saat	3,95	3,37	2,42	3,05	3,40	4,27	3,95	3,20	3,00	3,25	2,80	3,25

ZAMAN	Cd ⁺² +Cr(VI)	Cd ⁺²	Pb ⁺² +Cr(VI)	Pb ⁺²	Ba ⁺² +Cr(VI)	Ba ⁺²	Zn ⁺² +Cr(VI)	Zn ⁺²	Ni ⁺² +Cr(VI)	Ni ⁺²	KNTR Cr(VI)	KNTR TSB
12. saat	0,08	1,30	0,07	1,07	0,09	1,22	0,02	1,35	0,04	1,15	0,07	1,42
24. saat	0,08	1,47	0,13	1,45	0,10	1,47	0,07	1,48	0,10	1,25	0,07	2,05
36. saat	0,08	1,90	0,13	2,01	0,10	2,04	0,07	2,20	0,10	1,75	0,07	2,32
48. saat	0,08	1,92	0,13	2,01	0,10	2,04	0,08	2,27	0,10	2,00	0,09	2,40
60. saat	0,08	2,80	0,13	2,50	0,10	2,04	0,08	3,05	0,10	2,30	0,09	2,87
72. saat	0,08	2,80	0,13	2,50	0,10	2,04	0,09	3,05	0,10	2,50	0,10	3,07
84. saat	0,08	2,72	0,13	2,50	0,10	2,45	0,09	3,20	0,10	2,50	0,11	3,25
96. saat	0,11	2,60	0,13	2,50	0,11	2,45	0,13	3,39	0,11	2,50	0,46	3,25
108. saat	0,11	2,85	0,13	2,50	0,11	2,60	0,13	3,18	0,11	2,80	2,80	3,25
120. saat	0,11	3,00	0,13	2,50	0,11	2,70	0,13	3,20	0,11	3,00	3,00	3,25

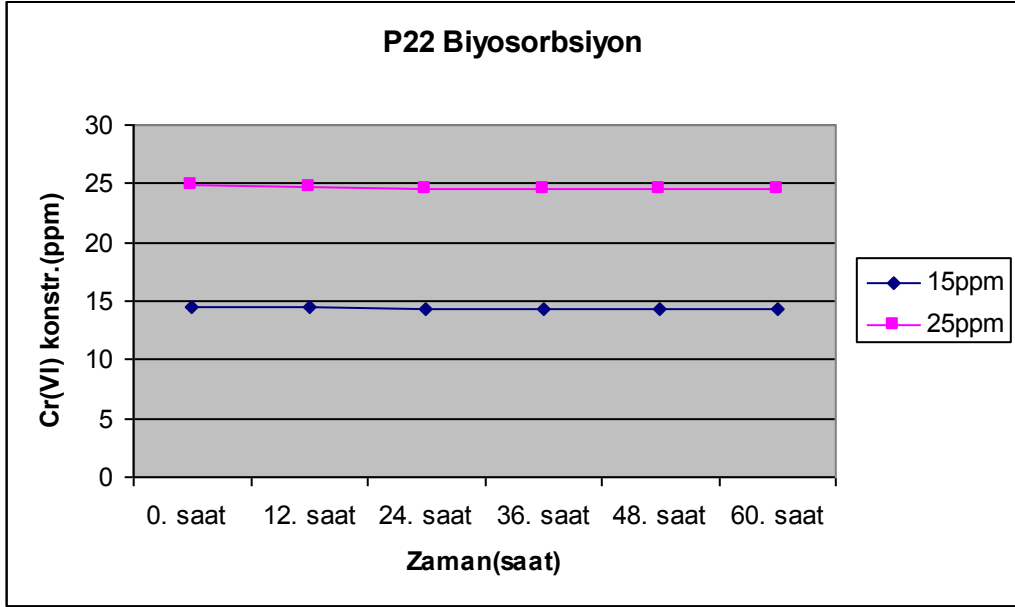
3.6. Biyosorbsiyon

Biyosorpsiyon deneyine göre 50 ppm krom konsantrasyonunda *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 bakterisi ilk 12 saatte yaklaşık olarak 3 ppm, 30 ppm krom konsantrasyonunda ise yalnızca 1 ppm Cr(VI)'u biyosorplamıştır. Çalışmanın ilerleyen saatlerinde krom miktarında herhangi bir azalma olmadığı ve biyosorpsiyonun durduğu gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda Şekil 19'da verilmiştir.



Şekil 19: *Pseudomonas mendocina* PASS3 -P18 bakterisinin 30 ve 50 ppm Cr(VI) konsantrasyonundaki biyosorbsiyonu

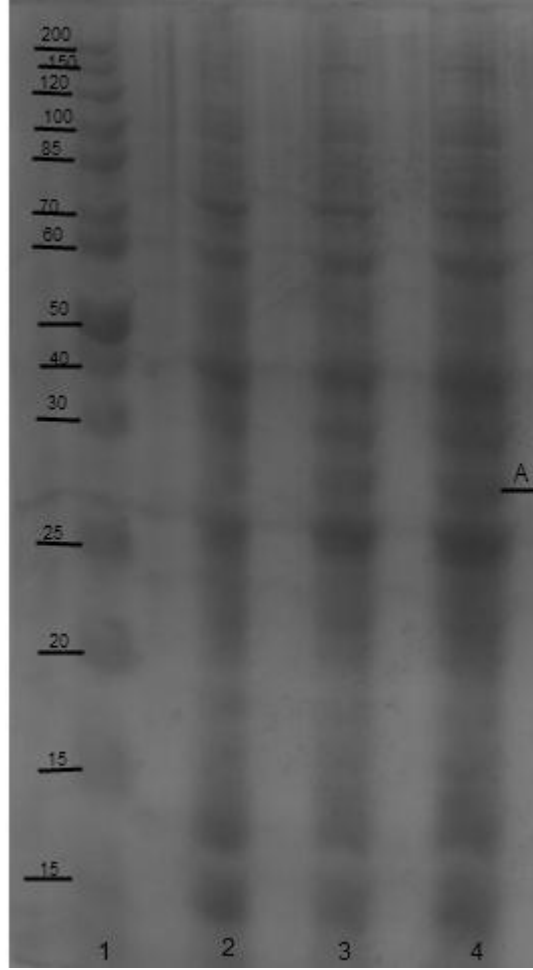
Pseudomonas mendocina DS0601-FX-P22 bakterisi ise biyosorpsiyon deneyine göre 15 ve 25 ppm Cr(VI) konsantrasyonlarında ilk 12 saatte 0,5 ppm kadar az bir miktarda Cr(VI)'yı biyosorplamıştır. Çalışmanın ilerleyen saatlerinde krom miktarında herhangi bir azalma olmadığı ve biyosorpsiyonun durduğu gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda şekil 20'de verilmiştir.



Şekil 20: *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisinin 15 ve 25 ppm Cr(VI) konsantrasyonundaki biyosorbsiyon

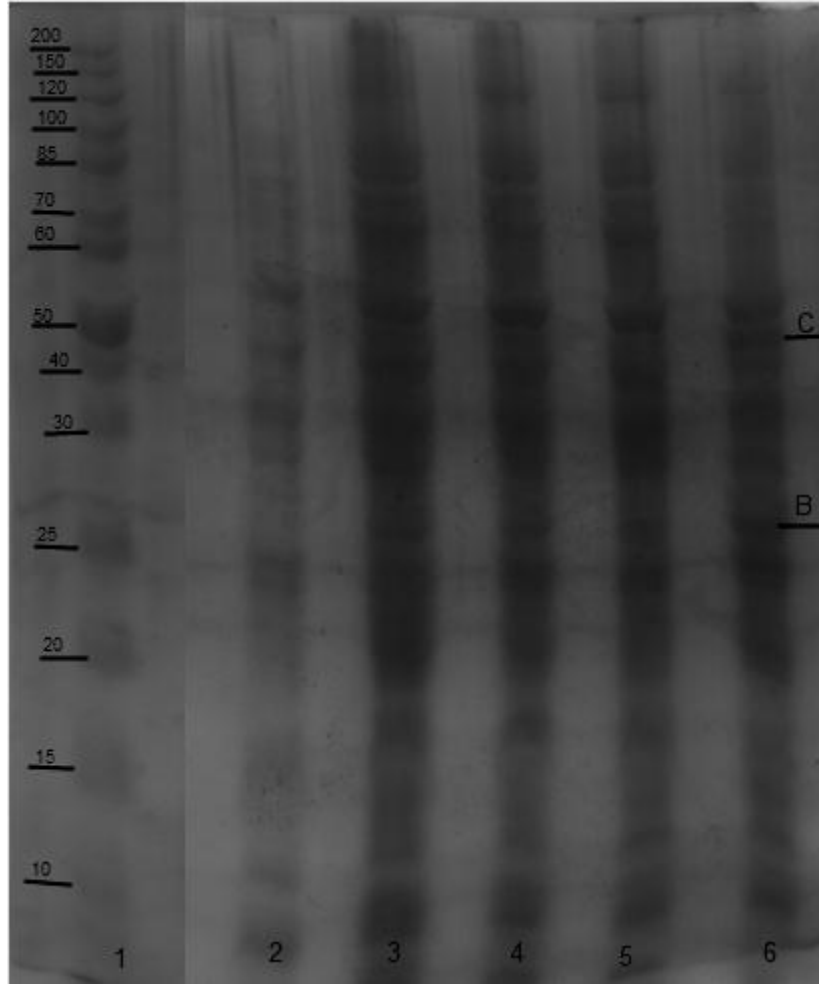
Bakteri yüzeyinde bulunan ekstrasellüler polimerik yapılar yani EPS molekülleri ile kromun etkileşim içinde olduğu bilinmektedir. Yapılan bu deney sonunda bakteri hücre yüzeyinde tutulan krom miktarı oldukça az olduğu görülmektedir. Bu da bakterinin biyosorbsiyon yapmadığının, aksine bakterinin kromu indirgediğinin bir kanıtıdır.

3.7. Elektroforez



Şekil 21: *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX-P22 suşunun periplazmik proteinlerinin SDS-PAGE profilleri. 1: Marker (SM-0661), 2: P22 (kromsuz), 3: P22, 10 ppm Cr(VI), 4: P22, 15 ppm Cr(VI),

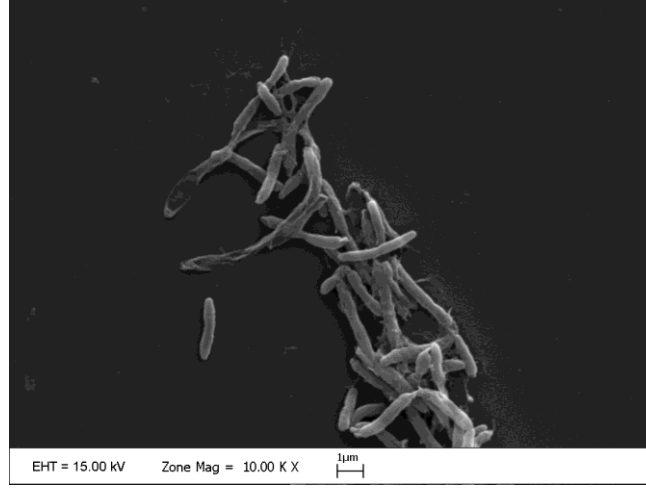
P. mendocina DS0601-FX-P22 bakterisinin SDS profili şekil 21’de verilmiştir. *P. mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisinde kromat redüktaz olabilecek tek bir protein bandı bulunmuştur. Bu protein bandının moleküler ağırlığı yaklaşık 31 kDa olarak hesaplanmıştır (Şekil 21, A).



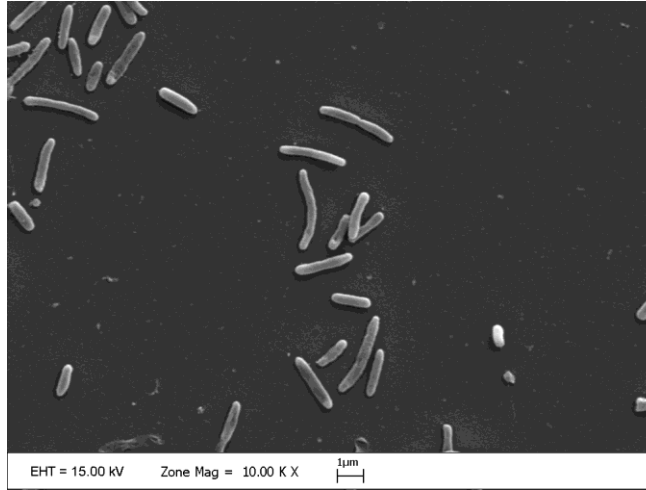
Şekil 22: *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 suşunun periplazmik proteinlerinin SDS-PAGE profilleri, 1: Marker (SM-0661), 2: P18 (kromsuz), 3: P18, 30 ppm Cr(VI), 4: P18, 50 ppm Cr(VI), 5: P18, 80 ppm Cr(VI), 6: P18, 110 ppm Cr(VI).

P. mendocina PASS3-P18 bakterisinin SDS profili şekil 22’de verilmiştir. *P. mendocina* PASS3-P18 de kromat redüktaz enzimi olabileceğini düşündüğümüz iki ayrı protein bandı gözlenmiştir. Bu protein bantlarından biri yaklaşık olarak 29 kDa (Şekil24, B) büyüklüğünde iken diğer bandın moleküler büyüklüğü yaklaşık olarak 52 kDa’dur(Şekil 24, C).

3.8. Scanning Elektron Mikroskop ile Görüntüleme



Şekil 23: *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 bakterisinin 110 ppm kromlu ortamdaki görüntüsü



Şekil 24: *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 bakterisinin kromsuz ortamdaki görüntüsü

Her iki ortamdaki hücreler dikkatle incelendiğinde kromlu ortamdaki hücrelerin daha uzun ve genişlemiş olduğu şekillerinde bir dejenerenin olduğu açıkça görülebilmektedir (şekil 23 ve 24).

4. TARTIŞMA

Çalışmada Pamukkale Üniversitesi Mikrobiyoloji laboratuvarı kültür stoklarından temin edilen 13 adet bakteri kullanılmıştır. Bakterilerin tür seviyesinde tespit ve tanımlanması günümüzde de yaygın bir genotipik yöntem olan 16 s rRNA analizi ile yapılmıştır. Bu yöntemle göre 16s ribozomal RNA geninin 500 baz çiftten oluşan bir bölümü veya hepsi PCR ile çoğaltarak DNA dizi analizi yapılır. Bu analiz sonunda 13 adet bakterinin 3'ü *Enterobacter cancerogenus*, 3'ü *Pseudomonas mendocina*, 1'i *Exiguobacterium aurantiacum*, 2'si *Pseudomonas stutzeri*, 2'si *Enterobacter cloacae* ve 1 tanesinin de *Streptomyces thermocarboxydus* olduğu görülmüştür. Bu suşların Cr(VI) indirgeme yetenekleri belirlenmiş ve farklı ağır metallerin krom indirgeme özelliklerine olan etkilerinin anlaşılabilmesi için bazı kültürel parametreler optimize edilmiştir. Bu amaçla, krom indirgemeye pH'nın etkisi, farklı krom konsantrasyonu ve ağır metallerin etkileri araştırılmıştır.

4.1. Krom İndirgemeye pH'ın Etkisi

Bakteriyal krom indirgemesinin pH, sıcaklık, hücre inokülasyon miktarı, krom konsantrasyonu ve karbon kaynakları gibi çok sayıda faktörle ilişkili olduğu bilinmektedir. Özellikle kültür başlangıç pH'sının krom indirgeme üzerinde önemi çok fazladır. Bir çok araştırmacı, sıklıkla krom indirgemedeki bakterilerin optimum pH değerlerini araştırmaktadırlar. Cheng ve Li (2009), *Bacillus* sp. MDS05 suşunun kromu indirgeme optimum pH aralığının 7.0–9.0 olduğunu, maksimum krom indirgemenin pH=8'de gerçekleştiğini bildirmektedirler. Aynı araştırmacılar bakterinin ekstrem pH değerlerinde (5.0, 6.0 ve 10.0) krom indirgeme oranının sınırlandığını da belirtmişlerdir. Camargo ve ark. (2003a) da kroma dirençli toprak bakterilerinde optimal pH'nın 7–8 aralığında olduğunu rapor etmişlerdir. *Bacillus* sp. ve *Pseudomonas fluorescens*'de optimum pH=7'dir, ve bakterilerin krom indirgemeleri pH=6'da inhibe olmaktadır (Wang ve Xiao, 1995). *Bacillus* sp. XW4 ve bir gram pozitif izolatta optimum başlangıç pH'sı ise 9'dur (Liu ve ark. 2004; Shakoori ve ark., 2000). *Bacillus coagulans* bakterisinde ise optimum pH=7'dir

(Philip ve ark. 1998). Bu optimal pH derecelerindeki değişiklik de, kromun detoksifikasyonunda maksimum Cr(VI) indirgemeye ulaşılabilmesi için farklı kùltürlerde optimum pH derecesinin belirlenerek, krom indirgeme için pH modifikasyonunun yapılmasının önemli olduğunu göstermektedir.

Buna yönelik biz de çalışmamızın ilk aşamasında izolatlarımızın en iyi krom indirgedikleri pH derecelerini belirledik. Bu amaçla Cr(VI) giderimi üzerine pH değişiminin etkisi pH 6, 7, 7.5, 8.5, 9 ve 9.5 aralığında hazırlanan besiyerleri kullanılarak araştırıldı. Besiyerlerinin pH'ları tampon kullanılarak sabitlenmiştir. Çalışma sonunda elde edilen sonuçlara göre, *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 bakterisi 110 ppm Cr(VI)'u pH=7'de inkùbasyonun 144. saatinde sıfırlamıştır. Diğer pH aralıklarında bakterinin kromu sıfırlama zamanının ortalama olarak 192. ve 240. saatler olduğu bulunmuştur. *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX-P22 suşu ise 25 ppm Cr(VI)'u pH=6'da inkùbasyonun 36. saatinde sıfırlamıştır. Diğer pH aralıklarında bakteri ortalama 48. ve 60. saatlerde Cr(VI)'u sıfırlamıştır. Şekil 9 ve 10'da görùldùęü gibi maksimum giderim *Pseudomonas mendocina* PASS3 -P18 suşu için pH=7 ve *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX-P22 için pH=6 olarak saptanmıştır. Bundan sonraki tüm çalışmalarımızda krom indirgeme deneyleri *Pseudomonas mendocina* PASS3 -P18 bakterisi için pH=7 ve *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX-P22 için ise pH=6'da gerçekleştirilmiştir.

4.2. Ağır metal ve Metallerin Krom İndirgemeye Etkisi

Tekstil, deri, boya, metal ve kâğıt endùstrilerinden kaynaklanan atık sular fazla miktarda ağır metal içermektedir. Bu tip atık suların arıtılmadan kontrolsüz bir Şekilde evreye boşaltılmaları o çevredeki canlılara toksik ve mutajenik etki yapmaktadır. Çeşitli metaller bazı organizmalarda canlılığın devam ettirilmesi için çok az miktarlarda kullanılsalar da yüksek konsantrasyonları hücrede zararlı etkilere yol açmaktadır. Ag^{+1} , Al^{+1} , Au^{+2} , Cd^{+1} , Pb^{+2} ve Hg^{+2} gibi toksik metallerin ise biyolojik önemi bulunmamakla birlikte hücrede düşük konsantrasyonda bile bulunmaları tehlikeli olmaktadır (Malik, 2004; Madigan ve ark., 2003; Mergeay ve ark., 2003; Nies, 2003; Bruins ve ark., 2000). Bu nedenle endùstriyel atık sulardan öncelikle ağır metallerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Yapılan birçok çalışmada, ağır metallerin çeşitli mikroorganizmalarla endùstriyel atıksulardan uzaklaştırıldığı gösterilmiştir. Mikroorganizmaların toksik, karsinojen ve mutajen olabilen ağır metal

iyonlarına tolerans gösterip bu kirleticileri ortamdan uzaklaştırabilmesi ağır metallere direnç geliştirmeleri ile gerçekleşmektedir.

Genelde ağır metal alımın kapasiteleri çalışılan tre bağlı olarak önemli farklılıklar göstermektedirler. Kennish'in (1992) listesinde deniz flora ve faunası üzerine ağır metallerin göreceli toksisiteleri şöyle sıralanmıştır; Hg>Cd>Cu>Zn>Ni>Pb>Cr>Al>Co. Ağır metallerin biyolojik bulunurlulukları sedimentin katyon değiştirme kapasitesine, su ve sedimentin pH'sına, redoks potansiyeline, suyun sıcaklığına, tuzluluğuna, organik içeriğine ve diğer ağır metallerin konsantrasyonuna bağlıdır (Ward, 1989; Wahbeh, 1984).

Hekzavalent kromun bakterilerde rapor edilen görülebilir etkileri arasında, hücre uzaması, genişlemesi ve genellikle hücre büyüme inhibisyonuna yol açan inhiye olmuş hücre bölünmeleridir (Coleman ve Paran, 1983; Theodou ve ark., 1976). Ağır metallere toprak biyokütlesini üzerinde toksik etki gösterirler ve anahtar mikrobiyal süreci etkileyerek mikroorganizmaların sayılarını ve aktivitelerini azaltırlar (Obbard ve ark., 2001). Mikrobiyal populasyonun genellikle toprak ekolojisi üzerindeki insan kaynaklı etkilerin kolay ve duyarlı bir göstergesi olduğu ileri sürülmüştür. Cr(VI)'nın toprakta mikrobiyal populasyonun bileşiminde değişimlere sebep olduğu kesindir ve yüksek konsantrasyonları mikrobiyal hücre metabolizmasında zararlı etkilere neden olmaktadır.

Kromun bakteriyal giderimi ile ilgili optimizasyon çalışmaları çoğunlukla pH, konsantrasyon, karbon kaynakları, elektron dnorleri ve sıcaklık gibi çevresel faktörlerin etkileri üzerinde yoğunlaşmaktadır. Hiç kuşkusuz ki toprak veya su gibi ekosistemler aynı zaman da çok farklı metal-ağır metallere ile kirletilmektedir. Bu ekosistemlerde hem mikroorganizmaların bu tür ağır metallere olan ilişkileri hem de ağır metallere birbirleriyle olan etkileşimleri mikrobiyal krom indirgemeyi etkilemektedir. Ağır metallere krom indirgemeye olan etkileri ile ilgili yaptığımız literatür taraması konunun çok yoğun olarak çalışılmadığını göstermiştir. Konu ile ilgili çok az literatür bilgisi elde edilmiş ve bu yüksek lisans tez çalışması ile literatürde eksik olan bir kısım tamamlanmaya çalışılmıştır.

Çoğunlukla Cu⁺² metalinin krom indirgeme üzerine etkileri birçok araştırmacı tarafından merak edilen ve çalışılan bir konudur. Pal ve ark. (2005) 100 μM Cu⁺² varlığında *Bacillus sphaericus* AND303 suşunda %70 ve *E. coli* bakterisinde %33

oranında Shen ve Wang (1994b), Ohtake ve ark. (1990) *Enterobacter cloacae* bakterisinde Cr(VI) redüktaz aktivitesinin azaldığını rapor etmişlerdir. İlk kez Camargo ve ark.(2003b) *Bacillus* sp. ES 29 suşunun Cell Free ekstraktlarında Cu^{+2} 'nin Cr (VI) indirgeme üzerinde teşvik edici bir etkisinin olduğunu söylemiştir. Daha sonraki çalışmalarda bunu destekler nitelikte olmuş ve Desai ve ark. (2008) *Pseudomonas* sp. G1DM21 suşunda bu metalin kromat redüktaz aktivitesi üzerinde %33 oranında teşvik edici bir etkisinin olduğunu, Mclean ve Beveridge (2001) *Pseudomonad* CRB5 suşunda teşvik edici etkisi olduğunu rapor etmiştir. Diğer bir çalışmada yaklaşık 1mM Cu^{+2} 'nin mikroorganizmalar için toksik olabileceği düşünülürken, 1mM Cu^{+2} 'nin Cr(VI) indirgemelerini arttırdığı rapor edilmiştir. Çünkü Cu^{+2} metalinin kromat redüktaz enzimini O^{+2} 'den koruduğu bulunmuştur (Ettinger, 1984).

Bizim çalışmamızda Cu^{+2} metalinin *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 ve *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX-P22 suşlarının her ikisi içinde Cr(VI) indirgemelerini teşvik edici bir etkisinin olduğunu bulduk. *P. mendocina* PASS3-P18 bakterisinde 30 ppm krom konsantrasyonunda kontrol grubu indirgemeyi 48 saatte tamamlarken Cu^{+2} varlığında bu süre 24 saat, 50 ppm krom konsantrasyonunda kontrol 72 saat iken metal varlığında 36 saat olarak bulunmuştur. *P. mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisinde 25 ppm krom varlığında kontrol grubu 96 saatte indirgemeyi tamamlarken Cu^{+2} varlığında 36 saatte, 15 ppm krom konsantrasyonunda kontrol 72 saatte tamamlarken Cu^{+2} varlığında 12 saatte indirgemeyi tamamlamıştır. Yaptığımız çalışmalar, yukarıda belirtilen çalışmaları doğrular niteliktedir.

Genel olarak, Cu^{+2} metalinin kromat redüktaz aktivitesini nasıl stimüle ettiği henüz tam olarak açıklanamamıştır. Ancak Cu^{+2} metali bir geçiş metalidir ve çoğu redüktaz enziminin prostetik gurubunu oluşturmaktadır. Cu^{+2} 'nin temel fonksiyonu; ilgili transport sistemini korumaktır. Bazı durumlarda da, tek elektron redoks merkezi gibi hareket ederek protein alt üniteleri arasında elektron transferinde görev almaktadır (Abe ve ark., 2001)

Çalışmamızda her iki bakterimiz içinde Cr(VI) indirgemelerini teşvik edici diğer bir metal Fe^{+2} 'dir. Literatürde krom indirgeme üzerine Fe^{+2} 'nin etkisi konulu herhangi bir çalışma bulunmamıştır. *P. mendocina* PASS3-P18 bakterisinin kromu sıfırlama zamanı 50 ppm krom konsantrasyonunda 72 saat olarak tespit edilmiştir. Bu süre 30

ppm de 48 saat olarak kaydedilmiştir. Besiyerine 52 ppm Fe^{+2} ilave edildiğinde bakterinin 50 ppm ve 30 ppm kromu sırasıyla 48 ve 36 saatte sıfırladığı tespit edilmiştir. Aynı durum *P. mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisi için de gözlenmiştir. Kontrol ile kıyaslandığında Fe^{+2} ilavesinin kromu indirgemeyi hızlandırdığı görülmüştür. Bakteri, 25 ppm krom varlığında 96 saatte indirgemeyi gerçekleştirirken Fe^{+2} ilavesinde bu süre 36 saate düşmüştür. Krom konsantrasyonu 15 ppm iken 72 saatte krom indirgemesi tamamlanırken bu süre Fe^{+2} ilavesi ile 24 saat olarak tespit edilmiştir. Fe^{+2} 'nin bakteriler için esansiyel bir metal olduğu ve bakterilerin bu metali gelişim faktörü olarak kullandıkları bilinmektedir. Yaptığımız çalışmada bakterilerin Fe^{+2} varlığında diğer metallere kıyasla daha iyi geliştikleri gözlenmiştir (Bkz.Tablo 14,15,16 ve 17). Elde edilen sonuçlar, hücre yoğunluğu ile krom indirgeme arasında olumlu bir ilişki olduğunu düşündürmüştür.

Sultan ve Hasnain (2007) *Ochrobactrum intermedium* bakterisi ile yapmış olduğu çalışmada Co^{+2} ve Mn^{+2} varlığında Cr(VI) indirgemesinde artışın olduğunu rapor etmiştir. *Bacillus sphaericus* suşu ile yapılan çalışmada Co^{+2} 'ın, 20mg/ml'nin altında ve 100mg/ml'nin üstündeki konsantrasyonlarda krom indirgemesi üzerine inhibe edici bir etki gösterdiği bulunmuştur (Pal ve Paul, 2004). Pal ve ark.(2005) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, *Bacillus sphaericus* AND303 suşunda 100µM Co^{+2} varlığında Cr(VI) redüktaz aktivitesinin %7 oranında arttığı rapor edilmiştir. Çalışmamızda kullanılan Co^{+2} ve Mn^{+2} metalleri *P. mendocina* PASS3-P18 bakterisinde krom indirgemesi üzerinde inhibe edici bir etki tespit edilirken *P. mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisinde bu ağır metallerin Cr(VI) indirgemesini arttırdığı gözlenmiştir. *P. mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisinde 25 ppm krom konsantrasyonunda kontrol grubu krom indirgemeyi 96 saatte tamamlarken Co^{+2} varlığında bu süre 48, Mn^{+2} varlığında 60 saat olarak bulunmuştur. Aynı bakterinin 15 ppm krom konsantrasyonunda 72 saatte kontrol grubunda krom indirgeme tamamlanırken Co^{+2} varlığında 24 saat, Mn^{+2} varlığında 48 saattir. Yukarıda belirtilen araştırmacıların rapor ettikleri kobalt ve manganın teşvik edici etkisi *P. mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisinde de görülmüştür. Her iki metalin varlığında krom indirgemesinde artışın olması literatür bilgilerini destekler niteliktedir. Ancak *P. mendocina* DS0601-FX-P22'nin aksine *P. mendocina* PASS3-P18 bakterisi kobalt ve mangan içeren besiyerinde geliştirildiğinde, bakterinin krom indirgemesinin azaldığı görülmüştür. Bu sonuç, suş farklılığından kaynaklanmaktadır.

Pal ve Paul'un 2004 yılında 34 tane kroma dirençli bakteri üzerinde yapmış oldukları krom indirgeme çalışmalarında Ni^{+2} , Co^{+2} , Cd^{+2} ve Pb^{+2} gibi metal iyonlarının varlığında Cr(VI) indirgemesinin önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur. Bu çalışmada Ni^{+2} 'in 20 mg/L'de çok toksik olduğu ve Co^{+2} 'in ise yüksek konsantrasyonlarda Cr(VI) indirgemesini inhibe ettiği bulunmuştur (Pal ve Paul 2004). *Acinetobacter haemolyticus* bakterisi ile yapılan Cr(VI) indirgeme çalışmasında 30mg/L Zn^{+2} ve Cd^{+2} varlığında Cr(VI) indirgemesinin %90'dan daha fazla oranda Pb^{+2} 'da ise %82,54 oranında azaldığı bulunmuştur (Zakaria ve ark., 2007).

Enterobacter cloacea'da Zn^{+2} , Ni^{+2} ve Ba^{+2} gibi divalent katyonların varlığında membrana bağlı kromat redüktaz aktivitesinde önemli bir etki bulunmamaktadır (Ohtake ve ark. 1990). Bununla birlikte *Bacillus sphaericus* AND303 suşunda Ni^{+2} metali redüktaz aktivitesi üzerine güçlü bir inhibe etkiye sahiptir. *Ochrobactrum sp.* (Sultan ve Hasnain 2007), *Ochrobactrum intermedium* SDCr-5 (Sultan ve Hasnain 2007), *Bacillus sp.* (Elangovan ve ark., 2006) ve *E. coli* ATCC 33456 (Bae ve ark., 2005) suşlarında Zn^{+2} metal varlığında Cr(VI) indirgemesi inhibe olmaktadır.

Pb^{+2} ve Cd^{+2} metalleri *Ochrobactrum intermedium* SDCr-5 suşunun krom indirgeme yeteneğini sırasıyla %14 ve %25 oranında inhibe etmektedir. Bu metallerin aksine Ni^{+2} varlığında indirgeme hızında bir artış olmaktadır (Sultan ve Hasnain 2007). Buna ilaveten *Bacillus sphaericus* AND 303 suşunda Cr(VI) redüktaz aktivitesi 100 μM Ni^{+2} ve Cd^{+2} varlığında %70 oranında düşerken (Pal ve ark., 2005) *E. coli* bakterisinde Zn^{+2} Cr(VI) indirgemesinin %16 oranında azaldığı bulunmuştur. Ancak metallerin düşük konsantrasyonları için aynı sonucun geçerli olmadığı da rapor edilmiştir (Shen ve Wang, 1994). *B. sphaericus* suşunda Cr(VI) indirgeme üzerine Ni^{+2} , Cd^{+2} ve Pb^{+2} metallerinin 20 mg/ml'nin altında ve 100 mg/ml'nin üstündeki konsantrasyonlarda inhibe edici etkisi bulunmamaktadır (Pal ve Paul 2004). Camargo ve ark. (2003b)'ına göre *Bacillus sp.* ES 29 suşunun kromat redüktaz enzim aktivitesi üzerine, Zn^{+2} 'nin teşvik edici veya inhibe edici herhangi bir etkisi yoktur.

Bizim yapmış olduğumuz çalışmada *P. mendocina* PASS3-P18 bakterisi için bulunan sonuçlarda 30 ppm krom konsantrasyonunda Al^{+2} , Pb^{+2} , Ba^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+2} ve Zn^{+2} metallerinin varlığında Cr(VI) indirgemesinin kontrol grubuna göre %33 oranında azaldığı bulunurken bu durum Cd^{+2} metalinin varlığında %50 olarak tespit edilmiştir. Aynı bakterinin 50 ppm konsantrasyonunda Ba^{+2} ve Ni^{+2} metalleri Cr(VI) indirgemesini %40, Pb^{+2} %33, Al^{+2} %25 oranında azaltmıştır. *P. mendocina* PASS3-

P18 bakterisinin 50 ppm krom konsantrasyonunda Cd^{+2} ve Zn^{+2} metallerinin varlığında krom indirgememesinin belli bir süre devam ettiği ancak sonrasında Cr(VI) indirgememesinin durduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 30 ppm krom konsantrasyonu varlığında metallerin krom indirgeme oranında güçlü inhibe edici etkileri $Cd^{+2}>Ni^{+2}>Zn^{+2}>Al^{+2}>Pb^{+2}>Mn^{+2}>Ba^{+2}>Co^{+2}$ şeklinde sıralanabilir. Cu^{+2} ve Fe^{+2} metallerinin ise teşvik etkileri bulunmuştur. Konsantrasyon 50 ppm olduğunda ise bu sıralama $Cd^{+2}>Zn^{+2}>Ba^{+2}>Ni^{+2}>Pb^{+2}>Al^{+2}>Mn^{+2}>Co^{+2}$ şeklindedir (tablo 9 ve 10). Çalışma sırasında konsantrasyon artışına bağlı olarak Cd^{+2} ve Zn^{+2} metallerinin varlığında bakterinin krom indirgememesinin 132. saatten itibaren durduğu ve kromu sıfırlamadığı gözlenmiştir. Bu ortamlardaki hücre yoğunluğu (OD=600 nm) Cd^{+2} için 2.40 ve Zn^{+2} için 3.24'tür (tablo 15). Elde edilen sonuç krom konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak enzim aktivitesinin metallerle tamamen inhibe olduğunu düşündürmüştür.

P. mendocina DS0601-FX-P22 bakterisi 15 ppm krom konsantrasyonunda ve Al^{+2} içeren besiyerinde geliştirildiğinde, bakterinin kontrol grubu ile aynı zamanda indirgemeyi tamamladığı tespit edilmiştir. Diğer bir değişle bu konsantrasyonda Al^{+2} 'un herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Buna benzer bir sonuç Camargo ve ark. (2003b) tarafından *Bacillus* sp. ES 29 suşunda ve Zn^{+2} varlığında rapor edilmiştir. Konsantrasyon 25 ppm olduğunda ise Al^{+2} 'un teşvik edici etkisi olduğu dikkat çekmiştir. Bu konsantrasyonda bakterinin krom indirgeme hızı kontrol grubuna kıyasla %14 oranında arttığı görülmüştür. 15 ppm krom konsantrasyonunda *P. mendocina* DS0601-FX-P22 suşunun kromu indirgeme oranı, Pb^{+2} ve Cd^{+2} varlığında %25, Ba^{+2} , Ni^{+2} ve Zn^{+2} varlığında ise %33 oranında düşmüştür. 25 ppm krom konsantrasyonunda ise Al^{+2} metalinin krom indirgemeyi %14 oranında arttırdığı bulunmuştur. Bu konsantrasyonda Pb^{+2} , Cd^{+2} ve Zn^{+2} varlığında krom indirgeme %20 oranında azalırken, Ba^{+2} ve Ni^{+2} varlığında krom indirgeme bir süre devam ettikten sonra sabitlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 25 ppm krom konsantrasyonu varlığında metallerin krom indirgeme oranında güçlü inhibe edici etkileri $Ni^{+2}>Ba^{+2}>Cd^{+2}>Zn^{+2}>Pb^{+2}$ şeklinde sıralanabilir. Cu^{+2} , Fe^{+2} , Mn^{+2} , Al^{+2} ve Co^{+2} metalleri ise teşvik edici etkiye sahiplerdir ($Cu^{+2}>Fe^{+2}>Co^{+2}>Mn^{+2}>Al^{+2}$). *P. mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisinde Cu^{+2} ve Fe^{+2} dışında Mn^{+2} , Al^{+2} ve Co^{+2} 'ın teşvik etkisinin olması suş ve konsantrasyon farklılığından kaynaklandığı söylenebilir.

4.3. Başlangıç Krom Konsantrasyonunun İndirgemeye ve Hücre Gelişimine Etkisi

Thacker ve Madamwar (2005) 50-300 ppm arasında farklı krom konsantrasyonlarında *Ochrobactrum sp.* ile yapmış oldukları çalışmada 300 ppm krom konsantrasyonunda indirgemenin en aza indiğini bularak bunun sebebini kromun toksik etkisinin hücre gelişimini olumsuz etkilemesi olarak açıklamışlardır. Laxman ve More (2002) *Streptomyces griseus* bakterisinde krom konsantrasyonunun artması ile krom indirgeme oranının azaldığını rapor etmiştir. Çalışmasının sonunda ise krom indirgeme oranının krom konsantrasyonu ile bağlantısının olmadığını, kültürün yaşı ile krom indirgemenin arttığını söylemiştir. Ashwini ve ark. 2008 yılında aynı bakteri ile yapmış oldukları çalışmada düşük krom konsantrasyonunda indirgemenin daha hızlı ve komplike olduğunu yüksek konsantrasyonlarda ise daha uzun inkübe sürelerine ihtiyaç duyulduğunu rapor etmişlerdir. Pal ve Paul (2004) kroma dirençli 34 tane bakteriden oluşan bir grup üzerinde yapmış oldukları çalışmada başlangıç krom konsantrasyonu ve hücre yoğunluğunun artması ile indirgemenin arttığını bulmuşlardır.

Büyüyen kültüre Cr(VI) eklenmesiyle hücre canlılığında bir azalışa rağmen, bazı *Enterobacter cloacae* (Wang ve ark., 1989b), *E. coli* (Shen ve Wang, 1994b), *P. fluorescens* (Wang ve Xiano, 1995) ve *Bacillus sp.* (Wang ve Xiano, 1995) kültürlerinde başlangıç Cr(VI) oranının artmasıyla Cr(VI) indirgeme oranı artmaktadır. Benzer sonuç *E. coli* kültürlerinde gözlenmiştir (Shen ve Wang, 1994b).

P. mendocina PASS3- P18, başlangıç krom konsantrasyonu 30 ppm iken kromu indirgeme zamanı 48 saat 50 ppm de bu süre 72 saat olarak kaydedilmiştir. Krom miktarındaki artışa bağlı olarak indirgeme zamanı da artmıştır. Bakterinin kromlu ve kromsuz ortamdaki hücre gelişimine bakıldığında (tablo 15, 16, şekil 8) 72. saatte kromsuz ortamda hücre yoğunluğu $OD_{600}=4.20$ iken kromlu ortamda $OD_{600}=2.67$ 'dir. Burada krom konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak indirgeme süresinin uzaması kromun hücreler üzerine toksik etkisinden kaynaklanmaktadır. Aynı sonuç *P. mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisi için de geçerlidir. Konsantrasyon artışına bağlı olarak kromun indirgeme süresinde de bir artış olmuştur (Tablo 16, 17, şekil 7). Bakterinin kromun toksik etkisi elimine edildikten sonra geliştiği gözlenmiştir. Bir diğer değişle krom sıfırlandıktan sonra bakteri gelişmeye başlamıştır.

4.4. Krom Varlığında Kromat Redüktazın İndüklenmesi

Park ve ark., 2000 yılında yapmış oldukları çalışmada *Pseudomonas putida* MK1'den saflaştırdıkları kromat redüktazın moleküler ağırlığının yaklaşık 20 kDa olduğunu belirlemişlerdir. *P. ambigua*'dan saflaştırılan kromat redüktazın moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 25 kDa ve Native-PAGE ile 65 kDa civarında tespit edilmiştir (Suzuki ve ark., 1992). *P. aeruginosa* (Ganguli ve Tripathi, 2001) ve *Ochrobactrum* sp.(Thacker ve Madamwar, 2005)'de bu protein yaklaşık 30 kDa ağırlığındadır. 100µg/ml Cr(VI) varlığında geliştirilen *Bacillus* sp. JDM-2-1 ve *S. capitis* bakterilerinde 25 kDa moleküler ağırlığına sahip bir protein bandının indüklendiği ve bu proteinin kromat redüktaz olduğu rapor edilmiştir (Zahor ve Rehman, 2009). *Thermus scoductus*'da yeni bir kromat redüktaz varlığından bahsedilmiştir. Yaklaşık 36 kDa büyüklüğüne sahip olan bu enzim bir oksidoredüktaz olup homodimerik yapıdadır. İlgili gen *E. coli*'ye aktarıldığında proteinin 38 kDa büyüklüğüne sahip olduğu rapor edilmiştir.

Kromat redüktaz enzimi indükleme çalışmamızda bakteriler kromlu ve kromsuz ortamda geliştirilmiş ve elde edilen sonuçlar şekil 9 ve 10'da verilmiştir. Şekil 23'de de görüldüğü gibi *P. mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisinde 31 kDa civarında bir protein bandı indüklenirken *P. mendocina* PASS3-P18 de (Şekil 22) iki ayrı protein bandı gözlenmiştir. Bu protein bantlarından biri yaklaşık olarak 29 kDa büyüklüğünde iken diğer bandın moleküler büyüklüğü yaklaşık olarak 52 kDa'dur. Her iki bakteride de tespit edilen, 31 ve 29 kDa büyüklüğünde olan protein bandları konu ile ilgili yapılan diğer çalışmaları destekler niteliktedir. Ancak *P. mendocina* PASS3-P18 bakterisinde 52 kDa büyüklüğüne sahip ikinci bir proteinin varlığı bize mikrobiyal krom indirgemenin çok daha detaylı araştırılması gerektiğini göstermektedir.

4.5. Scanning Elektron Mikroskop (SEM) Analizi

SEM analizi (Şekil 23 ve 24) göstermiştir ki *P. mendocina* PASS3-P18 kromsuz ortamda geliştirildiğinde hücreler oldukça belirgin ve düzgün, hücre duvarı kesintisizdir. Ancak bakteri kroma maruz bırakıldığında hücre şeklinde bir bozulma ve aynı zaman da hücrelerde uzama gözlenmiştir. Hücre duvarında görülen parçalanmanın yanı sıra bakterinin EPS ürettiği ve topluluklar halinde olduğu dikkat

çekmiştir. Kromun toksik etkisinin TEM analizi sonunda hücre şekil kaybı Zakaria ve ark. (2007) tarafından da rapor edilmiştir. Ackerley ve ark. (2006) *E. coli* K-12 suşu ile yapmış oldukları çalışmada krom stresinden hücrelerin nasıl etkilendiğini kapsamlı olarak araştırmış ve SEM analizi ile meydana gelen değişiklikleri görüntülemişlerdir. Kromlu ortamdaki hücrelerin daha uzun formda olduklarını ancak zamanla kromlu ortamdaki hücrelerin morfolojilerinde kısmi toparlanma meydana geldiğini rapor etmişlerdir. Çalışmanın devamında ise kromlu ortama, kroma adapte olmuş ve olmamış hücreler ilave edilmiştir. SEM analizinde kroma adapte olan hücrelerin morfoloji ve gelişimlerinin adapte olmayan hücrelere oranla çok daha az etkilendiği görülmüştür (Ackerley ve ark., 2006).

5. SONUÇ

Bu tezin araştırma konusu olan ağır metal ve metallerin, kromun indirgemesi üzerine etkileri hakkında çok detaylı araştırmalar mevcut değildir. Çalışmamız sonunda elde edilen verilere göre kullanılan ağır metallere Cu^{+2} ve Fe^{+2} 'nin her iki bakteri için krom indirgemeyi stimüle ettiği ortaya çıkmıştır. Ayrıca *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisi ile yapılan 25 ve 15 ppm krom konsantrasyonundaki deneylerde diğer *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 bakterisinden farklı olarak Co^{+2} ve Mn^{+2} ağır metallerinin krom indirgemesini stimüle ettiği bulunmuştur. Al^{+2} 'un *P. mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisinde 25 ppm krom konsantrasyonunda krom indirgeme üzerinde stimüle edici etkisi bulunurken 15 ppm krom konsantrasyonunda ise kontrol ile aynı sürede krom indirgemeyi tamamladığı görülmüştür. Çalışmada kullanılan diğer ağır metallerin ise her iki bakteri için krom indirgeme üzerine olumsuz etkisi olduğu ortaya çıkmıştır. Bu durumu bu ağır metallerin bakteriler için esansiyel olmaması ve yapmış olduğu toksik etkinin bir sonucu olarak açıklayabiliriz.

Çalışmamızda yapılan scanning elektron mikroskopu görüntülemesinde kromlu ve kromsuz ortamdaki hücreler karşılaştırıldığında kromlu ortamdaki hücrelerin dejenere olmuş yapıları ortaya çıkmaktadır.

P. mendocina PASS3-P18 bakteri için yapılan biyosorbsiyon deneylerinde bakterinin hücre yüzeyinde kromu tutmadığı görülmüştür. Bu sonuç çalışmamızda kullanılan bakterinin kromu gerçekten indirgediğine bir kanıttır.

Çalışmamızda yapılan SDS-PAGE analizi sonucunda *P. mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisinde 31 kDa civarında bir protein bandı indüklenirken *P. mendocina* PASS3-P18 de iki ayrı protein bandı gözlenmiştir. Bu protein bantlarından biri yaklaşık olarak 29 kDa büyüklüğünde iken diğer bandın moleküler büyüklüğü yaklaşık olarak 52 kDa'dur.

KAYNAKLAR

- Abe F, Miura T, Nagahama T, Inoue A, Usami R, Horikoshi K (2001) Isolation of a highly copper-tolerant yeast, *Cryptococcus sp.*, from the Japan trench and the induction of superoxide dismutase activity by Cu^{+2} . *Biotechnol Lett* 23:2027–2034
- Abollino, O., Malandrines, A.M., Sarzanini, C., Mentasti, E. (2003). Adsorption of heavy metals on Na-montmorillonite. Effect of pH and organic substances. *Water Res.* 37, 1619–1627.
- ACGIH (*American Conference of Governmental Industrial Hygienists*), (2004), Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. ACGIH, Cincinnati, OH, USA.
- Ackerley, D.F., Gonzalez, C.F., Keyhan, M., Blake, R., and Matin, A., (2004), Mechanism of chromate reduction by the *Escherichia coli* protein, NfsA, and the role of different chromate reductases in minimizing oxidative stress during chromate reduction. *Environmental Microbiology*, 6 (8), 851–860.
- Ackerley, D.F., Barak, Y., Lynch, S.V., Curtin, J. & Matin, A., (2006), Effect of chromate stress on *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 188, 3371-338.
- Adams, W. J., Kimerle, R. A., Barnett, J. W., (1992). Sediment Quality and Aquatic Life Assessment. *Environ. Sci. Technol.*, 26: 1865- 1875.
- Adriano, D.C. (1986). *Trace elements in the environment*. Chapter 5: Chromium, Springer-Verlag, New York.
- Aguilera, S., Aguilar, M.E., Cha' vez, M.P., Lo' pez-Meza, J.E., Pedraza- Reyes, M., Campos-García, J., Cervantes, C., (2004). Essential residues in the chromate transporter ChrA of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters* 232, 107–112.
- Aksu, Z., Gönen, F., Demircan, Z. (2002). Biosorption Of Chromium (VI) Ions By Mowital B3OH resin Immobilization Activated Sludge In A Packed Bed: Comparison With Granular Activated Carbon. *Process Biochemistry*. 38, 175–186.
- Aksu, Z., Kılıç, N.K., Ertuğrul, S., Dönmez, G. (2007). Inhibitory effects of chromium(VI) and Remazol Black B on chromium(VI) and dyestuff removals by *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 1167-1174
- Alabaster, J. S., Lloyd, R., (1982). *Water Quality Criteria for Freshwater Fish*. Butterworth, London
- Alcedo, J., Wetterhahn, K. E., (1990). Chromium Toxicity and Carcinogenesis. *Int. Rev. Exp. Path.*, 31: 85- 107.

- Anderson, R. A. (1989). Essentiality of chromium in humans. *Sci. Tot. Environ.* 86: 75–81.
- Anderson, R. A., M. M. Polansky, N. A. Bryden, S. J. Bhathena, and J. Canary. (1987). Effects of supplemental chromium on patients with symptoms of reactive hypoglycemia. *Metabolism* 36: 351–355.
- Anon. (1974). Medical and Biological effects of pollutants: chromium. *National Academy Press*, Washington.
- APHA., (1995)., Standard Methods for the Examinations of Water and Wastewater, 19th ed., American Public Health Association, Washington, DC
- Arnold, R., T. DiChristina, and M. R. Hoffman. (1988). Reductive dissolution of Fe (III) oxides by *Pseudomonas sp* 200. *Biotechnol. Bioeng.* 32: 1081–1096.
- Arora, N.R., Pandey, G.N. (1984). Heavy Metal And Health. *J. Inst. Eng.* 65, 1–6.
- Ashwini C. Poopal R. Seeta Laxman, (2008) Hexavalent chromate reduction by immobilized *Streptomyces griseus*. *Biotechnol Lett* 30:1005–1010
- Asthana, S., Rusin, P., ve Gerba, C. P., (1997) “Influence of hydrocarbons on the virulence and antibiotic sensitivity associated with *Pseudomonas aeruginosa*”, *Int. J. Environ. Health Research*, 7: 277–287.
- Badar, U., N. Ahmed, A. J. Beswick, P. Pattanapitpaisal, ve L. E. Macaskie. (2000). Reduction of chromate by microorganisms isolated from metal contaminated sites of Karachi, Pakistan. *Biotechnol. Lett* 22: 829–836.
- Bae W.C. , Lee H. K. , Choe Y. C. , Jahng D. K. , Lee S. H. , Kim S. J. , Lee J.H., Jeong B.C. (2005) . Purification and characterization of NADPH-dependent Cr(VI) reductase from *Escherichia coli* ATCC 33456. *J Microbiol*;43:21–7
- Bae, W., T. Kang, J. Jung, C. Park, S. Choi, ve B. Jeong. (2000). Purification and characterization of NADH-dependent Cr(VI) reductase from *Escherichia coli* ATCC 33456. *J Microbiol Biotechnol* 10: 580–586.
- Bailar, J.C., (1997). Chromium. In: Parker, S.P. (Ed.), McGraw-Hill Encyclopedia of Science and Technology, eighth ed. vol. 3. *McGraw-Hill*, New York.
- Baldi, F., A. M. Vaughan, ve G. J. Olson. (1990). Chromium(VI)-resistant yeast isolated from a sewage-treatment plant receiving tannery wastes. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 913–918.
- Bar, C., Patil, R., Doshi, J., Kulkarni, M.J., Gade, W.N. (2007). Characterization of the proteins of bacterial strain isolated from contaminated site involved in heavy metal resistance-A proteomic approach. *Journal of Biotechnology* 128: 444-451.
- Bartlett, R., ve J. M. Kimble. (1976). Behavior of chromium in soils: I Trivalent Forms. *J. Environ. Qual.* 5: 379–386.
- Baumann, L., Baumann, P. Mandel, M. and Allen, R.D. (1972). Taxonomy of Aerobik Marine Eubacteria. *J. Bacteriol.*, 110(1): 402-429.

- Beveridge, T.J, ve Mclean J, (2000) Chromate Reduction by a *Pseudomonad* Isolated from a Site Contaminated with Chromated Copper Arsenate, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 67, No. 3.
- Bianchi, V., ve A. G. Levis. (1984). Mechanisms of chromium genotoxicity. *Toxicological and Environmental Chemistry* 9: 1–25.
- Bianchi, V., A. Zantedeschi, A. Montaldi, ve F. Majone. (1984). Trivalent chromium is neither cyto-toxic nor mutagenic in permeabilized hamster fibroblasts. *Toxicol Lett.* 23: 51–59.
- Bondarenko, B. M., ve A. T. Ctarodoobova. (19819). Morphological and cultural changes in bacteria under the effect of chromium salts. *J Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. USSR.* 4: 99–100.
- Bopp, L. H., A. M. Chakrabarty, ve H. Ehrlich. (1983). Chromate resistance Plasmid in *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol.* 155: 1105–1109.
- Bopp, L. H. ve H. L. Ehrlich. (1988). Chromate resistance and reduction in *Pseudomonas fluorescens* strain LB 300. *Arch. Microbiol.* 150: 426–431
- Brady, D., Letebele, B., Duncan, J. R., Rose, P. D., (1994a). Bioaccumulation of Metals by *Scenedesmus*, *Selenastrum* and *Chlorella Algae*. *Water SA.*, 20: 213- 218.
- Brady, D., Stoll, A., Duncan, J. R., (1994b). Biosorption Of Heavy Metals Cations By Non-viable Yeast Biyomass. *Environmental Technology.* 15, 429–438.
- Bridgewater, L. C., Manning, F. C., Woo, E. S., Patiorne, S. R., (1994). DNA Polymerase Arrest by Aducted Trivalent Chromium. *Mol. Carcinog.* 9: 22- 133.
- Brochiero, E., Bonaly, J., Mestre, J. C., (1984). Toxic Action of Hexavalent Chromium on *Euglena gracilis* Strain Z Grown Under Heterotrophic Conditions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 13: 603-608.
- Brock, T.D., ve Madigan, M.T., (1991) *Biology of Microorganisms*. 6th Edition Prentice Hall, New Jersey.
- Brown, S.D., Thompson, M.R., Verberkmoes, N.C., Chourey, K., Shah, M., Zhou, J.Z., Hettich, R.L. and Thompson, D.K., (2006), Molecular Dynamics of the *Shewanella oneidensis* response to chromate stress. *Molecular Cell Proteomics*, 5, 1054–1071.
- Browning, E. (1969). *Toxicity of Industrial Metals*, Bölüm 2, İkinci Basım, Butterworths, London, UK.
- Bruins, M.R., Kapil, S. and Oehme, F.W. (2003) Characterization of a Small Plasmid (pMBCP) from Bovine *P. pickettii* that Confers Cadmium Resistance. *Ecotox. Environ. Safe.*, 54: 241-248.
- Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme., F.W., (2000). Microbial resistance to metals in the enviroment. *Ecotoxicology and Enviromental Safety* 45: 198-207.
- Bux, F., Kasan, H. C. (1994). Comparison Of Selected Methods For Relative Assessment Of Surface Charge On Waste Biomss. *Water Science And Technology.* 20, 73-76.

- Cabanes, F.J., Alonso, J.M., Castella, G., Alegre, F., Domingo, M. ve Pont, S. (1997) Cutaneous Hyalohyphomycosis Caused by *Fusarium solani* in a Loggerhead Sea Turtle (*Caretta caretta* L.). *J. Clin. Microbiol.*, 35(12): 3343-3345.
- Camargo. F.A.O, Bento. F.M, Okeke. B.C and Frankenberger. W.T, (2003a).Chromate reduction by chromium resistant bacteria isolated from soils contaminated with dichromate, *J. Environ. Qual*, 32: 1228–1233.
- Camargo FAO, Okeke BC, Bento FM, Frankenberger WT (2003b). In vitro reduction of hexavalent chromium by a cell-free extract of *Bacillus sp.* ES 29 stimulated by Cu^{+2} . *Appl Microbiol Biotechnol* ;62:569–73.
- Carlos, C., Jesus, C.G., Silvia, D., Felix, G.C., Herminia, L.T., Juan Carlos, T.G. ve Rafael, M.S. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews* 25, 335–347.
- Carson, L.A., Favero, M.S., Bond, W.W. ve Petersen, N.J. (1973) Morphological, Biochemical and Growth Characteristics of *Pseudomonas cepacia* from Distilled Water. *Appl. Microbiol.*, 25(3): 476-483.
- Cervantes, C., and Campos-Garcia, J. (2007). Reduction and Efflux of Chromate by Bacteria. *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Berlin: Springer-Verlag.
- Cervantes, C., Campos-Garcia, J., Devars, S., Gutierrez-orona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzman, J.C., Moreno-Sanchez, R., (2001), Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Review*, 25(3), 335–47.
- Cheung, K.H., ve Gu, J-D. (2007). Mechanism of Hexavalent Chromium Detoxification by Microorganisms and Bioremediation Application Potential: A Review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59, 8–15. Elsevier.
- Cheung. K.H, Lai. H.Y., Gu. J.-D, (2006). Membrane-associated hexavalent chromium reductase of *Bacillus megaterium* TKW3 with induced expression. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16: 855–862.
- Chirwa, E.M.N., (2001), Modelling Chromium (VI) Reduction in Pure and Coculture Biofilm Reactors. Doctoral Thesis, Department of Civil Engineering, University of Kentucky, Lexington, Kentucky, USA.
- Chirwa, E.M.N., ve Wang, Y.T., (1997), Hexavalent chromium reduction by *Bacillus sp.* in a packed-bed bioreactor. *Environmental Science and Technology*, 31(5), 1446–1451.
- Clark, D. P. (1994). Chromate reductase-activity of *Enterobacter aerogenes* is induced by nitrite. *FEMS Microbiol. Lett.* 122:233–237.
- Codd, R., Lay, P.A., Tsibakhashvili, N.Y., Kalabegishvili, T.L., Murusidze, I.G., Holman, H-Y.N. (2006). Chromium(V) Complexes Generated in *Arthrobacter oxydans* by Simulation Analysis of EPR Spectra. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100, 1827–1833. Elsevier.
- Coleman, R. N., ve J. H. Paran . (1983). Accumulation of hexavalent chromium by selected bacteria. *Environ. Technol. Lett.* 4: 149–156.

- Collier, L., Balow, A., Sussman, M., (1998)"Topley & Wilson's Microbiology and Microbiol Infections", *Systematic Bacteriology*, 9th edition, 2: 1091-1118.
- Corradi, M. G., Gorbi, G., Abd- El- Monem, H. M., Torelli, A., Bassi, M., (1998). Exudates From The Wild Type and a Cr- Tolerant Strain of *Scenedesmus acutus* Influence Differently Cr (VI) Toxicity to Algae. *Chemosphere.*, 37: 3019- 3025.
- Costa, M., (1991). DNA- Protein Complexes Induced by Chromate and Other Carcinogens. *Environ. Health Perspect.*, 92: 45- 52.
- Cowan, S.T., Holt, J.G., Liston, J., Murray, R.G.E., Niven, C.F., Ravin, A.W. ve Stanier, R.Y. (1974) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. (co-eds.), 8th ed., The Williams and Wilkins Company., Baltimore, London, Part 7, p217-243.
- Cupo, D. Y., ve K. E. Wetterhahn. (1984). Repair of chromate-induced DNA damage in chick-embryo hepatocytes. *Carcinogenesis* 5: 1705–1708.
- Darrin, M. (1956). Chromium compounds-Their industrial use, p. 251–262. In M. J. Udy (ed.), *Chromium*. Reinhold, New York.
- Das, A.P., (2009). Bioreduction based bioremediation of hexavalent chromium through potential indigenous microbes. Yüksek Lisans Tezi. Department of Chemical Engineering, National institute of Technology, Rourkela- 769008, Orissa, India
- Daulton, T.L., Little, B.J., Jones-Meehan, J., Blom, D.A., and Allard, L.F. (2007). Microbial Reduction of Chromium from the Hexavalent to Divalent State. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71, 556–565. Elsevier.
- De Filippis, L.F. ve Pallaghy, C.K. (1994). Heavy Metals: Sources And Biological Effects. *Advances in Limnology Series: Algae and Water Pollution*. (Rai, L.C., Gaur, J.P. ve Soeder, C. J.) 31-77 E. Scheizerbartsche Press, Stuttgart.
- DeFlora, S., V. Bianchi, and A. G. Levis. (1984). Distinctive mechanisms for interaction of hexavalent and trivalent chromium with DNA *Toxicol. Environ. Chem.* 8: 287–294.
- Demain, A. L., (1999) "Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52: 455-463.
- Desai C., Jain K. , Madamwar D., (2008) Hexavalent chromate reductase activity in cytosolic fractions of *Pseudomonas* sp. G1DM21 isolated from Cr(VI) contaminated industrial landfill, *Process Biochemistry* 43 :713–721
- Diffels, J.F., Seret, M.-L., Goffeau, A., Baret, P.V., (2006). Heavy metal transporters in hemiascomycete yeasts. *Biochimie* 88: 1639-1649.
- Dirilgen, N., Doğan, F., (2002). Speciation of Chromium in the Presence of Copper and Zines and Their Combined Toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety.*, 53: 397- 403.
- Donati. E., QuiIntana. M., Curutchet. G. (2001) Factors affecting chromium(VI) reduction by *Thiobacillus ferrooxidans*, *Biochemical Engineering Journal* 9: 11–15.

- Dönmez, G., Aksu, Z., (2002). Removal of Chromium (VI) From Saline Wastewaters by *Dunaliella* Species. *Process Biochemistry*., 38: 751-762
- Dubbin, W.E. (2004). Influence of organic ligands on Cr desorption from hydroxy-Cr intercalated montmorillonite. *Chemosphere*, 54, 1071–1077.
- Egler, M., Grosse, C., Grass, G., Nies, D.H. 2005. Role of the extracytoplasmic function protein family sigma factor RpoE in metal resistance of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 187: 2297-2307.
- Ehrlich, H.L. (1997) *Microbes and Metals*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48: 687-692.
- Efstathiou, J. D., ve L. L. McKay. 1977. Inorganic salts resistance associated with a lactose-fermenting plasmid in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 130:257–265.
- Eifac, (1983). *Water Quality Criteria for European Freshwater Fish*.
- Elangovan R, Abhipsa S, Rohit B, Ligy P, Chandraraj K. (2006) Reduction of Cr(VI) by a *Bacillus sp.* *Biotechnol Lett*, 28:247–52.
- Ermosele, C. O., Ermosele, I. C., Muktar, S. A., Birdling, S. A., (1995). Metals in Fish from the Upper Benue River and Lakes Geryo and Njuwa in Northeastern Nigeria. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 54: 8- 14.
- Essar, D. W., Eberly, L., Hadero, A., ve Crawford, I. P., (1990) “Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: Interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications”, *J. Bacteriology*, 172: 884-900.
- Ettinger MJ (1984) Copper metabolism and diseases of copper metabolism. In: Lontie R (ed) *Copper proteins and copper enzymes*. CRC, Boca Raton, pp 175–230
- Eweis, J. B., Ergas, S. J., Chang, D., Schroeder, E. D., (1998) “Bioremediation principles”, WCB, McGraw-Hill, Boston, 305.
- Fasulo, M. P., Bassi, M., Donini, A., (1983). Cytotoxic Effects of Hexavalent Chromium in *Euglena gracilis*. II. Physiological and Ultrastructural Studies. *Protoplasma.*, 114: 35- 43.
- Federal Register, (2004), Occupational Safety and Health Administration. Occupational Exposure to Hexavalent Chromium. 69 Federal Register 59404. October 4, 2004.
- Flemming, C.A., Ferris, F.G., Beveridge, T.J., ve Bailey, G.W., (1990), Remobilization of toxic heavy-metals adsorbed to bacterial wall- clay composites. *Applied Environmental Microbiology*, 56, 3191–3203.
- Flessel, C.P., (1979), *Trace Metals in Health and Disease*. Pp. 109–122, Raven Press, New York. Hartford, W. H. 1979. Chromium compounds, p. 82–120. In *Encyclopedia of chemical technology*. John Wiley & Sons, New York.
- Foulkes, E. C., (1990). *Biological Effects of Heavy Metals (Vol. 1 and 2)*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA

- Francis, C.A., Obraztsova, A.Y., ve Tebo, B.M., (2000), Dissimilatory metal reduction by the facultative anaerobe *Pantoea agglomerans* SP1. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 543–548.
- Fuhrmann, R., Rothstein, A., (1968). The Transport Of Zn^{+2} , Co^{+2} And Ni^{+2} Into Yeast Cells. *Biochemica Et Biophysica Acta*. 163, 325-330
- Fujie, K., K. Toda, ve H. Ohtake. (1990). Bacterial reduction of toxic hexavalent chromium using a fed-batch culture of *Enterobacter cloacae* strain HO1. *J. Ferment. Bioengr.* 69.465.
- Fulladosa, E., Desjardin, V., Murat, J., Gourdon, R., ve Villaescusa, I. (2006). Cr(VI) Reduction into Cr(III) as a Mechanism to Explain the Low Sensitivity of *Vibrio fischeri* Bioassay to Detect Chromium Pollution. *Chemosphere*, 65, 644–650. Elsevier.
- Fuller, A.T. ve Mellows, G. (1971) Pseudomonic Acid: An Antibiotic Produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Nature.*, 234: 416-417.
- Gadd, G. M., ve A. J. Griffiths. (1978). Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microb. Ecol.* 4: 303–317.
- Gadd, G. M., (1988). Accumulations Of Metals By Microorganisms And Algae. In *Biotechnology – A Comprehensive Treatise*. 8, 401-403, Weinheim.
- Gadd, G. M., (1990). Biosorption. *Journal Of Chemistry And Industry*. 2nd July, 421–426.
- Ganguli, A., ve A. K. Tripathi. (2001). Inducible periplasmic chromate reducing activity in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a leather tannery effluent. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11: 355–361.
- Ganguli, A. ve Tripathi, A.K., (2002), Bioremediation of toxic chromium from electroplating effluent by chromate - reducing *Pseudomonas aeruginosa* A2 Chr in two bioreactors. *Applied Microbiology and biotechnology*, 58, 416–420.
- Gaur, J. P., Noraho, N., Chauhan, Y. S., (1994). Relationship Between Heavy Metal Accumulation and Toxicity in *Spirodela polyrrhiza* SCHLEID, L. and *Azolla pinnata* BR, R. *Aquat. Bot.* 49: 183- 192.
- Gopalan, R., Veeramani, H., (1994). Studies on microbial chromate reduction by *Pseudomonas sp*, in aerobic continuous suspended growth cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 43, 471–476.
- Gray, S. J., ve K. Sterling. (1950). The tagging of red cells and plasma proteins with radioactive chromium. *J. Clin. Invest.* 29: 1604–1613.
- Grimanis, A. P., Zafiroğoulos, D., Vassilaki, R., Grimanis, M., (1978). Trace Elements in the Flesh and Liver of Two Fish Species from Polluted and Unpolluted Areas in the Aegean Sea. *Environ. Sci. Technol.*, 12: 723- 726.
- Gu, B., Chen, J. (2003). Enhanced microbial reduction of Cr(VI) and U(VI) by different natural organic matter fractions. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67, 3575–3582.

- Guha. H, Jayachandran. K, Maurrasse. F, (2001). Kinetics of chromium (VI) reduction by a type strain *Shewanella alga* under different growth conditions. *Environmental Pollution*, 115:209–218.
- Guiball, E. Roulph, C. Le Cloirec, P. (1992). Uranium Biosorption By A Filamentous Fungus *Mucor Meiji* pH Effect On Mechanisms And Performances Of Uptakes. *Water Research*. 26, 1139–1145.
- Gupta, V.K., Shrivastava, A.K. ve Jain, N. (2001). Biosorption of Chromium (VI) from aqueous solutions by green algae *Spirogyra* species, *Water Research* 35, No.17 4079-4085.
- Hartford, W. H. (1979). Chromium compounds, p. 82-120. In *Encyclopedia of chemical technology*. John Wiley & Sons, New York
- Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M. ve Boudabous, A. (1998a) Resistance of Environmental Bacteria to Heavy Metals. *Bioresource Technology*., 64: 7-15.
- Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M. ve Boudabous, A. (1998b) Effects of Heavy Metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis*. *Bioresource Technology*., 65: 73-82.
- Hausschild, M. Z., (1993). Putrescine (1,4- Diaminobutane) as an Indicator of Pollution- Induced Stress in Higher Plants: Barley and Rape Stressed with Cr (III) or Cr(VI). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 26: 228- 247.
- He F., Hu W., Li V. , (2004) Biodegradation mechanisms and kinetics of azo dye 4BS by a microbial consortium, *Chemosphere* 57 293–301.
- Healey, F. P., (1973). Inorganic Nutrient Uptake and Deficiency in Algae. *CRC (Crit. Rev. Microbiol.)*. 3(1): 60- 113.
- Henderson, G., (1989). A Comparison of the Effects of Chromate, Molybdate and Cadmium Oxide on Respiration in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol. Metals*., 2: 83-88.
- Hervey, R., (1949). Effects of Chromium on the Growth of Unicellular Chlorophyceae and Diatoms. *Bot. Gaz.*, 111: 1- 11.
- Hintze, C., (1930), In *Handbook of Mineralogy*, vol. 1 III/2, p. 4012–4030, Berlin, Leipzig, DeGryter, Germany.
- Hirano, S.S. ve Upper, C.D. (2000) Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas syringae* a Pathogen, Ice Nucleus and Epiphyte. *Microbiol. Mol. Biol. R.*., 64(3): 624-653.
- Hodson, P. V., (1988). The Effect of Metal Metabolism on Uptake, Disposal and Toxicity in Fish. *Aquatic Toxicology*., 11, 3-18
- Hongo, K., Hirai, H., Uemura, C., Ono, S., Tsunemi, J., Higurashi, T., Mizobata, T., Kawatw, Y., (2006). A novel ATP/ADP hydrolysis activity of hyperthermostable group II chaperonin in the presence of cobalt or manganese ion. *FEBS Letters* 580: 34-40.
- Horitsu, H., S. Futo, Y. Miyazawa, S. Ogai, and K. Kawai. (1987). Enzymatic reduction of hexavalent chromium by hexavalent chromium tolerant *Pseudomonas ambigua* G-1. *Agricul. Biol. Chem.* 51: 2417–2420

- Hu, P., Brodie, E.L., Suzuki, Y., McAdams, H.H., ve Andersen, G.L.,(2005),. Whole-genome transcriptional analysis of heavy metal stresses in *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*, 187, 8437–8449.
- Huffman, E. W. D., ve W. H. Allaway. (1973). Chromium in plants-distribution in tissues, organelles, and extracts and availability of bean leaf Cr to animals. *J. Agricul. Food Chem.* 21: 982–986..
- IPCS, (1992). International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria, World Health Organization, Geneva, Switzerland
- Isa, M.H., Ibrahim,N., Aziz, H.A., Adlan, M.N., Sabiani, N.H., Zinatizadeh, A.A., ve Kutty, S.R. (2008) Removal of chromium (VI) from aqueous solution using treated oil palm fibre. *J Hazard Mater* 152:662–668.
- Ishibashi, Y., Cervantes, C., ve Silver, S., (1990), Chromium reduction in *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 2268–2270.
- Itoh, M., Nakamura, M., Suzuki, T., Kawai, K., Oritsu, H., Takamizawa, K., (1995). Mechanism of Chromium (VI) Toxicity in *Escherichia coli* is Hydrogen Peroxide Essential in Cr (VI) Toxicity. *J. Biochem.*, 117: 780- 786.
- Jamir, Y., Guo, M., Oh, H.-S., Petnicki-Ocwieja, T., Chen, S. , Tang, X., Dickman, M. B, Collmer, A. and Alfano, J. R., (2004) “Identification of *Pseudomonas syringae* type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast”. *Plant J.* , 37: 554–565.
- Jeejeebhoy, K. N., R. C. Chu, E. B. Marliss, G. R. Greenberg, ve A. Brucerobertson. (1977). Chromium deficiency, glucose-intolerance, and neuropathy reversed by chromium supplementation, in a patient receiving long-germ total parenteral nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 30: 531–538.
- Johnson, C., Hellerich, L.A., Nikolaidis, N.P., Gschwend, P. (2001). Ground Water, 39/6, 895–903.
- Kanner, D., Gerber, N.N. ve Bartha, R. (1978) Pattern of Phenazine Pigment Production by a Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 134(2): 690-692.
- Kantar, C., Honeyman, B.D. (2005). Approaches to reactive transport modeling of metals in the presence of organic ligands. Environmental Modeling and Software (Manuscript in consideration).
- Kapoor A. , Viraraghavan T. , (1998) Removal of heavy metals from aqueous solutions using immobilized fungal biomass in continuous mode, *Water Res.* 32 :1968–1977
- Katz, S. A., Salem, H., (1993).The Toxicology of Chromium with Respect to its Chemicals peciation: A Review. *J. Appl. Toxicol.*, 13: 217- 224.
- Kaufaman, D.B. (1970). Acute Potassium Dichromate Poisoning in Man. *Am. J. Diseases Children* 119, 374–379.
- Kaufmann, F., ve D. R. Lovley. (2001). Isolation and characterization of a soluble NADPH-dependent Fe(III) reductase from *Geobacter sulfurreducens*. *J. Bacteriol.* 183:4468–4476.

- Kawanishi, S., Inoue, S., Sano, S., (1986). Mechanism of DNA Cleavage Induced by Sodium Chromate (VI) in the Presence of Hydrogen Peroxide. *J. Biol. Chem.*, 261: 5952- 5958.
- Kennish, M. J., (1992). Ecology of Estuaries. CRC Press, Florida
- Keskin, D. ve Ekmekçi, S. (2003) *Pseudomonas* türlerinin gıdalardan izolasyon ve tanımlanmasında kullanılan besiyerleri. *Mikrobiyoloji Dergisi.*, 1(8): 29-33.
- Kharab, P., Singhi.I., (1987). Induction of Respiratory Deficiency in Yeast by Salts of Chromium, Arsenic, Cobalt and Lead. *Ind. J. Exp. Biol.*, 25: 141-142.
- Kıvanç M., N. Karakaş, S. Platin, (1996). Atık Sulardaki Krom İyonlarının Giderilmesinde *Bacillus subtilis*'in Kullanılması. *Ekoloji, Çevre Dergisi*, Sayı. 20, 1996, 17–20.
- Kiilunen, M., (1994), Occupational exposure to chromium and nichel in Finland and its estimation by biological monitoring. Doctoral thesis, Kuopio Universty Publications C, *Natural and Environmental Sciences*, 17.
- Kimbrough, DE., Cohen, Y., Winer, AM., Creelman, L., Mabun, C., (1999). A Critical Assessment of Chromium in the Environment. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 29: 1- 46.
- Klerks, P. L., Fraleigh, P. C., (1997). Uptake of Nickel and Zink by the Zebra *Mussel Dreissena Polymorpha*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 32, 1997.
- Koçberber, N., G. Dönmez. (2007). Chromium(VI) bioaccumulation capacities of adapted mixed cultures isolated from industrial saline wastewaters, *Bioresource Technology* 98:2178-2183
- Komori, K., A. Rivas, K. Toda, ve H. Ohtake. (1989). Biological removal of toxic chromium using an *Enterobacter cloacae* strain that reduces chromate under anaerobic conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 35: 951–954.
- Kotas, J., Stasicka, Z., (2000). Commentary. Chromium Occurrence in the Environment and Methods of its Speciation. *Environ Pollut.*, 107: 263- 283.
- Kourtev, P.S., Nakatsu, C.H., Konopka, A., (2006). Response of the anaerobic bacterial community to addition of organic C in chromium(VI)-and iron(III)-amended microcosms. *Applied and Enviromental Microbiology* 72: 628-637.
- Kovalsky, V., (1974). Geochemical Ecology. Moskow Science, Russia
- Kraemer, S.M., Xu, J., Raymond, K. N., Sposito, G. (2002). Adsorption of Pb(II) and Eu(III) by oxide minerals in the presence of natural and synthetic hydroxamate siderophores, *Environ. Sci. Technol.* 36, 1287–1291.
- Krishna, K.R. ve Philip, L. (2005) Bioremediation of Cr(VI) in contaminated soils. *J Hazard Mater* 121: 109–117.
- Ksheminska, H., Fedorovych, D., Babyak, L., Yanovych, D., Kaszycki, P., koloczek, H. (2005). Chromium(III) and (VI) tolerance and bioaccumulation in yeast: a survey of cellular chromium content in selected strains of represantitive genera. *Process Biochemistry* 40: 1565-1572.

- Kwak, Y. H., Lee, D.S., ve Kim, H.B., (2003), *Vibrio harveyi* Nitroreductase Is Also a Chromate Reductase. *Applied And Environmental Microbiology*. Vol. 69, No. 8. 4390–4395.
- Laemmli, U.K., (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature (London)*, 227, 680-685.
- Langard, S. (1980). *Metals in the environment*, p. 111–132. Academic Press, New York.
- Langard, S. (1983). The carcinogenicity of chromium compounds in man and animals, p. 13–30. In D. Burrows (ed.), *Metabolism and toxicity*. CRC Press, Inc.,
- Laxman, R.S. & More, S. (2002) Reduction of hexavalent chromium by *Streptomyces griseus*. *Minerals Engineering* 15, 831–837.
- Levis, A. G., Bianchi, V., (1982). Mutagenic and Cytogenetic Effects of Chromium Compounds. In: *Biological and Environmental Aspects of Chromium* (Langard, S., Ed.). 171- 208.
- Levis, A. G., V. Bianchi, G. Tamino, ve B. Pegoraro. (1978). Cytotoxic effects of hexavalent and trivalent chromium on mammalian-cells invitro. *Brit. J. Cancer* 37: 386–396.
- Li, F., ve T. C. Tan. (1994). Effect of heavy metal ions on the efficacy of a mixed Bacilli Bod Sensor. *Bio Sens. Bioelectron* 9: 315–324.
- Liu, K. J., Jiang, J., Shi, X., Gabrys, H., Walezak, T., Swartz, M., (1995). Low-Frequency EPR Study of Chromium (V) Formation from Chromium (VI) in Living Plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 206: 829-834.
- Liu YG, Xu WH, Zeng GM, Tang CF, Li CF. (2004) Experimental study on reduction by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Environ Sci*, 16(5):797–801.
- Llagostera, M., Gariddo, S., Guerrero, R., ve Barbé, J., (1986)., Induction of SOS genes of *Escherichia coli* by chromium compounds. *Environmental Mutagenesis*, 8, 571–577.
- Llovera, S., Bonet, R., Simon-Pujol, M. D., ve Congregado, F., (1993), Chromate reduction by resting cells of *Agrobacterium radiobacter* EPS-916. *Applied and Environmental Microbiology*, , 59, 3516-3518.
- Losi, M. E. ve W. T. Frankenberger. Jr. (1994). Chromium-Resistant Microorganisms isolated from evaporation ponds of a metal processing plant. *Water Air Soil Poll.* 74: 405–413.
- Losi, M.E., Amrhein, C., Frankenberger, W.T. Jr. (1994). Factors affecting chemical and biological reduction of hexavalent chromium in soil. *Environ. Toxic. Chem.* 13, 1727–1735.
- Lovley. D.R, (1994). Microbial reduction of iron, manganese, and other metals. *Advances in Agronomy*, 54: 175–231.
- Lovley, D. R., ve E. J. P. Phillips. (1994). Reduction of chromate by *Desulfovibrio vulgaris* and its c3 cytochrome. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 726–728.

- Lovely, D.R., (1996). Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature* 382, 445–448.
- Luo, H., Lu, Y., Shi, X., Mao, Y., Delal, N. S., (1996). Chromium (IV)- Mediated Fenton- Like Reaction Causes DNA Damage: Implication to Genotoxicity of Chromate. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 26: 185-191.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2003). *Brock Biology of Microorganisms*, Tenth editon. Pearson Education, USA
- Malik, A. (2004). Metal bioremediation through growing cells. *Enviromental International* 30: 261-278.
- Mandelbaum, R. T., Allan, D. L., ve Wackett, L. P., (1995) “Isolation and Characterization of a *Pseudomonas* sp. That Mineralizes the s-Triazine Herbicide Atrazine”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:1451–1457.
- Marsh, T. L., ve McInerney, M. J.. (2001). Relationship of hydrogen bioavailability to chromate reduction in aquifer sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1517–1521.
- Marsh, T. L., Leon, N. M., and McInerney, M. J.. (2000). Physiochemical factors affecting chromate reduction by aquifer materials. *Geomicrobiol. J.* 17: 291–303.
- Matthews, N. A, ve Morning, J. L., (1980)Metals and Minerals. Washington D.C. U.S. Bureau of mines, mineral yearbook 1978–79. Ref Type: Serial (Book, Monograph) 193–205.
- Mayes, M.A., Jardine, P.M., Larsen, I.L., Brooks, S.C., Fendorf, E.E. (2000). Multispecies transport of metal-EDTA complexes and chromate through undisturbed columns of weathered fractured saprolite. *Journal of contaminant hydrology*, 45, 243–265.
- McGrath, S. P. ve Smith, S, (1990). Chromium and Nickel, in B. J. Alloway (ed.), *Heavy Metals in Soils*, John Wiley and Sons, New York, 125–147.
- McLean, J., ve Beveridge, T.J. (2001). Chromate Reduction by a *Pseudomonad* Isolated from a Site Contaminated with Chromated Copper Arsenate. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1076–1084. American Society for Microbiology.
- McLean, R.J.C., Beauchemin, D., Clapham, L. ve Beveridge, T.J., (1990), Metal-binding characteristics of the gamma-glutamyl capsular polymer of *Bacillus lichenniformis* ATCC 9945. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 3671-3677.
- Meisch, H. U., Smitt- Beckmann, I., (1979). Influence of Tri- and Hexavalent Chromium on Two *Chlorella* Strains. *Z. Pflanzenphysiol.*, 94 (3): 231-239.
- Mergeay, M., Monchy, S., Vallaeys, T., Auquier V, Benotmane, A., Bertin, P., Taghavi, S., Dunn, J., Lelie, D. ve Wattiea, R. (2003). *Ralstonia metallidurans*, a bacterium spesifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiology Reviews* 27: 385-410

- Merian, E., (1984), Introduction on environmental chemistry and global cycles of arsenic, beryllium, cadmium, chromium, cobalt, nickel, selenium, and their derivatives. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 8, 9–38.
- Minissi, S., Caccese, D., Passaçume, F., Grella, A., Eleanora, C. ve Rissoni, M. (1998) Mutagenicity (micronucleus test in *Vicia faba* root tips), polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metal content of sediments collected in Tiber river and its tributaries within the urban area of Rome. *Mutat. Res.* 420, 7784.
- Mertz, W. (1969). Chromium occurrence and function in biological systems. *Physiol. Rev.* 49: 163–167.
- Mertz, W. (1993). Chromium in human nutrition: a review. *J Nutr* 123:626–633.
- Meyer, J.M. ve Hohnadel, D. (1990) Pyoverdine-Facilitated Iron Uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: Immunological Characterization of the Ferripyoverdine Receptor. *Mol. Microbiol.*, 4: 1401-1405.
- Miranda, A.T., Gonzales, M.V., Gonzales, G., Vargas, E., campos-Garcia, J. ve Cervantes, C., (2005), Involvement of DNA helicases in chromate resistance by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mutation Research*, 578, 202–209.
- Mohan, D. ve Pittman, C.U., Jr., (2006), Activated carbons and low cost adsorbents for remediation of tri- and hexavalent chromium from water. *Journal of Hazardous Materials*, B137, 762–811.
- Moiseenko, T. I., Kudryavtseva, L. P., (2001). Trace Metal Accumulation and Fish Pathologies in Areas Affected by Mining and Metallurgical Enterprises in the Kola Region, Russia. *Environmental Pollution*, 114, 285-297.
- Moller J.V., Nissen, P., Sorenson, T. L-M, Marie, M. (2005). Transport mechanism of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase pump. *Current Opinion in Structural Biology* 15: 387-393.
- Molokwane, P.E., ve Chirwa, E.M.N., (2009), Microbial culture dynamics and chromium (VI) removal in packed-column microcosm reactors. *Water Science and Technology*, 60 (2), 381–388.
- Molokwane, P. E. (2010), Simulation of In Situ Bioremediation of Cr(VI) in Groundwater Aquifer Environments Using a Microbial Culture Barrier. University of Pretoria, Chemical Engineering.
- Muraleedharan, T.R. Venkobachar, L.I. (1994). Further Insight Into The Mechanism Of Biosorption Of Heavy Metals By *Genodermis lucidum*. *Environmental Technology*. 15, 1015–1027.
- Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C., Tenover, R. H., (1995) “Manual of Clinical Microbiology, 6th Edition”, ASM Press, Washington, D. C., 1327-1341.
- Myers, C.R.; Carstens, B.P.; Antholine, W. E.; ve Myers, J. M., (2000). Chromium(VI) reductase activity is associated with the cytoplasmic membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 98-106.

- Nakiboğlu T. ve Sevindir H. C. (2006). Deri Endüstrisi Atıksularından Kromun Çeşitli Alglerle Biyosorpsiyonu. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 10–2,284–291.
- NAS, (National Academy of Science), (1974), In Chromium, National Research Council, Committee on Biological Effects of Atmospheric Pollutants. National Academy of Sciences, Washington, DC. Page 155.
- Neal, A.L., Lowe, K., Daulton, T.L., Jones-Meehan, J., and Little, B.J. (2002). Oxidation State of Chromium Associated with Cell Surfaces of *Shewanella oneidensis* during Chromate Reduction. *Applied Surface Science*, 202, 150–159. Elsevier.
- Niebor, E., Richardson, D. H. S., (1980). The Replacement of the Nondescript Term Heavy Metals by a Biologically and Chemically Significant Classification of Metal Ions. *Environ. Pollut.*, 1: 3- 26.
- Nies, D. H., ve S. Silver. (1989). Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 171:896–900.
- Nies, D.H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 51: 730-750.
- Nies, D.H., (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 27: 313-339.
- Nishioka, H. (1975). Mutagenic activities of metal-compounds in bacteria. *Mut. Res.* 31: 185–189.
- Nishio, A. ve Uyeki, E.M. (1985). Inhibition of DNA synthesis by chromium compounds. *J. Toxicol. Environ. Health* 15, 237–244.
- Norman, R. S., Moeller, P., McDonald, T. J. ve Morris, P. J., (2004) “Effect of pyocyanin on a crude-oil-degrading microbial community”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 4004-4011.
- Nriagu, J.O., (1988). Production and Uses of Chromium. In *Natural and Human Environment*. New York, USA: John Wiley and Sons., 81- 105.
- Obbard. P, (2001). Ecotoxicological assessment of heavy metals in sewage sludge amended soils *J. Appl Geochem*, 16: 1405–1411.
- Oh, Y. S., ve S. C. Choi. (1997). Reduction of hexavalent chromium by *Pseudomonas aeruginosa* HP014. *J. Microbiol.* 35: 25–29.
- Ohtake, H., C. Cervantes, ve S. Silver. (1987). Decreased chromate by *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. *J. Bacteriol.* 169:3853–3856.
- Ohtake, H., Fujii, E., ve Toda, K., (1990), Reduction of toxic Cr(VI) in an industrial effluent by use of a Cr(VI) -reducing strain *Enterobacter cloacae* HO1. *Environmental Technology Letters*, 11, 663–668.
- Okeke B.C., (2008) Bioremoval of hexavalent chromium from water by a salt tolerant bacterium, *Exiguobacterium* sp. GS1 *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:1571–1579 DOI 10.1007/s10295-008-0399-5

- Pal, A., ve Paul, A. K. (2004). Aerobic Chromate Reduction by Chromium-resistant Bacteria Isolated from Serpentine Soil. *Microbiological Research*. 159, 347–354. Elsevier.
- Pal A, Dutta S, Paul AK. (2005) Reduction of hexavalent chromium by cell free extract of *Bacillus sphaericus* AND 303 isolated from serpentine soil. *Curr Microbiol*, 51:327–30.
- Palmer, C.D. ve Wittbrodt, P.R. (1991) Processes affecting the remediation of chromium contaminated sites. *Environ Health Perspect* 92: 25–40.
- Papp, J.F. (1985). Chromium. Mineral Facts and Problems, Knoerr, A.W., 139-155, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
- Park, C. H., M. Keyhan, B. Wielinga, S. Fendorf, ve A. Matin. (2000). Purification to homogeneity and characterization of a novel *Pseudomonas putida* chromate reductase. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1788–1795.
- Park, C. H., C. F. Gonzalez, D. F. Ackerley, M. Keyhan, ve A. Matin. (2002). Molecular engineering of soluble bacterial proteins with chromate reductase activity, p. 103–111. In R. E. Hinche et al. (ed.), Remediation and beneficial reuse of contaminated sediments. Batelle Press, Columbus, Ohio.
- Park, D., Yun, Y.S., Park, Y.M. (2004). Reduction of hexavalent chromium with the Brown seaweed *Ecklonia* Biomass. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4860–4864.
- Patra, M., Bhowmik, N., Bandopadhyay, A., (2004). Comparison of Mercury, Lead and Arsenic with Respect to Genotoxic Effects on Plant Systems and the Development of Genetic Tolerance. *Environmental and Experimental Botany.*, 52: 199- 223.
- Petrilli, F. L., ve S. D. Flora. (1977). Toxicity and mutagenicity of hexavalent chromium on *Salmonella-typhimurium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 805–809
- Petrilli, F. L. ve S. De Flora. (1978). Metabolic deactivation of hexavalent chromium mutagenicity. *Mutat. Res.* 54: 139–147.
- Philip, L., L. Iyengar, ve C. Venkobachar. (1998). Cr(VI) reduction by *Bacillus coagulans* isolated from contaminated soils. *J. Environ. Eng.-ASCE* 124:1165–1170.
- Poole K. ve Hancock Robert E. W., (1984) Phosphate transport in *Pseudomonas aeruginosa*, *Eur. J. Biochem.* 144, 607-612
- Pratt, P. F. (1966). Chromium, p. 136–141. In H. D. Chapman (ed.), Diagnostic criteria for plants and soils. Quality Printing Co. Inc., Abilene, TX.
- Puzon, G.J., Roberts, A.G., Kramer, D.M., Xun, L. (2005). Formation of soluble organo-chromium(III) complexes after chromate reduction in the presence of cellular organics. *Environ. Sci. Technol.* 39, 2811–2817.
- RaoRathinam A. J. R. , Sreeram K. J., Nair B. U. ,(2007). Biological removal of carcinogenic chromium (VI) using mixed *Pseudomonas* strains, *J. Gen. Appl. Microbiol*, 532: 71-91

- Rai, D., Sass, B.M., Moore, D.A. (1987). Chromium(III) hydrolysis constants and solubility of chromium (III) hydroxide. *Inorg. Chem.*, 26, 345-349.
- Ramírez-Díaz, M.I., Díaz-Pérez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J., Cervantes, C. (2008). Mechanisms of Bacterial Resistance to Chromium Compounds. *Biometals*, 21, 321–332. *Springer*.
- Ramírez- Ramírez, R., Calvo-Méndez , C., Ávila- Rodríguez. M., Lappe, P., Ulloa, M., Vázquez- Juárez, R., Gutiérrez-Corona, J.F., (2004), Cr(VI) reduction in a chromate-resistant strain of *Candida maltosa* isolated from the leather industry. *Journal Antonie van Leeuwenhoek*, 85 (1), 63–68.
- Rank, J. ve Nielsen, M.H. (1998) Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Mutat. Res.* 418, 113-119.
- Rege, M. A. (1997). Bacterial reduction of hexavalent chromium by *Enterobacter cloacae* strain HO1 grown on sucrose. *Biotechnol. Lett.* 19: 691–694.
- Roberts, E. R., (1992). “Remediation of Petroleum Contaminated Soils”, Lewis Publishers, New York Washington, D.C. 139, 249.
- Robertson, F.N., (1975), Hexavalent chromium in ground water in Paradise Valley, Arizona, *Ground Water*, 13(6): 516-527.
- Romanenko. V.I., Korenkov. V.N, (1977). A pure culture of bacterial cells assimilating chromates and bichromates as hydrogen acceptors when grown under anaerobic conditions. *Mikrobiologiya*, 46: 414–417.
- Rosko, J. J., ve J. W. Rachlin. (1977). Effect of cadmium, copper, mercury, zinc and lead on cell- division, growth, and chlorophyll-a content of chlorophyte *Chlorella vulgaris*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 104:226–233.
- Ross, D. S., R. E. Sjogren, ve R. J. Bartlett. (1981). Behavior of chromium in soils. 4. Toxicity to microorganisms. *J. Environ. Qual.* 10: 145–148.
- Sadhukhan, P.C., Ghosh, S., Chaudhuri, J., Ghosh, D.K. ve Mandal, A. (1997) Mercury and Organomercurial Resistance in Bacteria Isolated from Freshwater Fish of Wetland Fisheries Around Calcutta. *Environ. Pollut.*, 97(1-2): 71-78.
- Salunkhe, P. B., P. K. Dhakephalkar, ve K. M. Paknikar. (1998). Bioremediation of Hexavalent chromium in soil microcosms *Biotechnol. Lett.* 20: 749–751.
- Sandrin, T.R. ve Maler, R.M. (2003) Impact of Metals on the Biodegradation of Organik Pollutants. *Environment Health Perspectives.*, 111(8): 1093-1101.
- Schmidt, A. Haferburg G. Sineriz M, Merten, D. Büchel, G. Ve Kothe, E. (2005). Heavy metal machanisms in actinobacteria for survival in AMD contaminated soils. *Chemic Der Erda* 65: 131-144
- Schroll, H. 1978. Determination of the absorption of Cr⁺⁶ and Cr⁺³ in an algal culture of *Chlorella pyrenoidosa* using CR–51. *B. Environ. Contam. Tox.* 20: 721–724.

- Schulin, R. (2007). Heavy metal contamination along a soil transect in the vicinity of the iron smelter of Kremikovtzi (Bulgaria) *J. Geoderma*, 140 1/2: 52–61.
- Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Taverac, H., and Avudainayagam, S. (2005). Review Article: Chromium Toxicity in Plants. *Environment International*, 31, 739–753. Elsevier.
- Shakoori AR, Makhdoom M, Haq RU. (2000) Hexavalent chromium reduction by a dichromate-resistant gram-positive bacterium isolated from effluents of tanneries. *Appl Microbiol Biotechnol*;53:348–51.
- Sharma, D. C., Chatterjee, C., Sharma, C. P., (1995). Chromium Accumulation and its Effects on Wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Sci.*, 111: 145- 151.
- Sharma, K. (2002). Microbial Cr(VI) Reduction: Role of Electron Donors, Acceptors, and Mechanisms with Special Emphasis on *Clostridium* spp.. Doktora Tezi. University of Florida, Soil and Water Science.
- Sharma, S., Luthra, P.M., Singh, Y., Sirdeshmukh, R., ve Gade, W.N. (2006). Role of proteins in resistanc mechanism of *Pseudomonas fluorescens* against heavy metal induced stress with proteomics approach. *Journal of Biotechnology* 126: 374-382.
- Shen H., ve Wang, Y.T., (1993), Characterization of enzymatic reduction of hexavalent chromium by *Escherichia coli* ATCC 33456. *Applied Environmental Microbiology*, 59 (11), 3771-3777.
- Shen, H., ve Wang Y T., (1994a), Modeling hexavalent chromium reduction in *Escherichia coli* ATCC 33456 *Biotechnology and Bioengineering*, 43 (4), 293-300.
- Shen, H., ve Wang, Y.T., (1994b), Biological reduction of chromium by *E. coli* *Journal of Environmental Engineering*, 120, 560-572.
- Shen H. ve Wang Y.T., (1995), Simultaneous Chromium Reduction and Phenol Degradation in a Coculture of *Escherichia coli* ATCC 33456 and *Pseudomonas putida* DMP-1. *Applied Environmental Microbiology*, 61 (7), 2754–2758.
- Shi, X., Dalal, N. S., (1990). On the Hydroxyl Radical Formation in the Reaction Between Hydrogen Peroxide and Biologically Generated Chromium (V) Species. *Arch. Biochem. Biophys.*, 277: 342- 350.
- Shumate, S.E., Strandberg, G. W., (1985). Accumulation Of Metals By Microbial Cell. *In Compherensive Biotechnology*. 4, 235-240, New York
- Siegel , S. M., Galun, M., Siegel , B. Z., (1990). Filamentous Fungi As Biosorbent: A Review. *Water air And Soil Pollution*. 53, 335–344.
- Silver, S. (1992) Plasmid-Determined Metal Resistance Mechanisms: Range and Overview. *Plasmid.*, 27: 1-3.
- Silver, S. (1998) Genes for all Metals – A bacterial View of the Periodictable the 1996 Thom Award Lecture., *J. Ind. Microbiol. Biotech.*, 20:1-12.
- Silverberg, B. A., P. T. S. Wong, ve Y. K. Chau. (1977). Effect of tetramethyl lead on freshwater green-algae. *Arch. Environ. Con. Tox.* 5: 305–313.

- Skeffington, R. A., Shewry, P. R., Peterson, P. J., (1976). Chromium Uptake and Transport in Barley Seedlings (*Hordeum vulgare* L.). *Planta.*, 132: 209- 214.
- Smith, J. K., Vesilind, P. A., (1995). Dilatometric Measurement Of Bound Water In Wastewater Sludge. *Water Research.* 29 2621-2626
- Sneath, P. H. A., (1986)"Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Edited by P.H. A. Sneath, N. S., Mair, M. E., Sharpe, J. G. Holt, Williams and Wilkins, 1 Baltimore, 2: 141-199.
- Snow, E. T., (1994). Effects of Chromium on DNA Replication in vitro. *Environ. Health Perspect.* 3: 41- 44.
- Snyder, S.L., Walker, R.I., MacVittie, T.J., ve Sheil, J.M., (1978), Biologic properties of bacterial lipopolysaccharides treated with chromium chloride Canadian. *Journal of Microbiology* , 24, 495–501.
- Spain, A. (2003) Implications of microbial heavy metal tolerance in the environment. *Rev Undergrad Res* 2: 1–6.
- Srinath T., Verma T., Ramteke P.W., Garg S.K. (2002) Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. *Chemosphere* 48: 427–435.
- Srivastav, R. K., Gupta, S. K., Nigam, K. D. P., Vasudevan, P., (1994). Treatment of Chromium and Nickel in Wastewater by Using Aquatic Plants. *Water Res.*, 28, 7, 1631-1638.
- Srivastava, S., Prakash, S., Srivastava, M.M. (1999). Chromium mobilization and plant availability-the impact of organic complexing ligands. *Plant and soil*, 212, 203–208.
- Stern, R.M., (1982), Chromium compounds: production and occupational exposure, p.5-47. In S. Langard (ed.), *Biological and Environmental Aspects of Chromium*, Elsevier Publishers, Amsterdam, New York, Oxford.
- Sultan, S., Hasnain, S. (2006). Characterization of an *Ochrobactrum intermedium* strain STCr-5 manifesting high level Cr(VI) resistance and reduction potential. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 883–888
- Sultan S, Hasnain S. 2007,Reduction of toxic hexavalent chromium by *Ochrobacterium intermedium* strain SDCr-5 stimulated by heavy metals. *Biores Technol*, 98(2):340–4.
- Summers, A. O. ve G. A. Jacoby. (1978). Plasmid-determined resistance to boron and chromium compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Ch.* 13: 637–640.
- Sunda, W. G., Huntsman, S. A., (1998). Process Regulating Cellular Metal Accumulation and Physiological Effects: Phytoplankton as Model Systems. *Sci. Total Environ.*, 219: 165- 181.
- Suzuki, Y., ve K. Fukuda. (1990). Reduction of hexavalent chromium by ascorbic acid and glutathione with special reference to the rat lung. *Arch. Toxicol.* 64: 169–176
- Suzuki, T., Miyata, N., Horitsu, H., Kawai, K., Takamizawa, K., Tai, Y., ve Okazaki, M. (1992). NAD(P)H-Dependent Chromium(VI) Reductase of

- Pseudomonas ambigua* G-1: a Cr(V) Intermediate Is Formed during the Reduction of Cr(VI) to Cr(III). *Journal of Bacteriology*, 174, 5340–5345. American Society for Microbiology.
- Şencan, A., (2006), Sulu Çözelti ve Deri Endüstrisi Atıksuyundan Cr(VI) İyonunun Aktif Çamur Biyokütlesi ile Biyosorpsiyonu. Yüksek Lisans Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi. Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, Isparta.
- Tebo, B. M. ve A. Y. Obraztsova. (1998). Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(VI), Mn(IV), and Fe(III) as electron acceptors. *FEMS Microbiol. Lett.* 162:193–198.
- Thacker U, Madamwar D, (2005). Reduction of toxic chromium and partial localization of chromium reductase activity in bacterial isolate DM1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21: 891–899.
- Thacker, U., R. Parikh, Y. Shouche and D. Madamwar, (2006). Hexavalent chromium reduction by *Providencia* sp. *Process Biochem.*, 41: 1332-1337.
- Theodotou, A., R. J. Stretton, A. H. Norbury, ve A. G. Massey. (1976). Morphological effects of chromium and cobalt complexes on bacteria. *Bioinorg. Chem.* 5: 235–239.
- Thompson, M.R., Verberkmoes, N.C., Chourey, K., Shah, M., Thompson, D.K., ve Hettich, R.L., (2007), Dosage-dependent proteome response of *Shewanella oneidensis* MR-1 to acute chromate challenge. *Journal of Proteome Research*, 6, 1745–1757.
- Thyagarajan, G. (1992). Leather industry-in pursuit of better image. *The Hindu Survey Environ.* 143–145.
- Tobin, J. M., Cooper, D. G. Neufeld, R. J., (1984). Uptake Of Metal Ions By *Rhizopus Arrhizus* Biyomass. *Applied Environmental Microbiology*. 47, 821–824
- Tobin, J. M., Roux, J. C., (1998). *Mucor* Biosorption For Chromium Removal From Tanning Effluent. *Water Research*. 32, 1407–1416.
- Tokunaga, T.K., Wan, J., Firestone, M.K., Hazen, T.C., Olson, K.R., Herman, D.J., Sutton, S.R., Lanzirrotti, A. (2003). In-situ reduction of chromium(VI) in heavily contaminated soils through organic carbon amendment. *J. Environ. Qual.*, 32, 1641-1649.
- Tortora, G. J., (1991). “Microbiology: An introduction”, The Benjamin Cumings Publishings Company, California, 217-276.
- Tosukhowong, A., Nakayama, J., Mizunoe, Y., Sugimoto, S., Fukuda, D., Sonomoto, K. (2005). Reconstruction and function of Tetragenococcus halophila chaperonin 60 tetradecamer. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99: 30-37.
- Towill, L. E., C. R. Shriner, ve J. S. Drury. (1978). Reviews of the environmental effects of pollutants. III Chromium. National Academy Press, Cincinnati, OH.

- Travieso, L., Canizarez, R. O., Borja, R., Benitez, F., Dominguez Z, A. R., Dupeyron, R., Valiente, V., (1999). Heavy Metal Removal by Microalgae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 62: 144- 151.
- Tripathi, R. D., Smith, S., (1996). Effect of Chromium (VI) on Growth, Pigment Content, Photosynthesis, Nitrate Reductase Activity, Metabolic Nitrate Pool and Protein Content in Duckweed (*Spirodela polyrrhiza*).
- Tsapakos, M. J., T. H. Hampton, ve K. E. Wetterhahn. (1983). Chromium(VI)-induced DNA lesions and chromium distribution in rat-kidney, liver, and lung. *Cancer Research* 43: 5662–5667.
- Tsapakos, M. J., ve K. E. Wetterhahn. (1983). The interaction of chromium with nucleic-acids. *Chem-Biol. Interact.* 46: 265–277.
- Tsuda, H., ve K. Kato. (1977). Chromosomal-aberrations and morphological transformation in hamster embryonic cells treated with potassium dichromate in vitro. *Mut. Res.* 46: 87–94.
- Turick, C.E., Apel, W.A., Carmiol, N.S., (1996). Isolation of hexavalent chromium-reducing anaerobes from hexavalent chromium-contaminated and noncontaminated environments. *Applied Microbiology and Biotechnology* 44, 683–688.
- Vachee, A., Mossel, D.A.A. and Leclerc, H. (1997) Antimicrobial Activity Among *Pseudomonas* and Related Strains of Mineral Water Origin. *J. Appl. Microbiol.*, 83: 652-658.
- Vajpayee, P., Sharma, S.C., Tripathi, R.D., Rai, U.N., ve Yunus, M., (1999). Bioaccumulation of chromium and toxicity to photosynthetic pigments, nitrate reductase activity and protein content of *Nelumbo nucifera* Gaertn. *Chemosphere* 39, 2159–2169.
- Venitt, S., ve L. S. Levy. (1974). Mutagenicity of chromates in bacteria and its relevance to chromate carcinogenesis. *Nature* 250:493–494.
- Vidali, M.(2001) Bioremediation: An overview. *Pure Appl Chem* 73: 1163–1172.
- Vincent, J.B., (1994). Chromium: biological relevance. In: King, R.B. (Ed.), *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, Second ed. vol. 2. Wiley, New York.
- Wahbeh, M. L., (1984). Levels of Zinc, Manganese, Iron and Cadmium in Three Species of Seagrasses from Aqaba (Jordan). *Aquatic Botany*, 20: 179-183.
- Wang, H., (1999). Clastogenicity of Chromium Contaminated Soil Samples Evaluated by Vicia Root- Micronucleus Assay. *Mutat. Res.*, 426: 147-149.
- Wang, Y.-T., Shen, H., (1995). Bacterial reduction of hexavalent chromium. *Journal of Industrial Microbiology* 14, 159–163.
- Wang Y-T., Xiao C., (1995) Factors Affecting Hexavalent Chromium Reduction in Pure Cultures of Bacteria, *Water Res.* 29(11), 2467–2474,.
- Wang, P.C., Mori, T., Toda., K., ve Ohtake, H. (1990). Membrane-Associated Chromate Reductase Activity from *Enterobacter cloacae*. *Journal of Bacteriology*, 172, 1670–1672. American Society for Microbiology.

- Wang, P. C., T. Mori, K. Komori, M. Sasatsu, K. Toda, and H. Ohtake. (1989a). Isolation and characterization of an *Enterobacter cloacae* strain that reduces hexavalent chromium under anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1665–1669.
- Wang, P.-C., T. Mori, K. Toda, ve H. Ohtake. (1989b). Membrane-associated chromate reductase activity from *Enterobacter cloacae*. *J. Bacteriol.* 172:1670–1672.
- Ward, T. J., (1989). The Accumulation and Effects of Metals in Seagrass Habitats. In: Larkum, A. W. D., McComb, A. J., Shepherd, S. A., (Eds.), *Biology of Seagrasses: A Treatise on the Biology of Seagrasses with Special Reference to the Australian Region*. Elsevier, New York. 797-820.
- Wittbrodt, P.R., Palmer, C.D. (1995). Reduction of Cr(VI) in the presence of excess soil fulvic acid. *Environ. Sci. Technol.*, 29, 255-263.
- Wittbrodt, P.R., Palmer, C.D. (1996). Effect of temperature, ionic strength, background electrolytes, and Fe(II) on the reduction of hexavalent chromium by soil humic substances. *Environ. Sci. Technol.*, 30, 2470-2477.
- Wong, P. T. S., Trevors, J. T., (1988). Chromium Toxicity to Algae and Bacteria. In ‘Chromium in the Natural and Human Environments’ (J. O. Nriagu and E. Nieboer, eds.). 20: 305- 316.
- Wood, J. M. (1984). Microbiological strategies in resistance to metal ion toxicity, p. 333–351. In H. Sigel (ed.), *Metal ions in biological systems*. Marcel Dekker Incorporated, New York.
- Xing, L. ve Okrent., D., (1993), Future risk from a hypothesized RCRA site disposing of carcinogenic metal should a loss of societal memory loss occur. *Journal of Hazardous Materials*, 38, 363–384.
- Xu, X.R., Li, H.B., Li, X.Y., Gu, J.D. (2004). Reduction of hexavalent chromium by ascorbic acid in aqueous solutions. *Chemosphere*, 57, 609–611.
- Yamoto, K., J. Kato, T. Yano, ve H. Ohtake. (1993). Kinetics and modeling of hexavalent chromium reduction in *-Enterobacter cloacae*. *Biotechnol. Bioeng.* 41: 129–133.
- Yassi, A., ve E. Nieboer. (1988). Carcinogenicity of chromium compounds, p. 443–496. In J. O. Nriagu and E. Nieboer (eds.), *Chromium in natural and human environments*. John Wiley and Sons, New York.
- Yu, Q., Matheickal, J. T., Yin, P., Kaewsarn, P., (1998). Heavy Metal Uptake Capaties of Common Marine Macro Algal Biomass. *Wat. Res.*, 33: 1534- 1537.
- Zahoor A., Rehman A., (2009) Isolation of Cr(VI) reducing bacteria from industrial effluents and their potential use in bioremediation of chromium containing wastewater, *Journal of Environmental Sciences* 21814–820
- Zakaria Z.A., Zakaria Z. , Surif S. , Ahmada W.A., (2007) Hexavalent chromium reduction by *Acinetobacter haemolyticus* isolated from heavy-metal contaminated wastewater, *Journal of Hazardous Materials* 146 30–38

- Zayed, A.M. and Terry, N. (2003). Chromium in the environment: factors affecting biological remediation, 249, 139–156.
- Zenk, M. H., (1996). Heavy Metal Detoxification in Higher Plants- A Review. *Gene*, 79: 21–30
- Zhang, L., Zhao, L., Yu, Y. T., Chen, C. Z., (1998). Removal Of Lead From Aqueous Solution By Non-Living *Rhizopus Nigricans*. *Water research*. 32,1437–1444.
- Zhu W., Chai L., Ma Z., Wang Y., Xiao H., Zhao K. (2008) Anaerobic reduction of hexavalent chromium by bacterial cells of *Achromobacter sp. Strain Ch1* *Microbiological Research* 163 616—623

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Eda EVGEN

Doğum Tarihi : 02021987

Yazışma Adresi : Pamukkale Üniversitesi

Fen Edebiyat Fakültesi

Biyoloji Bölümü

20070 Denizli, Türkiye

Tel : 0546 4048856

Email : eda.ksu@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Yüksek Lisans (2009-2011) : Biyoloji Ana Bilim Dalı

Pamukkale Üniversitesi

Lisans (2005-2009) : Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Biyoloji Bölümü

Lise (2001-2004) : Bursa Kız Lisesi

Lisans Bitirme Tezi ve Tez Danışmanı: “Geleneksel Kahramanmaraş tarhana Çeşitlerinden *Bacillus sp.*türlerinin izolasyonu, tanımlanması ve amilaz üretme yeteneklerinin belirlenmesi” Prof. Dr. Metin DIĞRAK, KSÜ, Kahramanmaraş, 2009

Yüksek Lisans Tez Başlığı ve Tez Danışmanı: “*Pseudomonas* Cinsi Bakterilerde Hekzavalent Krom İndirgeme Üzerine Ağır Metallerin Etkisi” Doç Dr. Nazime MERCAN DOĞAN, PAÜ, Denizli, 2012