

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***PSEUDOMONAS* CİNSİ BAKTERİLERDE HEKZA VALENT KROM
İNDİRGEME ÜZERİNE ORGANİK MOLEKÜLLERİN ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Göksel DOĞAN**

Anabilim Dalı : Biyoloji

Programı : Moleküler Biyoloji

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN

HAZİRAN 2012

YÜKSEK LİSANS TEZ ONAY FORMU

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü 091461012 nolu öğrencisi Göksel DOĞAN tarafından hazırlanan "Pseudomonas Cinsi Bakterilerde Hekzavalent Krom İndirgeme Üzerine Organik Moleküllerin 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 :Yrd.Doç.Dr. Seher ARSLAN

Jüri Üyesi :Yrd.Doç.Dr. Özlem BÜYÜKTANIR

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 19.07.2012 tarih ve 18/14 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

: Göksel DOĞAN

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, öncesinde ve sonrasında, maddi ve manevi destek ve yardımlarını hiçbir zaman benden esirgemeyen, tecrübe ve eşsiz bilgilerinden yararlandığım değerli hocam Doç. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN'a,

Maddi ve manevi desteklerini her zaman üzerimde hissettiğim değerli hocalarım Prof. Dr. Ramazan MAMMADOV'a, Doç. Dr. Olcay DÜŞEN'e ve Doç. Dr. Serdar DÜŞEN'e

Protein elektroforez çalışmalarında destek veren değerli hocam Yrd. Doç.Dr. Şevki ARSLAN'a,

Bir abla sıcaklığı hissettiğim, iyi günümde, kötü günümde yanımda olan ve bana her zaman yol gösteren, motive eden çok değerli hocam Öğr. Gör. Gülümser ACAR DOĞANLI'ya

Laboratuvar çalışmalarında desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Nilüfer AYDINLIK'a ve çalışma arkadaşlarım Eda EVGEN'e, Nur BOZBEYOĞLU'na ve Dicle ARAR'a

Tezin yazım aşamasında yardımlarını benden esirgemeyen değerli arkadaşım İbrahim DEMİR'e

Ayrıca eğitimim süresince maddi ve manevi yardımlarını eksik etmeyerek beni bugünlere getiren değerli aileme, özellikle de maneviyatı ile ellerini her zaman üzerimde hissettiğim biricik annem Şerife ÇETİN'e sonsuz teşekkürler.

Haziran 2012

Ad Soyad : Göksel DOĞAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	xi
SUMMARY.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Krom.....	2
1.1.1. Krom kullanımı ve kirliliği.....	5
1.1.2. Çevre ve sağlık etkileri.....	5
1.1.3. Beslenme ve toksisite; insan sağlığında riskler.....	6
1.1.4. Mikroorganizma-Cr (VI) ilişkisi.....	7
1.2. Remediasyon Stratejileri.....	9
1.3. Biyolojik Temizleme (Biyoremediasyon).....	11
1.4. Mikrobiyal Cr (VI) Biyoremediasyonu.....	12
1.5. Bakteriyal Cr (VI) İndirgemesi.....	13
1.6. Cr (VI) Dirençlilik Mekanizması.....	16
1.7. Cr (VI) İndirgeyen Bakteriler.....	19
1.8. Cr (VI) İndirgeme Yolları.....	20
1.8.1. Direk ve İndirek Cr (VI) indirgemesi.....	21
1.8.2. Kromat redüktazlar.....	23
1.8.2.1. Aerobik redüktazlar.....	23
1.8.2.2. Anaerobik redüktazlar.....	24
1.8.2.3. Krom varlığında kromat redüktazların indüklenmesi.....	24
1.9. Mikrobiyal Krom İndirgemesini Etkileyen Faktörler.....	25
1.9.1. Hücre yoğunluğu.....	26
1.9.2. Başlangıç Cr (VI) konsantrasyonu.....	26
1.9.3. Elektron akseptörlerinin etkisi.....	27
1.9.4. Sıcaklık ve pH etkileri.....	27
1.9.5. Elektron donörleri olarak organik moleküllerin etkisi.....	28
1.9.6. Cr-Organik Molekül Kompleksleşmesi.....	29
1.9.7. Yer altı sistemlerinde organik asitlerin etkisi altında Cr taşınımı.....	32
1.10. Biyosorpsiyon.....	34
1.10.1. Biyosorpsiyon teorisi ve mekanizmaları.....	34
1.11. <i>Pseudomonas</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	37
1.11.1. Habitatları.....	38
1.11.2. Morfolojisi ve hücre yapısı.....	39
1.11.3. Gelişme ortamları ve fizyolojik özellikleri.....	39
1.11.4. Krom indirgeme ilişkileri.....	40
2. MATERYAL VE METOT.....	43
2.1. Materyal.....	43
2.1.1. Materyal örnekleri.....	43
2.1.2. Araştırmada kullanılan besiyerleri ve kimyasallar.....	44
2.2. Metot.....	49
2.2.1. Besi ortamı belirlenmesi.....	49

2.2.2. Bakteri tiplendirmesi.....	49
2.2.3. Bakterilerin gelişme sıcaklıklarının belirlenmesi.....	49
2.2.4. Bakterilerin hezavalent krom dirençliliğinin belirlenmesi.....	50
2.2.5. Bakterilerin krom indirgemesi.....	50
2.2.6. Analitik metot.....	50
2.2.7. pH'nın etkisi.....	50
2.2.8. Başlangıç krom konsantrasyonunun indirgemeye etkisi.....	50
2.2.9. Organik asitlerin Cr (VI) indirgemesine etkisi.....	51
2.2.10. Organik asitlerin ikili kombinasyonlarının Cr (VI) indirgemeye etkisi.....	51
2.2.11. Biyosorpsiyon.....	51
2.2.12. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE).....	51
2.2.12.1. Kromat redüktaz enziminin indüklenmesi.....	51
2.2.12.2. Poliakrilamid jel elektroforezinin yapılışı.....	52
2.2.12.3. Proteinlerin SDS PAGE'de yürütülmesi ve jellerin boyanması.....	52
2.2.12.4. Proteinlerin moleküler ağırlıklarının hesaplanması.....	52
2.2.13. Scanning elektron mikroskop (SEM) ile görüntüleme.....	52
3. BULGULAR.....	54
3.1. Besi ortamı belirlenmesi.....	54
3.2. Bakterilerin gelişme sıcaklıklarının belirlenmesi.....	54
3.3. Bakterilerin Tiplendirilmesi.....	55
3.4. Bakterilerin Cr (VI) dirençlilik mekanizmalarının belirlenmesi.....	58
3.5. Krom İndirgeme Deneyleri.....	59
3.5.1. Krom indirgemeye pH'ın etkisi.....	59
3.5.2. Krom indirgemeye farklı krom konsantrasyonlarının etkisi.....	61
3.5.3. Krom indirgemeye farklı organik asitlerin etkisi.....	63
3.5.4. Organik asitlerin ikili kombinasyonlarının Cr (VI) indirgemeye etkisi.....	71
3.6. Kromun hücre gelişimine toksik etkisi.....	74
3.7. Biyosorpsiyon.....	84
3.8. Elektroforez.....	86
3.9. Scanning Elektron Mikroskop Görüntüleri.....	87
4. TARTIŞMA.....	88
4.1. Krom İndirgeme deneyleri için suşların seçimi.....	89
4.2. Krom İndirgemeye pH'ın Etkisi.....	89
4.3. Başlangıç Cr (VI) Kons. İndirgemeye ve Hücre Gelişimine Etkisi.....	91
4.4. O.A. ve ikili kombinasyonlarının Cr indirgemesi üzerine etkileri.....	95
4.5. Biyosorpsiyon.....	103
4.6. Krom Varlığında Kromat Redüktazın İndüklenmesi.....	105
4.7. Scanning Elektron Mikroskop (SEM) Analizi.....	106
5. SONUÇ.....	108
KAYNAKLAR.....	109
ÖZGEÇMİŞ.....	128

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

bp	: Baz çifti
dk	: Dakika
g	: Gram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mmol	: Milimol
nm	: Nanometre
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
N	: Normalite
M	: Molarite
NA	: Nutrient agar
NB	: Nutrient broth
LB	: Luria bertani-miller
TSB	: Tryptic soy broth
TSA	: Tryptic soy agar
DPC	: Difenil-karbazid
rpm	: Devir sayısı
MİK	: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
MS	: Kütle spektrofotometrisi
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
ve diğ.	: Ve diğerleri
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
TEM	: Transmisyon elektron mikroskobu

TABLO LİSTESİ

Tablolar

1. 1.1: Krom elementinin fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	4
2. 1.2: Atık sulardan Cr (VI) uzaklaştırma teknolojileri.....	10
3. 1.3: Bilinen krom(VI) indirgeyen bakteriler.....	19
4. 1.4: Sulu ortamlarda pH'a bağlı Cr (III) bileşikleri.....	26
5. 2.1: Bakterilerin kodları ve izole edildiği kaynaklar.....	43
6. 2.2: Mac Farland Metoduna göre X ve Y'nin karışım oranları.....	45
7. 3.1: İzole edilen bakterilerin uygun besi ortamının belirlenmesi.....	54
8. 3.2: İzole edilen bakterilerin sıcaklığa karşı toleransları.....	55
9. 3.3: P18 suşunda ait farklı pH değerlerinin Cr (VI) indirgemeye etkisi(OD ₅₄₀).....	60
10. 3.4: P22 suşunda ait farklı pH değerlerinin Cr (VI) indirgemeye etkisi(OD ₅₄₀).....	61
11. 3.5: 110 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit ortamlarında P18 suşuna ait Cr (VI) indirgemesi (OD ₅₄₀).....	63
12. 3.6: 80 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit ortamlarında P18 suşuna ait Cr (VI) indirgemesi (OD ₅₄₀).....	64
13. 3.7: 50 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit ortamlarında P18 suşuna ait Cr (VI) indirgemesi (OD ₅₄₀).....	65
14. 3.8: 30 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit ortamlarında P18 suşuna ait Cr (VI) indirgemesi (OD ₅₄₀).....	66
15. 3.9: 25 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit ortamlarında P22 suşuna ait Cr (VI) indirgemesi (OD ₅₄₀).....	67
16. 3.10: 20 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit ortamlarında P22 suşuna ait Cr (VI) indirgemesi (OD ₅₄₀).....	68
17. 3.11: 15 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit ortamlarında P22 suşuna ait Cr (VI) indirgemesi (OD ₅₄₀).....	69
18. 3.12: 10 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit ortamlarında P22 suşuna ait Cr (VI) indirgemesi (OD ₅₄₀).....	70
19. 3.13: P18 suşunda organik moleküllerin ikili kullanımlarının Cr (VI) indirgemeye etkisi (OD ₅₄₀).....	72
20. 3.14: P22 suşunda organik moleküllerin ikili kullanımlarının Cr (VI) indirgemeye etkisi (OD ₅₄₀).....	73
21. 3.15: Cr (VI) içermeyen TSB ve farklı organik asit ortamlarında P18 suşuna ait hücre yoğunlukları (OD ₆₀₀).....	74
22. 3.16: 110 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit ortamlarında P18 suşuna ait hücre yoğunlukları (OD ₆₀₀).....	75
23. 3.17: 80 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit ortamlarında P18 suşuna ait hücre yoğunlukları (OD ₆₀₀).....	76
24. 3.18: 50 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit ortamlarında P18 suşuna ait hücre yoğunlukları (OD ₆₀₀).....	77
25. 3.19: 30 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit	

ortamlarında P18 suşuna ait hücre yoğunlukları (OD_{600}).....	78
26. 3.20: Cr (VI) içermeyen TSB ve farklı organik asit ortamlarında P22 suşuna ait hücre yoğunlukları (OD_{600}).....	79
27. 3.21: 25 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit ortamlarında P22 suşuna ait hücre yoğunlukları (OD_{600}).....	80
28. 3.22: 20 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit ortamlarında P22 suşuna ait hücre yoğunlukları (OD_{600}).....	81
29. 3.23: 15 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit ortamlarında P22 suşuna ait hücre yoğunlukları (OD_{600}).....	82
30. 3.24: 10 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit ortamlarında P22 suşuna ait hücre yoğunlukları (OD_{600}).....	83
31. 3.25: P18 suşunda farklı konsantrasyonlarda Cr (VI) biyosorpsiyonu (OD_{540}).....	84
32. 3.26: P22 suşunda farklı konsantrasyonlarda Cr (VI) biyosorpsiyonu (OD_{540}).....	85

ŞEKİL LİSTESİ

Şekiller

1. 1.1: Periyodik tablo.....	2
2. 1.2: Cr (VI) toksisite ve mutajenitesinin şekilsel diyagramı.....	7
3. 1.3: Aerobik ve anaerobik şartlar altında Cr (VI) indirgeme mekanizması.....	15
4. 1.4: Bakterilerde Cr (VI) dirençlilik mekanizması	17
5. 1.5: Cr (VI) indirgeme yolları.....	22
6. 1.6: Toprakta krom mobilizasyonuna/immobilizasyonuna etki eden faktörlerin ve proseslerin şematik gösterimi.....	34
7. 3.1: İzolatların 16S rRNA analizine göre filogenetik ağacı.....	56
8. 3.2: P18 suşunun DNA baz dizileri.....	57
9. 3.3: P22 suşunun DNA baz dizileri.....	57
10. 3.4: P18 ve P22 suşunun karşılaştırmalı DNA baz dizi analizleri.....	58
11. 3.5: Bakterilerin MİK değerleri.....	59
12. 3.6: P18 suşunun pH değişimine bağlı Cr (VI) indirgemesi.....	60
13. 3.7: P22 suşunun pH değişimine bağlı Cr (VI) indirgemesi.....	61
14. 3.8: P18 suşunda farklı krom konsantrasyonlarının Cr (VI) indirgemeye etkisi.....	62
15. 3.9: P22 suşunda farklı krom konsantrasyonlarının Cr (VI) indirgemeye etkisi.....	62
16. 3.10: P18 suşunun 110 ppm Cr (VI) konsantrasyonunda farklı organik asitlerin krom indirgemeye etkisi.....	63
17. 3.11: P18 suşunun 80 ppm Cr (VI) konsantrasyonunda farklı organik asitlerin krom indirgemeye etkisi.....	64
18. 3.12: P18 suşunun 50 ppm Cr (VI) konsantrasyonunda farklı organik asitlerin krom indirgemeye etkisi.....	65
19. 3.13: P18 suşunun 30 ppm Cr (VI) konsantrasyonunda farklı organik asitlerin krom indirgemeye etkisi.....	66
20. 3.14: P22 suşunun 25 ppm Cr (VI) konsantrasyonunda farklı organik asitlerin krom indirgemeye etkisi.....	67
21. 3.15: P22 suşunun 20 ppm Cr (VI) konsantrasyonunda farklı organik asitlerin krom indirgemeye etkisi.....	68
22. 3.16: P22 suşunun 15 ppm Cr (VI) konsantrasyonunda farklı organik asitlerin krom indirgemeye etkisi.....	69
23. 3.17: P22 suşunun 10 ppm Cr (VI) konsantrasyonunda farklı organik asitlerin krom indirgemeye etkisi.....	70
24. 3.18: P18 suşunda organik moleküllerin ikili kullanımlarının Cr (VI) indirgemeye etkisi.....	72
25. 3.19: P22 suşunda organik moleküllerin ikili kullanımlarının Cr (VI) indirgemeye etkisi.....	73
26. 3.20: P18 suşunun Cr (VI) içermeyen TSB ve farklı organik asit ortamlarında zamana bağlı hücre yoğunluk değişimi.....	74

27. 3.21:	P18 suşunun 110 ppm Cr (VI) içeren TSB ve farklı organik asit ortamlarında zamana bağlı hücre yoğunluk değişimi.....	75
28. 3.22:	P18 suşunun 80 ppm Cr (VI) içeren TSB ve farklı organik asit ortamlarında zamana bağlı hücre yoğunluk değişimi.....	76
29. 3.23:	P18 suşunun 50 ppm Cr (VI) içeren TSB ve farklı organik asit ortamlarında zamana bağlı hücre yoğunluk değişimi.....	77
30. 3.24:	P18 suşunun 30 ppm Cr (VI) içeren TSB ve farklı organik asit ortamlarında zamana bağlı hücre yoğunluk değişimi.....	78
31. 3.25:	P22 suşunun Cr (VI) içermeyen TSB ve farklı organik asit ortamlarında zamana bağlı hücre yoğunluk değişimi.....	79
32. 3.26:	P18 suşunun 25 ppm Cr (VI) içeren TSB ve farklı organik asit ortamlarında zamana bağlı hücre yoğunluk değişimi.....	80
33. 3.27:	P22 suşunun 20 ppm Cr (VI) içeren TSB ve farklı organik asit ortamlarında zamana bağlı hücre yoğunluk değişimi.....	81
34. 3.28:	P22 suşunun 15 ppm Cr (VI) içeren TSB ve farklı organik asit ortamlarında zamana bağlı hücre yoğunluk değişimi.....	82
35. 3.29:	P22 suşunun 10 ppm Cr (VI) içeren TSB ve farklı organik asit ortamlarında zamana bağlı hücre yoğunluk değişimi.....	83
36. 3.30:	P18 suşunun 30, 50, 80, 110 ppm Cr (VI) konsantrasyonlarında biyosorbsiyonu.....	84
37. 3.31:	P22 suşunun 10, 15, 20 ve 25 ppm Cr (VI) konsantrasyonlarında biyosorbsiyonu.....	85
38. 3.32:	P18 ve P22 suşunun periplazmik proteinlerinin SDS-PAGE profilleri.....	86
39. 3.33:	P18 suşunun 110 ppm kromlu ve kromsuz ortamdaki SEM görüntüsü.....	87

ÖZET

PSEUDOMONAS CİNSİ BAKTERİLERDE HEKZAVALENT KROM İNDİRGEME ÜZERİNE ORGANİK MOLEKÜLLERİN ETKİSİ

Bu çalışmada 16S rRNA sekans analizi sonuçlarına göre toplam 12 izolat içerisinde 5 farklı türün mevcut olduğu tespit edilmiştir. Bu izolatların 3'ü *Enterobacter cancerogenus*, 4'ü *Pseudomonas mendocina*, 1'i *Exiguobacterium aurantiacum*, 2'si *Pseudomonas stutzeri* ve 2'si *Enterobacter cloacae* olarak kaydedilmiştir.

Bakterilerin krom dirençliliği, Minimum İnhibisyon Konsantrasyonuna (MİK) göre belirlenmiştir. Krom indirgeme deneyleri *P. mendocina* PASS3-P18 (110 mg/L) ve *P. mendocina* DS0601-FX-P22 (25 mg/L) suşları ile yapılmıştır. *P. mendocina* PASS3-P18 ve *P. mendocina* DS0601-FX-P22 suşlarında krom indirgemeyi etkileyen şartlar optimize edilmiştir. Her iki bakterinin optimal gelişme sıcaklıkları 37 °C olarak belirlenmiş ve tüm krom indirgeme deneyleri Triptik Soy Broth (TSB) besiyerinde yapılmıştır.

Bu çalışmada pH, farklı krom konsantrasyonları ve elektron kaynağı olarak aljinik asit, galakturonik asit, glukuronik asit ve sitrik asit gibi organik asitlerin ve bunların ikili kombinasyonlarının bakteriyel krom indirgemesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Ayrıca her iki bakteri için biyosorpsiyon çalışmaları da yapılmıştır. Başlangıç krom konsantrasyonunun etkisinin belirlenmesinde, *P. mendocina* PASS3-P18 suşu için 110, 80, 50 ve 30 ppm, *P. mendocina* DS0601-FX-P22 bakterisi için 25, 20, 15 ve 10 ppm Cr (VI) konsantrasyonları kullanılmıştır. Krom indirgeme, difenil karbazid metoduna göre yapılmıştır.

Çalışma sonunda elde edilen verilere göre , bakterilerin en iyi indirgeme yaptıkları pH dereceleri *P. mendocina* PASS3-P18 suşu için pH 7.0 ve *P. mendocina* DS0601-FX-P22 suşu için pH 6.0 olarak kaydedilmiştir. P18 suşu için krom indirgeme süreleri açısından 110 ve 80 ppm krom konsantrasyonları arasında bir fark gözlenmezken, krom miktarı 50 ve 30 ppm'de krom indirgeme süresi azalmıştır. 110 ve 80 ppm krom kullanıldığında 168 saat süren krom indirgeme süresi, 50 ppm için 84 saate ve 30 ppm için 60 saate düşmüştür. P22 suşu için ise kullanılan krom konsantrasyonları arasında bir fark bulunmayıp, bütün krom konsantrasyonlarında krom indirgemesi 36 saat sürmüştür.

Organik asitlerin krom indirgemesi üzerine etkisine bakılacak olursa, P18 suşu için genel olarak kullanılan tüm krom konsantrasyonlarında galakturonik ve glukuronik asit kullanıldığında krom indirgeme süreleri önemli derecede azalmıştır. Aljinik asit tüm krom konsantrasyonlarında krom indirgemesinde hiçbir etki göstermemiştir. P22 suşu açısından, genel olarak kullanılan tüm krom konsantrasyonlarında galakturonik ve glukuronik asit krom indirgeme sürelerini azaltmışlardır. Fakat hem sitrik asit hem de aljinik asit bu bakteri için krom indirgemesi üzerine etki etmemiştir.

Organik asitlerin ikili kombinasyonlarının krom indirgemesi üzerine olan etkileri incelendiğinde her iki bakteri için de galakturonik ve glukuronik asitin birbirleriyle ve diğer organik asitlerle kombinasyonlarının olumlu etkisi tespit edilmiştir.

Biyosorpsiyon deneylerinde her iki bakterinin de hücre yüzeyinde kromu tutmadığı görülmüştür. Bu sonuç, çalışmamızda kullanılan bakterilerin kromu indirgediğine dair bir kanıt niteliğindedir.

Pseudomonas mendocina PASS3-P18 için yapılan scanning elektron mikroskop görüntülerinde kromlu ve kromsuz ortamdaki hücreler karşılaştırıldığı zamanla kromlu ortamdaki hücrelerin dejenere olmuş yapıları net bir biçimde farkedilebilmektedir.

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

Anahtar kelimeler: *Pseudomonas*, bakteriyel krom indirgeme, hegzavalent krom, biyosorpsiyon, biyoremediasyon, galakturonik asit, glukuronik asit, sitrik asit, aljinik asit

SUMMARY

THE EFFECT OF ORGANIC ACIDS ON HEXAVALENT CHROMIUM REDUCTION BY *PSEUDOMONAS*

In this study, as a result of the 16S rRNA sequence analysis, 5 different types of bacteria out of a total of 12 isolates were found. Three of them are *Enterobacter cancerogenus*, four of them are *Pseudomonas mendocina*, one of them is *Exiguobacterium aurantiacum*, two of them are *Pseudomonas stutzeri*, another two are *Enterobacter cloacae*.

The chromium resistance of bacteria was determined by Minimum Inhibition Concentration (MIC). The chromium reduction experiments were done by *P. mendocina* PASS3-P18 (110 mg/L) strain and *P. mendocina* DS0601-FX-P22 strain (25 mg/L). For the selected strains *P. mendocina* PASS3-P18 and *P. mendocina* DS0601-FX-P22, the effect of conditions on chromium reduction were optimized. For both of the bacteria, the optimal temperature was determined at 37 °C and the chromium reduction were conducted in Tryptic Soy Broth (TSB) medium.

In this study, the effects of the pH, chromium concentrations, and organic acids such as alginic acid, galacturonic acid, glucuronic acid, and citric acid, and their binary combinations on the bacterial chromium reduction were investigated. Biosorption were also done for both bacterial strains. For the effect of initial chromium concentrations; 110, 80, 50 and 30 ppm were used for *P. mendocina* PASS3-P18 and 25, 20, 15 ve 10 ppm for *P. mendocina* DS0601-FX-P22, respectively. Chromium reduction were conducted diphenylcarbazide method.

According to the findings that were obtained at the end of the study, the best pH degree in which the bacteria indicated high reduction degree for *P. mendocina* PASS3-P18 strain was 7.0 while it was 6.0 for *P. mendocina* DS0601-FX-P22. The chromium reduction times decreased for 50 ppm and 30 ppm of chromium concentrations while there was no difference between 110 ppm and 80 ppm of chromium concentrations for P18 strain. While the reduction time was 168 h in 110 and 80 ppm, it was 84 h and 60 hours in 50 and 30 ppm, respectively.

Regarding the effects of the organic acids used in the study; generally, the times of chromium reduction decreased significantly in all the chromium concentrations, when galacturonic acid and glucuronic acid were utilized by the P18 strain. Alginic acid did not have any effect in all chromium concentrations on the bacterial chromium reduction. In general, the chromium reduction times decreased significantly in all chromium concentrations, when galacturonic acid and glucuronic acid were utilized. The citric acid and alginic acid have not effected on the bacterial chromium reduction.

Regarding the effects of binary combinations of organic acids on the bacterial chromium reduction; the combinations of galacturonic and glucuronic acids with each other and other organic acids have positive effect for both strains.

In the biosorption experiments conducted for both of the P18 and the P22 strains, 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 strains reduced chromium.

Upon analyzing the scanning electron microscope, when we compared the media with and without chromium, we observed that the cells degenerated in presence chromium for *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18..

As a result of SDS-PAGE analysis, it was observed a protein band approximately 31 kDa in *P. mendocina* DS0601-FX-P22. In *P. mendocina* PASS3-P18, two different protein bands were found. One of protein bands was approximately 29 kDa and the other one was approximately 52 kDa.

Keywords: *Pseudomonas*, bacterial chromium reduction, hexavalent chromium, biosorption, bioremediation, galacturonic acid, glucuronic acid, citric acid, alginic acid

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, cıva, kurşun, krom, kadmiyum, nikel, demir, bakır, çinko gibi metal ve ağır metaller kirliliğe neden olmaktadır. Ağır metaller canlılar için toksik olup, vücuda girdikleri zaman ciddi hastalıklara ve ölümlere neden olurlar.

Kimyasal çökeltilme metalleri istenilen seviyelere indirebilmek için aşırı kimyasal kullanımı gereklidir, 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 ziyade atık sularındaki 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 sularındaki ağır metallerin giderimi ve geri kazanımı mümkün olabilmektedir.

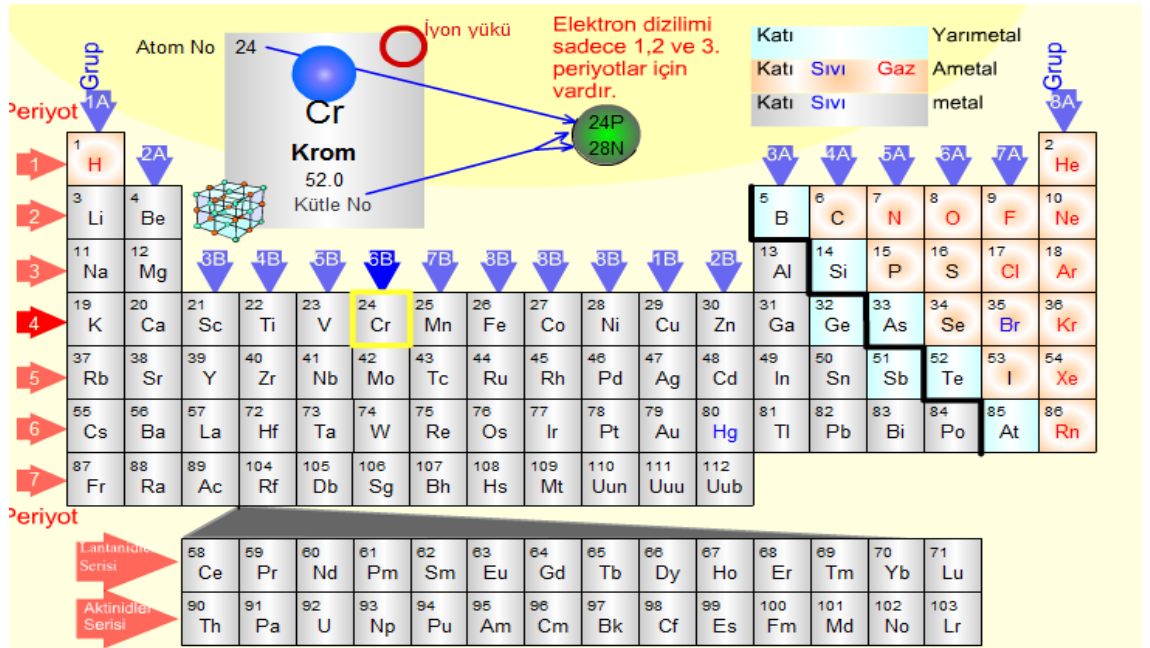
Krom, metal ve kromatlar şeklinde bulunan ve çok geniş ölçüde korozyon önleyici uygulamalarda kullanılan bir elementtir. Cr (VI)'nın ana kaynakları; deri, boya, mürekkep, kumaş boyası, alüminyum vb. endüstrilerdir. Son yıllarda, kromun giderimi için daha ucuz alternatif yöntemler araştırılmaktadır. Ağır metal iyonlarının adsorpsiyonu için alg, bakteri, mantar ve mayaların biyosorbent olarak kullanılabilirleri kanıtlanmıştır (Nakiboğlu ve Sevindir, 2006; Srinath ve diğ. 2002; Kıvanç ve diğ. 1996). Krom indirgeme üzerine organik asitler, 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 suşlarında galakturonik asit, glukuronik asit, sitrik asit ve aljinik asit gibi organik asitlerin Cr (VI) indirgemeye etkilerinin

belirlenmesi hedeflenmiştir. Cr (VI) için elektron kaynağı olarak işlev gören bu tür organik maddeler toprak ve su gibi doğal ortamlarda mevcuttur. Bu tür moleküllerin hem kendi aralarındaki etkileşimleri hem de bu ortamlarda bulunan krom indirgeyici mikroorganizmalar üzerindeki etkileri tam olarak bilinmemektedir. Bu tez çalışması ile bazı moleküllerin krom indirgeme üzerindeki etkileri ile ilgili bilgi sahibi olunacaktır. Elde edilecek bilgiler konu ile ilgili daha detaylı çalışmalara zemin oluşturabilecektir. Biyoremediasyon çalışmalarında krom indirgemeye etki eden faktörlere bir yenisi daha ilave edilmiş olunacaktır.

1.1. Krom

Atom numarası 24, atomik ağırlığı 51,996 g/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, 2006). Cr, $Ar3d^54s^1$ elektronik konfigürasyon durumuyla periyodik tablonun VI-B grubunda yer alır (Şekil 1.1 Periyodik tablo).



Geleneksel olarak sadece laboratuvar koşulları altında gözlenen Cr’un stabil olmayan ve biyolojik sistemlerdeki kısa ömre sahip diğer değerlikteki durumlarına karşın, 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 oksianyonlarla kompleks yapmış formda bulunmaktadır (Molakwane, 2010; Shanker ve diğ., 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 diğ., 1999).

Krom dünyada en çok bulunan yedinci element olup, yer kabuğunda ise 21. sıradadır (McGrath ve Smith, 1990). 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} $\mu\text{g/m}^3$ arasındayken kirli alanlarda 0.015-0.03 $\mu\text{g/m}^3$ arasındadır (Nriagu, 1988). Krom, tabak yapımı, boyama, alaşım, kimyasal maddelerin yapımı (Palmer ve Wittbrodt, 1991), maden sanayii, pigment, tekstil ve elektro kaplamacılıktaki (Vajpayee ve diğ.,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 elektrokaplama gibi kimyasal endüstri prosesinde kullanılmaktadır (McGrath ve Smith, 1990; Papp, 1985; Stern, 1982). 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 diğ., 2001) . Çevredeki kromun kritik değerlendirmeleri üzerine detaylı derlemeler Kimbrough ve diğ. (1999), Kotas ve Stasicka (2000) tarafından da yapılmıştır. Atık sulardaki izin verilen Cr miktarı 2.0 $\mu\text{g/ml}$ iken bu değer genellikle 2000-5000 $\mu\text{g/mL}$ 'yi bulmaktadır (Vajpayee ve diğ.,1999).

Kaplamacılık endüstrisi atık sularındaki Cr (VI) ve Cr (III) derişimleri sırasıyla 25-100 ve 5-50 µg/L arasındayken tabak yapımı endüstrisindeki Cr (III) konsantrasyonu 1500 µg/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). Krom elementinin fiziksel ve kimyasal özellikleri Tablo 1.1.'de verilmiştir.

Tablo 1.1: Krom elementinin fiziksel ve kimyasal özellikleri (Özdiş 2005)

Ortalama atomik kütle	51.9961
Kaynama noktası	294 K 2672 °C 4828 °F
Boyca genleşme 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 endüstrileri olup (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 arttırır (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 diğ., 1986). Cr(V) kompleksleri, NAD(P)H, FADH₂, bazı pentozlar ve glutatyon gibi fizyolojik indirgeyici ajanlar tarafından Cr (VI) 'nın redüksiyonuyla oluşmaktadır. 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 kromindirgeyici ajanlar, vitamin C ve B12, sitokrom P-450 ve mitokondriyal solunum zinciridir (Alcedo ve Wetterhahn, 1990).

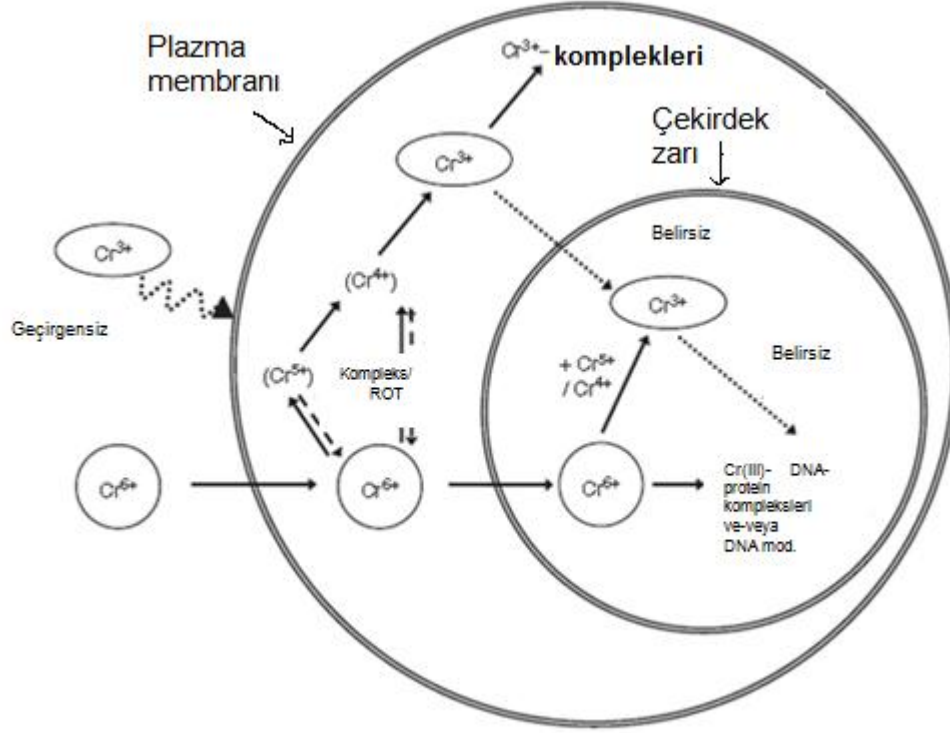
İntraselüler Cr (III), DNA'nın fosfat grupları tarafından tutulmakta ve bu da replikasyonu, transkripsiyonu etkilemekte ve mutasyona neden olmaktadır (Bridgewater ve diğ., 1994; Costa, 1991; Nishio ve Uyeki, 1985). DNA üzerindeki oksidatif hasarın krom tarafından üretilen genotoksik etkinin sonucunda olduğu düşünülmektedir (Luo ve diğ., 1996; Itoh ve diğ., 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 diğ., 2001; Travieso ve diğ., 1999; Snow, 1994).

1.1.3. Beslenme ve toksisite; insan sağlığında riskler

Cr (VI) mutajenik ve kanserojenik özelliklerinden dolayı A grubu insan kanserojen maddesidir. Hekzavalent krom toksik ve mutajenik iken, trivalent krom besinsel olarak kullanılan formdur. Cr (VI), insan karsinojeni olmasına karşın Cr (III) insan fizyolojisinde esansiyel bir elementtir ve glukoz ve yağ metabolizmasında rol oynar (Mertz, 1993; Anderson, 1989). İnsanlar, Cr (VI) bileşiklerini inhalasyon, dermal temas ve yutma yoluyla alabilmektedirler. Cr (VI) 'ya maruz kalındığında, sindirim sistemi ve akciğerlerde kansere (Kaufman, 1970), mide bulantısına, ishale, kanamalara neden olabilir (Gupta ve diğ., 2001; Browning, 1969). 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 membranların irritasyonu, nazal septum, böbrek tübül nekrozu ve solunum yolu enfeksiyonlarının artması gibi bir takım sağlık risklerine yol açar (Flessel, 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 düzenlenmesinin Cr (III)'den farklı olduğu belirlenmiştir. Kromun biyotoksisitesi

büyük ölçüde biyolojik membranları geçme yeteneğinin ve oksitleme gücü kapasitesinin bir fonksiyonudur (NAS, 1974). Kromun hücre içerisinde izlediği yol, toksisite ve mutajenitesi Şekil 1.2’de şematize edilmiştir.



Şekil 1.2: Cr (VI) toksisite ve mutajenitesinin şekilsel diyagramı. (Cheung ve diğ., 2006 ve Vincent, 1994)

1.1.4. Mikroorganizma-Cr (VI) ilişkisi

Hekzavalent kromun bakterilerde rapor edilen görülebilir etkileri arasında, hücre uzaması, genişlemesi ve genellikle hücre büyüme inhibisyonuna yol açan inhibe olmuş hücre bölünmeleri bulunmaktadır (Coleman ve Paran, 1983; Theodotou ve diğ., 1976). Gram(+) ve Gram(-) bakterilerin morfolojilerinde değişimler Bopp ve diğ., (1983) tarafından gözlemlenmiştir. Araştırmacılar, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus cereus* ve *B. subtilis* gibi birkaç bakteri türü kolonilerinde 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 diğ., 1981). Cr (VI) , *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, ve *Salmonella typhimurium*’da da mutajenik etkilere neden olmaktadır (Petrilli ve De 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 alımının equimolar çözeltilerdeki Cr (III)'e göre en az 10 kez daha fazla olduğu hücre kültürü çalışmalarında da gözlemlenmiştir (Cupo ve Wettrhahn, 1984; Levis ve diğ., 1978; Gray ve Sterling, 1950). Ancak, hegzavalent kromun çoğu hücre içinde askorbik asit, sodyum sülfid, glutatyon, NADH ve NADPH gibi birtakım indirgeyici ajanlarla trivalent kroma indirgenir (Petrilli ve De Flora, 1978).

Bazı çalışmalara göre, trivalent kromun DNA iplikçik kırıklarına neden olduğu sonucuna varılmıştır (Bianchi ve Levis, 1984; Bianchi ve diğ., 1984; De Flora ve diğ., 1984; Tsapakos ve diğ., 1983; Tsapakos ve Wetterhahn, 1983; Levis ve diğ., 1978; Tsuda ve Kato, 1977). Cr (VI) bakteri hücrelerinde baz çifti yer değiştirmesi ve çerçeve kayması mutasyonlarını içeren genotoksik etkilere neden olur (Petrilli ve De Flora, 1977). De Flora ve diğ. (1984) dengelenmemiş nükleotit havuzlarının bir çok genel etkisinden bahsetmektedir.

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

S. cerevisiae'de krom toksisitesinin, fermente edilebilir substanslardaki hücre büyümesine oranla, fermente edilemeyen karbon organik asitlerdeki hücre büyümesi üzerinde daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Henderson, 1989). Bununla birlikte diğer etkileri oksijen alımının 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).

1.2. Remediasyon Stratejileri

Remediasyon stratejileri, kamunun krom ile kontamine olmuş alanlara maruz kalma riskini en aza indirmek amacıyla çalışılmaktadır. Yaygın remediasyon stratejileri; hareketsiz bırakma seçeneği, kontamine toprağı kazıma ve uzaklaştırma, hava basma ve işleme, toprak katılaştırması ve stabilizasyonunu içerir. Optimal remediasyon stratejisini uygulamak için kromun kimyasal durumunu ve göçünü etkileyen fiziksel ve kimyasal proseslerin anlaşılması gereklidir. Eğer çevrede potansiyel etki ve maruz kalma riski sınırdadır ise hareketsiz bırakma seçeneği kabul edilir. Toprak indirgeyici tiplerinin varlığının bilinmesi bu seçeneğin uygulanması için önemlidir. Kazı, basitçe kontamine toprağın bir yerden başka bir yere taşınımını sağladığı için günümüzde çok tercih edilen bir metottur. Havalandırma ve işleme metodu sucül remediasyonda en yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntemin amacı kontaminantları yüzeylerden uzaklaştırmak ve engellemektir. 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 çözünmeyen kimyasal forma dönüştürülerek kontamine toprakların katılaştırmasını içerir (Sharma, 2002).

Cr (VI) remediasyonu için kullanılan kimyasal ve fiziksel işlemlerli metotlar, 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 1.2'de verilmiştir. Tabloda aynı zamanda bu yöntemlerin avantaj ve dezavantajları da belirtilmiştir.

Tablo 1.2: Atık sulardan Cr (VI) uzaklaştırma teknolojileri (Şencan 2006)

Metot	Dezavantajları	Avantajları
Kimyasal Çökeltme	Zor ayırım Toksik çamur problemi Çok etkili değil Metal ve su geri kazanımına dikkat edilmez.	Kolay Nispeten ucuz
Elektrokimyasal arıtma	Yüksek metal konsantrasyonları için uygulanması Spesifik koşullara (girişim yapan bileşiklerin varlığı) karşı hassas olması Yüksek ilk yatırım ve işletme maliyeti	Metal geri kazanımı
Ters osmoz	Yüksek basınçta çalışması Membran tıkanması Pahalı	Çıkış suyu saftır(yeniden kullanılabilir).
İyon değişimi	Partiküllere hassas Reçinelerin pahalı olması	Etkili Metal geri kazanımı mümkün
Adsorbsiyon	Bazı metaller için etkili olmaması	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 diğ. 2002; Kıvanç ve diğ. 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 diğ., 2008). Kontamine olmuş toprak ve yer altı suları ile ilgili problemler, genellikle atık suların düzgün biçimde imhası için gerekli bilgi ve becerilerin eksikliğinden dolayı doğru iyileştirme olmaksızın endüstriyel atıkların çevreye antropojenik katılımlarının bir sonucudur. Sonuç olarak bu kirliliğin mağduru su yüzeyleri ve topraktır, öyle ki insan ve hayvanların tüketmeleri dahi söz konusu olabilir (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 uygulama 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 bileşiği 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 diğ.,1998).

1.4. Mikrobiyal Cr (VI) Biyoremediasyonu

Bioremediasyon birçok sanayi ülkesinde son otuz yıldır tamamen ticari teknoloji için laboratuarda geliştirilmiştir. 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 popülasyonun genellikle toprak ekolojisi üzerindeki insan kaynaklı etkilerin kolay ve duyarlı bir göstergesi olduğu ileri sürülmüştür. Cr (VI) 'nın toprakta mikrobiyal popülasyonun 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, 2007). 1970'lerde Cr (VI) indirgeme yeteneğine sahip ilk mikrobun keşfinden beri (Romanenko ve Korenkov, 1977), Cr (VI) indirgeyen mikroorganizmalar üzerine araştırmalar izole edilmiş çok sayıdaki suş ile hevesle takip edilmiştir. Son yıllarda aerobik bakterilerden izole edilen ve saflaştırılan Cr (VI) redüktazlara bağlı olarak anaerobik şartlar altında oluşan Cr (VI) indirgemesi içeren prosesler de anlaşılmaya başlanmakta ve kromla kontamine bölgelerin iyileştirmesi için biyolojik prosesler çok umut verici hale gelmektedir. Cr (VI) remediasyonu ve azaltılması için geliştirilen teknolojilerde, ya in situ mikrobiyal stratejileri ya da in situ biyoremediasyon stratejileri kullanılır.

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*'nın 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 diğ., (2007) karışık *Pseudomonas* kullanarak karsinojenik Cr (VI)'nin biyolojik uzaklaştırmasını 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 mümkün olmaktadır. $(SO_4)^{2-}$ 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.

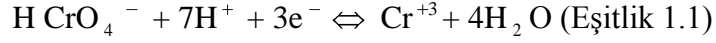
Okeke (2008) sudan izole tuz tolere eden bir bakteri olan *Exiguobacterium sp.* GS1 ile heksavalent kromun biyolojik uzaklaştırmasını çalıştı. Çalışma sonuçları izolatın 12 saat içinde önemli ölçüde hem düşük hem de yüksek konsantrasyonlarda (1-200 µg mL/1) Cr (VI) 'yı uzaklaştırdığını gösterdi. Benzer 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 diğ., (2009) Çin'in Hunan şehrinde bir çelik-alaşım fabrikasında krom içeren cüruflla kontamine olmuş topraklarda doğal bakterilerle Cr (VI) remediasyonunu rapor ettiler. Onların sonuçları kontamine topraklarda yeterli besin sağlandığında, 10 günde % 97.8 oranda azalma ile total Cr (VI) konsantrasyonuna ait, başlangıç değeri 462.8 mg/kg'dan 10 mg/kg'a düşmüştür. Suda çözünen Cr (VI)'nin başlangıç değeri 383.8 mg/kg'dan 1.7 mg/kg'a düşmüştür. Değiştirilebilir ve karbonat bağlı Cr (VI) sırasıyla % 92.6 ve % 82.4 oranında uzaklaştırılmıştır.

1.5. Bakteriyal Cr (VI) İndirgemesi

Krom indirgeyen bakteriler yıllarca çalışılmasına rağmen, Cr (VI) indirgeme mekanizması ve biyokimyası hakkında çok az bilgi vardır. Cr (VI) 'nın hücrelerce alınıp alınmadığı ya da sitoplazma veya periplazmada dışarıya transfer edilen elektronlarca indirgenip indirgenmediği hala belirsizliğini korumaktadır. Hücreler ve metal oksitler arasındaki direk etkileşimin enerji korunum süreçlerini gerektirdiği gösterilmiştir (Arnold ve diğ., 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 manganez gibi elektron akseptörleri varlığına bağlıdır. Elektron donörleri fazla ve yukarıda bahsedilen elektron akseptörleri düşük olduğunda şartlar Cr (VI) indirgemesini

destekleyecektir. Hekzavalent krom oksitleyici bir ajandır ve aşağıda Eşitlik 1.1’de gösterildiği gibi uygun elektron donörleri varlığında kolayca indirgenir (Sharma, 2002).

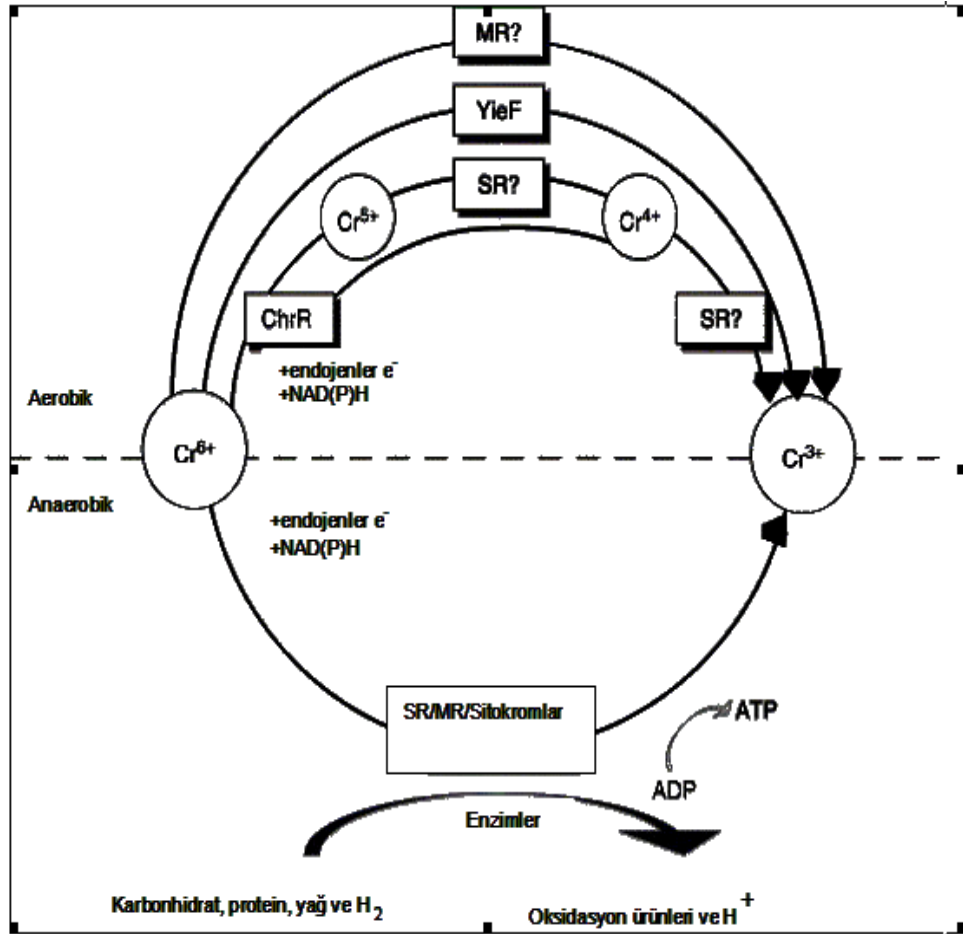


Cr (VI) ’yı Cr (III)’e indirgeme yeteneğindeki mikroorganizmaların keşfi bu stratejilerin gelişmesinde önemli bir potansiyele sahiptir. 1977’de ilk kez rapor edilen bakteriyel suşlardan *Pseudomonas*, Rus bilim adamları N.A. Romanenko ve V. Korenkov tarafından kromatla kontamine olmuş arıtma çamurundan izole edilmiştir. 1977’den sonra *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. ambigua*, *P. fluorescens*, *E. coli*, *Achromobacter eurydice*, *Micrococcus roseus*, *Enterobacter cloacae*, *Desulfovibrio desulfuricans* ve *D. vulgaris* gibi türlere ait 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 diğ., 2003a; Guha ve diğ., 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 hekzavalent 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 *Pseudomaonas 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 aralıkta krom indirgeme verimliliği sergilemektedir. Donati ve arkadaşları (2001) *Thiobacillus ferrooxidans*’da Cr (VI) indirgemelerini etkileyen faktörleri çalışmıştır. Enerji kaynağı olarak sülfür kullanan *T. ferrooxidans* kültürlerinin Cr (VI) indirgeme yeteneklerinin yüksek indirgeme gücü ile sülfür bileşiklerinin (sülfid, tiyosülfat ve politiyonatlar) jenerasyonu ile olduğu bildirilmiştir. Diğer Cr (VI) indirgeyen mikroorganizmaların aksine, *T. ferrooxidans* düşük pH’da daha yüksek Cr (VI) indirgemesi göstermiştir. 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.

Bakteriler sitokromları da içeren elektron transport sistemleri aracılığıyla aerobik ve anaerobik şartlar altında Cr (VI) 'yı indirgeyebilirler. Cr (VI) indirgemelerini içeren süreç aerobik ve anaerobik şartlar altında olabilir (Cheung ve Gu, 2007). Aerobik ve şartlar altında enzimatik ve diğer aracı maddelerle Cr (VI) indirgeme mekanizması Şekil 1.3'te gösterilmiştir.



Şekil 1.3: Aerobik ve anaerobik 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) indirgemelerinin stabil son ürünü olarak Cr (III) oluşur. Cr(V)'in Cr(IV)'e ve Cr (III)'e indirgenmesinin enzim aracılığı ile mi yoksa 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 indirgemesi 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 1.3'te gösterilmiştir (alt hat). SR ve MR sırası ile çözünür ve membrana bağımlı redüktazları temsil etmektedir (Cheung ve Gu, 2007).

Bu güne kadar Cr (VI) indirgeme mekanizması çalışmaları *Vibrio fischeri* (Fulladosa ve diğ., 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 diğ., 1990) gibi bir çok tür üzerinde yapılmıştır. Ancak kromun ara ürün formları *Shewanella oneidensis* (Daulton ve diğ., 2007; Neal ve diğ., 2002) ve *Pseudomonas ambigua* G-1 (Suzuki ve diğ., 1992) gibi birkaç bakteriyel suшта incelenmiştir (Codd ve diğ., 2006).

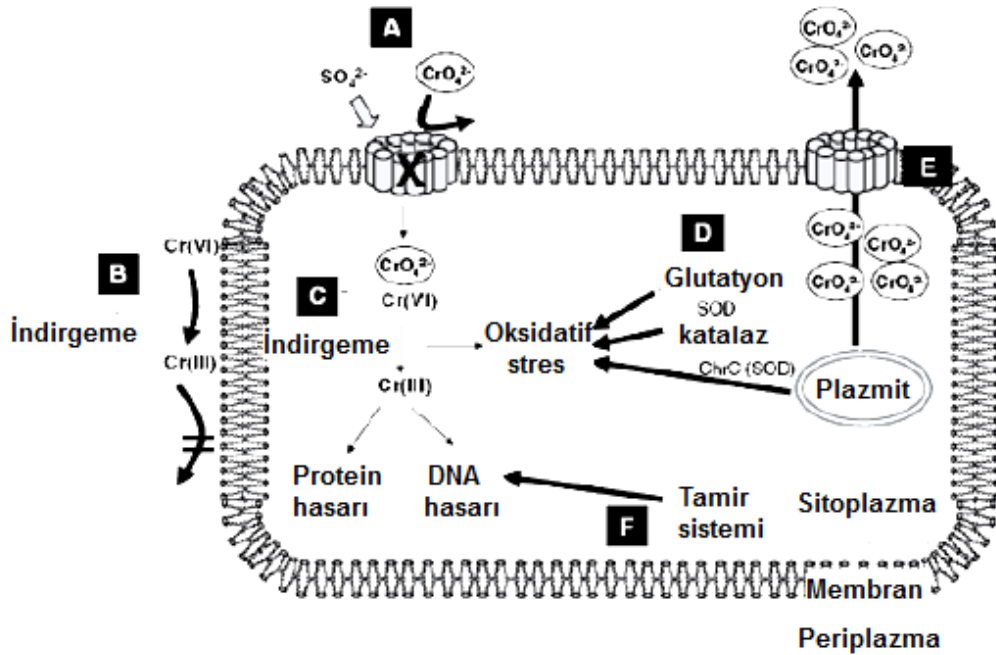
1.6. Cr (VI) Dirençlilik Mekanizması

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 diğ., 2006; Hu ve diğ., 2005, Thompson ve diğ., 2007),
- Katalaz, süperoksit dismutaz gibi Reaktif Oksijen Türlerini temizlemek için kullanılan enzimleri aktive ederek oksidatif strese bağlı kromatla mücadele (Ackerley ve diğ., 2006),
- RecA, RecG, RuvAB gibi SOS yanıtı enzimlerinin DNA hasar tamiri için üretimi (Hu ve diğ., 2005; Llagostera ve diğ., 1986; Miranda ve diğ., 2005),

- Fenton reaksiyonu ile yüksek oranda reaktif hidroksil radikallerin üretimini engellemek için ayrı tutmaya hizmet eden demir alımının regülasyonu (Brown ve diğ., 2006)
- Cr (VI) 'nın, hücre yüzeyinde lipopolisakkarit ligantların fonksiyonel grupları ile reaksiyon veren Cr (III)'e hücre dışı indirgenmesi (Flemming ve diğ., 1990; McLean ve diğ., 1990; Snyder ve diğ., 1978).

Bazı durumlarda Cr (VI) dirençliliği sülfat alım mekik sistemi gibi alım mekanizmalarının regülasyonu ile ilişkilidir. Kromatın yapısal olarak sülfata olan benzerliğinden dolayı, kromat bazı türlerde sülfat transport sistemini kullanarak hücreden geçer. Membrani geçtikten sonra çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan aktivitelerle, mutajeniteyi artıran DNA transkripsiyonu ile sonuçlanmasına aracılık eden Cr (III)'e indirgenir (Cervantes ve diğ., 2001). Ek olarak, Cr (III) karboksil ve tiyol grupları ile reaksiyona girerek enzimlerin yapı ve aktivitelerini değiştirebilir ve çeşitli toksik etkilerini sitoplazmada sergileyebilir (Cervantes ve diğ., 2001). Hasar ve direnç mekanizmaları Şekil 1.4'te gösterilmiştir.



Şekil 1.4: Bakterilerde Cr (VI) dirençlilik mekanizması (Ramírez-Díaz ve diğ., 2008).

Kromatın hücreyi geçmesi için kullanılan kromozom kodlu sülfat alım yolağı 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 kromatin toksik etkilerini minimize eden oksidatif strese karşı korumaya katılırlar (D). Plazmid kodlu transportırlar kromatı sitoplazmadan sızdırabilirler(E). DNA tamir sistemleri krom türevlerince oluşturulan hasarlara karşı korumaya katılır (F) (Ramírez-Díaz ve diğ., 2008).

Çeşitli kromat dirençli bakteriyel izolatlar çalışıldığında Cr (VI) dirençlilik mekanizmasının kromozomal genler veya plazmidlerle kodlanabildiği belirtilmiştir (Cervantes ve Campos-García 2007). Genellikle plazmidler tarafından yerleşmiş olan genler kromat iyonunun direkt olarak stoplazmadan dışarı akmasına aracılık eden membran tranportırlarını 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 hücresel hedeflere metal hassasiyetini azaltmak için çeşitli stratejiler kullanabilirler:

- metal hassasiyetini azaltmak için mutasyonlar,
- hasarlı hücre bileşenlerinin üretimini 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 toleransının bu bölge dışında karşılaştırılanlarda daha fazla olduğu bulunmuştur (Losi ve Frankenberger, 1994). Plazmid ilişkili bakteriyel dirençlilik *Streptococcus lactis* (Efstathiou 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 süşun Cr (VI) direnç yeteneği kazanmasıyla sonuçlanan saflaştırılmış plazmid DNA ile yapılan plazmidsiz süşun transformasyonunu göstermiştir(Bopp ve diğ., 1983)

1.7. Cr (VI) İndirgeyen Bakteriler

Tablo 1.3: Bilinen krom(VI) indirgeyen bakteriler (Molakwane 2010)

Tür isimleri	İzolasyon Şartları	Referanslar
<i>Achromobacter sp.</i> StrainCh1	Anaerobik	Zhu ve diğ., 2008
<i>Agrobacterium radiobacter</i> EPS-916	Aerobik-Anaerobik	Llovera ve diğ., 1993
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Aerobik	Nies ve Silver, 1989
<i>Bacillus megaterium</i> TKW3	Aerobik	Cheung ve diğ., 2006
<i>Bacillus sp.</i>	Aerobik	Chirwa ve Wang, 1997
<i>Bacillus sp.</i> ES 29	Aerobik	Camargo ve diğ., 2003b
<i>Bacillus subtilis</i>	Anaerobik	Carlos ve diğ., 1998
<i>Bacillus drentesis</i>	Aerobik	Molakwane ve Chirwa, 2009
<i>Bacillus mycoides</i>	Aerobik	Molakwane ve Chirwa, 2009
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Aerobik	Molakwane ve Chirwa, 2009
<i>Deinococcus radiodurans</i> R1	Anaerobik	Frederickson ve diğ., 2000
<i>Enterobacter cloacae</i> Strain HO1	Anaerobik	Wang ve diğ., 1989(a)
<i>Enterobacter sp.</i>	Aerobik	Molakwane ve Chirwa, 2009
<i>Escherichia coli</i> ATCC 33456	Aerobik-Anaerobik	Shen ve Wang, 1994b
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	Aerobik	Molakwane ve Chirwa, 2009
<i>Ochrobactrum sp.</i>	Aerobik	Zhiguo ve diğ., 2009
<i>Pantoea agglomerans</i> SPI	Anaerobik	Francis ve diğ., 2000
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Aerobik-Anaerobik	Bopp ve diğ., 1983, Ohtake ve diğ., 1987
<i>Pseudomonas fluorescens</i> LB300	Aerobik	Bopp ve Ehrlich, 1988
<i>Pseudomonas putida</i> MK1	Anaerobik	Park ve diğ., 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 diğ., 2004
<i>Providencia sp</i>	Aerobik-Anaerobik	Thacker ve diğ., 2006
<i>Shewanella alga</i> (BRYMT) ATCC 55627	Aerobik-Anaerobik	Guha ve diğ., 2001
<i>Shewanella putrefaciens</i> MR-1	Anaerobik	Myers ve diğ., 2000

Romanenko ve Koron'Kev (1977)'in çalışmasından sonra bazı araştırmacılar çeşitli şartlar altında Cr (VI) indirgemelerini katalize eden yeni mikroorganizmalar izole ettiler (Ackerley ve diğ., 2004; Ramírez- Ramírez ve diğ., 2004; Ganguli ve Tripathi, 2002; Chirwa ve Wang, 1997; Suziki ve diğ., 1992; Baldi ve diğ., 1990; Ohtake ve diğ., 1990;). Bilinen Cr (VI) indirgeme bakterileri Tablo 1.3'de verilmiştir.

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 mikroorganizmalarda 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. Son zamanlarda terminal elektron akseptörü olarak Cr (VI) 'yı kullanma yeteneği sülfat indirgeyen bir bakteri grubunda ve *Pantoea agglumers*'da gösterilmiştir (Francis ve diğ., 2000; Tebo ve Obratsova, 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 zincirinde bir terminal elektron akseptörü olarak işlev görür (Lovley ve Phillips, 1994; Ishibashi ve diğ., 1990; Horitsu ve diğ., 1987). Katabolik ya da solunumla ilgili proseste elektronlar NADH elektron donöründen Cr (VI)'ya aktarılır (Chirwa ve Wang, 1997; Suziki ve Fukuda, 1990).

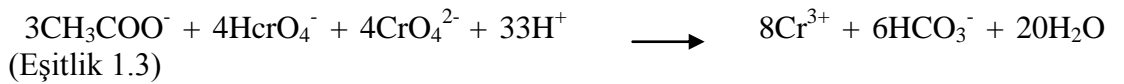
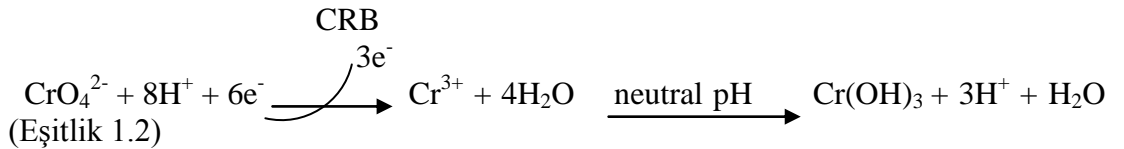
Cr (VI) indirgemesinin katabolik doğası daha evvel Wang ve diğ., (1990) tarafından yapılan indirgenmiş kromun ağırlıklı olarak besi yerinde bulunduğu ve *Enterobacter cloacae* HO1'in parçalanmış hücrelerinde sadece % 30'dan daha azının serbest bırakıldığı tüm hücre ve parçalanmış hücre deneylerinde gösterilmiştir.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

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 ve İndirek Cr (VI) indirgemesi

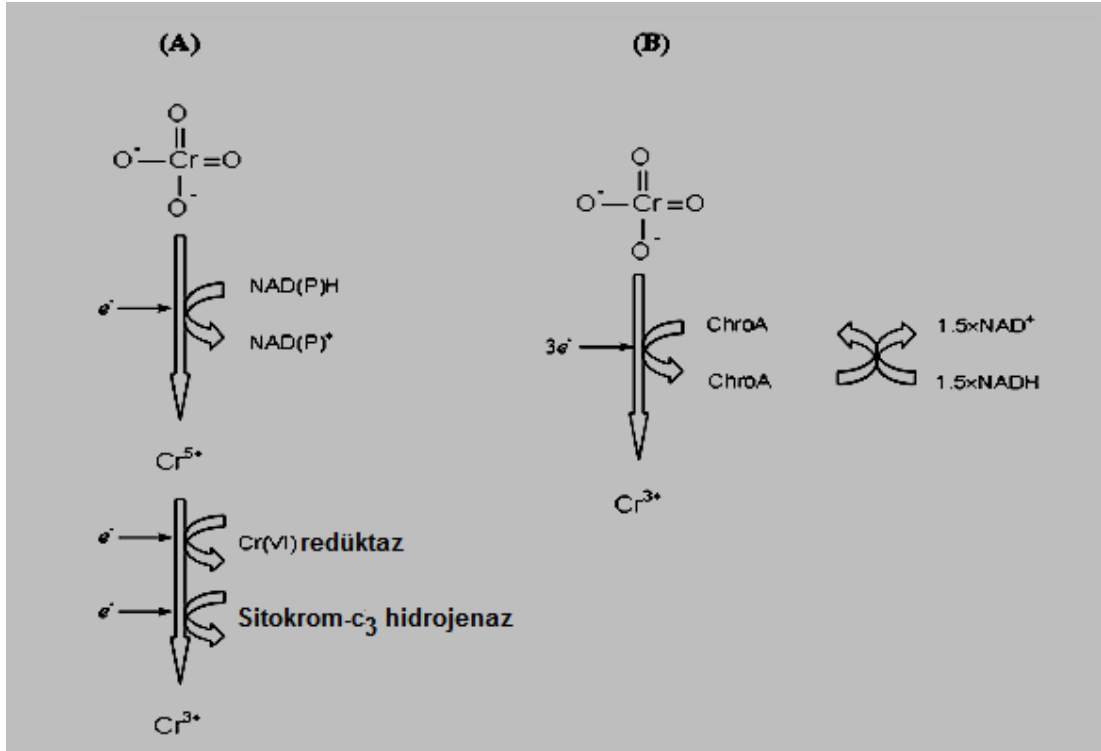
Shen ve Wang tarafından yürütülen çalışmalar (Shen ve Wang, 1993) *E. coli*'de çözünür kromat redüktaz varlığını öne sürdü. Başka bir grup gram negatif bakteride, *Pseudomonas sp* CRB5'de Cr (VI) indirgemesine stoplazmada yerleşmiş çözünür bir enzimle aracılık ettiği bulundu (McClellan ve Beveridge, 2001). Gram negatif bakterilere ek olarak çözünür enzim redüktazlar ayrıca gram pozitif bakterilerde de gözlemlendi. *Bacillus coagulans*'da çözünür enzimle kromat indirgemesi için elektron donörü olarak NADH tercih edilmektedir (Philip ve diğ., 1998).

Direk enzimatik indirgemedede 1 mol okside NADH başına iki elektron transfer edilir. *Pseudomonas fluorescens* LB300'de, ChroA redüktaz enzimi 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 1.2 ve 1.3'te gösterildiği gibi krom hidroksit($\text{Cr}(\text{OH})_3$) olarak çökmesini kolaylaştırır (Zakaria ve diğ., 2007; Brock ve Madigan, 1991).



Eşitlik 1.2 Cr (VI) indirgeyen bakterilerce katalizlenen jenerik bir Cr (VI) indirgeme reaksiyonunu gösterirken, Eşitlik 1.3 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 1.5'te gösterilmiştir, bunlardan ilki Cr (VI)'nın Cr (III)'e direk olarak çözünür 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 diğ., 1990). İlk yolak yaygın biçimde *Bacillus*'da gözlemlenmişken, ikincisi *Pseudomonas* türlerinde gözlemlenmiştir.



Şekil 1.5: Cr (VI) indirgeme yolları: (A) NAD(P)H oksidasyonu ile kolaylaştırılmış geçici ürün Cr(V) aracılığıyla adım adım indirgeme (Suzuki ve diğ., 1990) ve (B) NADH oksidasyonu ile kolaylaştırılmış çözünür redüktaz Chro A ile direk indirgeme (Chirwa, 2001).

Cr (VI) indirgemesi diğer türlerde, spesifik olmayıp sitokromların 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 türünün büyümek için hidrojen ya da organik asitlerin oksidasyonunda çiftleşmiş Cr (VI) indirgemesinden korunan enerji ile solunum elektron akseptörü gibi Cr (VI) 'yı kullanarak enerji elde ettiği gösterilmiştir (Francis ve diğ., 2000; Tebo ve Obratsova, 1998). Bu gözlemler glukoz, pepton, ve biyolojik Cr (VI) indirgemesini başarmak için her zaman gerekmeyen triptoz gibi yüksek oranda bozunabilir substratların varlığını gösterir. Daha uzun süreli olan 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 diğ., 2000; Oh ve Choi, 1997; Clark, 1994; Yamoto ve diğ., 1993; Suziki ve diğ., 1992). Krom indirgeyen bakteriler Cr (VI) 'yı ya çözünür ya da membrana bağlı enzim sistemleriyle indirgeyebilirler. Membran ilişkili kromat redüktaz aktivitesi ilk kez hücre yüzeyinde gözlenen çözünmeyen formdaki indirgenmiş kromat çökeltilerinde yer alan *Enterobacter cloacae* HO1'de çalışılmıştır. Elektron donörü olarak fenazin metosülfat (PMS) indirgeyen askorbat varlığında *Enterobacter cloacae* HO1'in dış membran keseciklerinin sağ tarafında yüksek kromat indirgemesi gözlenmiştir (Wang ve diğ., 1989b). NADH'tan kromata elektron transfer eden membran ilişkili esas enzim Bopp ve diğ., (1983) tarafından açığa çıkarılmıştır. *Shewanella putrefaciens* MR-1 kromat redüktaz aktivitesi anaerobik olarak büyüyen hücrelerin stoplazmik membranı ile ilişkilendirildi (Myers ve diğ., 2000). Format ve NADH, kromaz redüktaz için elektron donörü olarak hizmet etmiştir. Elektron donörü olarak NADPH ve L-Laktat sağlandığında aktivite olmadığı gözlenmiştir. Ancak bunun için, *Shewanella putrefaciens*'in aksine *Pseudomonas putida*'da NADPH bir elektron donörüdür (Park ve diğ., 2000).

1.8.2.1. Aerobik redüktazlar

Daha önce *Pseudomonas* 'lardan Cr (VI) redüktaz saflaştırmasının yapıldığı çeşitli çalışmalar rapor edilmiştir. Ishibashi ve diğ., (1990) *P. putida* PRS 2000'den çözünür bir Cr (VI) redüktazı kısmen saflaştırdı. Suzuki ve diğ., (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'nin Cr (VI) indirgeme aktivitelerine sahip olan nitroredüktazına %58 oranında yüksek bir nükleotit sekans homolojisi sergilediği bulunmuştur (Kwak ve diğ., 2003). Park ve diğ., (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 diğ., 2002). Ackerley ve diğ., (2004)

ChrR'yi optimum olarak 70°C'de Cr (VI) indirgemesini katalizleyen dimerik bir flavoprotein olarak tanımladılar. Açık okuma çerçevesinde *E. coli* kromozomunda bir fonksiyonla görevlendirilmemiş yieF geninin, 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 diğ., 2002). Son zamanlarda bir membran ilişkili Cr (VI) redüktaz da iki boyutlu jel elektroforezinde saptanan *B. megaterium* TKW3'ün proteomundan tanımlanmıştır (Cheung ve diğ., 2006).

1.8.2.2. Anaerobik redüktazlar

Anaerobik koşullar altında Cr (VI) indirgeme sürecine aracılık eden hem çözünür 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). Sitokrom b ve sitokrom c gibi sitokrom 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 diğ., 1996).

1.8.2.3. Krom varlığında kromat redüktazların indüklenmesi

SDS-PAGE kullanılarak yapılmış ve kromat redüktazın moleküler ağırlığı hakkında bize fikir verebilecek birkaç çalışma mevcuttur. Park ve diğ., 2000 yılında yapmış oldukları çalışmada *Pseudomonas putida* MK1'den saflaştırdıkları kromat redüktazın moleküler ağırlığının yaklaşık 20 kDa olduğunu belirlemişlerdir. Suzuki ve diğ. (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 diğ., 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 (Zahoor ve Rehman, 2009). Abskharon ve diğ., (2009) 'nin *Escherichia coli* ASU 7 ile yaptıkları bir çalışmada, 0, 1, 5, 10, 20 ve 30 ppm krom konsantrasyonlarında ürettikleri

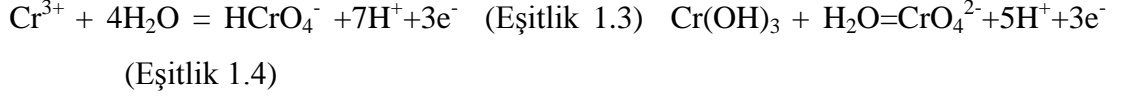
hücrelerin %12'lik SDS-PAGE protein profili analizlerine göre, krom stresi altında bazı protein setlerinin indüklendiğini ifade ederek 77, 48, 15 ve 13 kDa'luk protein bantlarını tanımlamışlar ve sonuçlarının Thacker ve Madamwar (2005)'in sonuçlarına benzer olduğunu rapor etmişlerdir. Diğer yandan *Orchrobactrum anthropi* CTS-325 suşu ile yapılan başka bir çalışmada ise 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0,0625 mmol/L krom konsantrasyonlarında ve krom içermeyen ortamda üretilen hücreler kromatla indüklendiklerinde yaklaşık olarak 23 kDa özdeş alt ünitelere sahip bir dimer olarak oluşan bir proteinin miktarında krom konsantrasyonuna bağlı olarak artış olduğu rapor edilmiştir (Cheng ve diğ., 2009).

Jel elektroforezinin yanı sıra kromat bağlayan proteinleri nükleer manyetik rezonans (NMR) ve kütle spektrofotometrisi (MS) gibi yöntemlerle de gösterebiliriz. Bu bağlamda biyolojik olarak kromun aktif formu için aday ve sadece doğal olarak memelilerde meydana geldiği bilinen düşük molekül ağırlıklı krom bağlayan maddeler (LMWCr), moleküler bir düzeyde veri ve yapı sağlamak adına spektroskopik çalışma ile yeterli verimlilikte ilk kez izole edilmiştir. Paramanyetik ¹H MMR, elektron paramanyetik rezonans ve elektronik spektroskopik çalışmaların sonucunda, alternatif bir olasılık olan iki dinükleer düzeneğin dışlanamamasına rağmen, muhtemelen tetranükleer düzenekteki tamsayı dönüşünde polipeptit başına dört kromik iyonun düzenlendiğini gösterdi. Bu düzen ya da düzenekler aniyonik ligandlarla köprü oluşturur ve polipeptitlerce sağlanan karboksilatlarla desteklenir (Davis ve Vincent 1997). Peterson ve diğ., (2008) tarafından yapılan çok ilginç bir çalışmada Cr (VI)'ya maruz kalan inek karaciğer homojenatından izole edilen trivalent krom içeren yeni bir protein rapor edilmiştir. Bu proteinin ağırlığı hem jel elektroforeziyle hem de kütle spektrofotometrisi ile 15,6 kDa olarak tanımlanmıştır. Ayrıca protein molekül başına 2.5 Cr (III) iyonu bağlamaktadır. Bu ve bunun gibi yapılmış ve yapılacak çalışmalar kromat redüktazları daha yakından tanımak ve anlamak için rehber niteliğindedir.

1.9. Mikrobiyal Krom İndirgemisini Etkileyen Faktörler

Kromun yeraltı sistemlerinde mobilitesi, biyoyararlılığı ve toksisitesi bir çok fiziksel faktöre bağlıdır. Bunların arasında oksidasyon basamağı (değerliği), toprak yüzeyine adsorpsiyon, iyon değiştirme reaksiyonları, organik ve inorganik ligandlarla şelatlaşma ve redoks reaksiyonları başta gelmektedir. Doğada krom genelde Cr (III)

ve Cr (VI) oksidasyon basamaklarında bulunur ve redoks koşullarına (pE) ve pH'a bağlı olarak Cr^{3+} suda, CrOH^{2+} , Cr(OH)_2^+ ve Cr(OH)_3 iyonları halinde ve Cr (VI) ise HCrO_4^- ve CrO_4^{2-} formlarında bulunabilir. Tablo 1.4'de Cr (III) iyonları ile oluşum denge sabitleri verilmiştir. Cr (III) ile Cr (VI) arasındaki redoks reaksiyonları ise aşağıdaki şekilde ifade edilebilir (Powell ve diğ., 1995):



Tablo 1.4: Sulu ortamlarda pH'a bağlı Cr (III) bileşikleri (Rai ve diğ., 1987)

Reaksiyon	log K(I = 0)
$\text{Cr}^{3+} + \text{H}_2\text{O} = \text{Cr(OH)}^{2+} + \text{H}^+$	-3.57
$\text{Cr}^{3+} + 2\text{H}_2\text{O} = \text{Cr(OH)}_2^+ + 2\text{H}^+$	-9.84
$\text{Cr}^{3+} + 3\text{H}_2\text{O} = \text{Cr(OH)}_3 + 3\text{H}^+$	-16.19
$\text{Cr}^{3+} + 4\text{H}_2\text{O} = \text{Cr(OH)}_4^- + 4\text{H}^+$	-27.65
$2\text{Cr}^{3+} + 2\text{H}_2\text{O} = \text{Cr}_2(\text{OH})_2^{4+} + 2\text{H}^+$	-5.0
$3\text{Cr}^{3+} + 4\text{H}_2\text{O} = \text{Cr}_3(\text{OH})_4^{5+} + 4\text{H}^+$	-10.75

1.9.1. Hücre yoğunluğu

Cr (VI) indirgeme oranının hem aerobik hem de anaerobik şartlarda hücre yoğunluğundan etkilendiği gösterilmiştir. Wang ve diğ., (1989a) anaerobik şartlarda hücre yoğunluğu artışıyla Cr (VI) indirgeme oranında artışı tespit etmişlerdir. Benzer gözlemler hem aerobik hem de anaerobik şartlarda *E. coli* kültürlerinde yapılmıştır. Ancak Cr (VI) indirgeme oranı hücre yoğunluğu artışı ile orantılı değildi ve spesifik Cr (VI) indirgeme oranının 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 gözlenmiştir (Fujie ve diğ., 1990; Komori ve diğ., 1989). Üreyen kültüre Cr (VI) eklenmesiyle hücre canlılığında azalma olmasına rağmen, bazı *Enterobacter cloacae* (Wang ve diğ., 1989b), *E. coli* (Shen ve Wang, 1994b), *P. fluorescens* ve *Bacillus* sp. (Wang ve Xiao, 1995)

kültürlerinde başlangıç Cr (VI) oranının artmasıyla başlangıç Cr (VI) indirgeme oranı artmıştır. Benzer olarak, spesifik başlangıç Cr (VI) indirgeme oranı *E. coli* kültürlerinde de Cr (VI) konsantrasyonlarının yükselmesi ile artmıştır. Ancak Cr (VI) indirgemesi için gerekli zamanın artışı da ayrıca gözlenmiştir (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 suşlarında olduğu gibi baskılar (Badar ve diğ., 2000; Wang ve Shen, 1995; Shen ve Wang, 1994b; Llovera ve diğ., 1993; Shen ve Wang 1993; Komori ve diğ., 1989). Mikrobiyal Cr (VI) indirgemesi *Enterobacter cloacae* HO1'de olduğu gibi hücre büyümesi gözlenmesine rağmen aerobik şartlar altında tamamen inhibe edilir (Fujie ve diğ., 1990). Zenginleştirme mikroorganizmaları ile yapılan çalışmalar, % 84 indirgeme gözlenen anaerobik şartlar ile karşılaştırıldığında aerobik şartlarda sadece % 41 indirgeme göstermiştir (Marsh ve diğ., 2000). Marsh ve diğ. (2000) oksijen ve nitrat indirgemeyi inhibe ettiğinden dolayı Cr (VI) indirgemesi için daha düşük indirgeme şartlarının gerekli olduğu sonucuna varmışlardır.

Sülfat ve nitrat gibi doğal olarak oluşan elektron akseptörlerinin Cr (VI) indirgemesi üzerine sırası ile 10 mM ve 16 mM konsantrasyonlarda çok az etkileri vardır. *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 olarak bulunmuştur. 50 mM'a kadar yüksek sülfat konsantrasyonu *Desulfovibrio vulgaris*'de Cr (VI) indirgemelerini 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 diğ.(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 şartlarının güçlü olarak indirgeme sürecinde büyüme ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. 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 22-50 °C aralığında optimum pH'nın 6.8 olduğunu göstermiştir (Marsh ve diğ., 2000).

1.9.5. Elektron donörleri olarak organik moleküllerin etkisi

Organik maddeler elektron vericisi görevi yapıp Cr (VI) bileşiklerini Cr (III) bileşiklerine dönüştürmektedir (Gu ve Chen, 2003; Wittbrodt ve Palmer, 1996, 1995; Losi ve diğ., 1994). 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 metallerin konsantrasyonuna bağlıdır (He ve diğ. 2004; Zayed ve Terry, 2003; Wittbrodt ve Palmer 1995; 1996; Rai ve diğ., 1987; Adriano, 1986).

Elektron donörleri ve Cr (VI) indirgeme oranı arasındaki ilişkileri kurmak ve denemek için çalışmalar yapılmıştır. Marsh ve diğ., (2000)'nın topraklarla yaptıkları zenginleştirme çalışmaları Cr (VI) indirgemesi için hidrojenin etkili bir elektron donörü olduğu gösterilmiştir. 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).

Krom-organik molekül interaksiyonlarını izah edebilmek için birkaç mekanizma ileri sürülmüştür. Wittbrodt ve Palmer (1995) ve Uyguner ve Bekbolet (2003), 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 diğ. (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 çözülmüş 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 diğ., 2005).

Sitrik asit gibi organik asitlerin ya krom kolloidlerini yeniden mobilize ettiği ya da krom çözünürlüğünü artırıp toprakta taşınımını hızlandırdığı bilinmektedir (Johnson ve diğ., 2001; Bartlett ve Kimble, 1976). Bazı araştırmacılar tarafından elde edilen bulgulara göre de Cr (III)'ün değişik organik asitler ile kompleks oluşturmasıyla bitkiler tarafından alımının hızlandığı belirlenmiştir (Srivastava ve diğ., 1999). Uyguner ve Bekbolet (2003) tarafından yapılan bir çalışmada humik asitin Cr (VI) 'nın TiO_2 adsorpsiyonunu azalttığı gözlemlenmiştir. Mayes ve diğ. (2000)'na göre, bol miktarda organik madde ihtiva eden bir toprak kolonunda Cr (VI) 'nın 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.

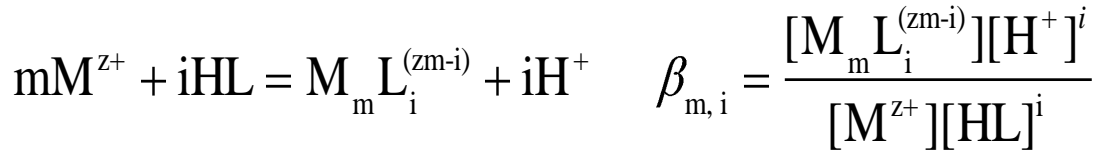
Doğal organik maddelerin elektron vericisi görevi yaparak Cr (VI) bileşiklerini Cr (III) bileşiklerine dönüştürebildikleri (Wittbrodt ve Palmer, 1995; Gu ve Chen, 2003; Xu ve diğ., 2004; Park ve diğ., 2004) son yıllarda yapılan bazı çalışmalarla desteklenmiş ve kromun bakteriler tarafından indirgenmesinde doğal organik asitlerin yardımcı bir rol oynadığı da belirlenmiştir (Gu ve Chen, 2003; Tokunaga ve diğ., 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).

1.9.5.1. Cr-Organik Molekül Kompleksleşmesi

Cr yeraltı sistemlerinde mevcut humik asit, fulvik asit gibi doğal organik asitler ile sitrik asit, aljinik asit gibi mikrobiyal yollarla oluşan ligandlarla kuvvetli bileşikler

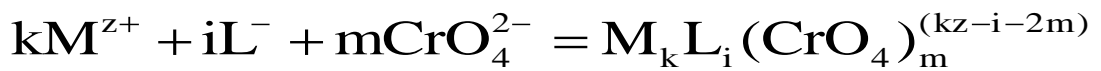
olusturmaktadır (Dubbin 2004). Köleli (2004), Mersin ilinde mevcut değişik tarım arazilerinden alınan toprak numunelerinde, toprak kromunun % 8'nin organik maddeler tarafından tutulduğunu kanıtlamıştır. Bu bağlamda krom-organik molekül interaksiyonlarını izah edebilmek için bir kaç mekanizma ortaya atılmıştır. Uyguner ve Bekbolet (2003) ve Wittbrodt ve Palmer (1995), Cr-organik ligand bileşiklerini ester oluşumu veya Cr (VI)'nın Cr (III)'e indirgenmesi ile gerçekleştiğini ifade etmelerinin ötesinde, metaller ile organik ligandlar arasındaki kompleksleşme reaksiyonu doğal organik asitlerde bulunan karboksil ve fenol gurupları ile serbest metal iyonun oluşturduğu bir iyon değişimi prosesi olarak tanımlanmaktadır:

Burada M yuku z+ olan bir metal iyonunu; HL protonlu organik ligandı ve $M_m L_i^{(zm-i)}$ ise reaksiyon sonucu oluşan metal-ligand kompleksini ifade etmektedir.



(Eşitlik 1.5)

Bir değişik mekanizmaya göre ise kompleksleşme reaksiyonları ortamda mevcut bir kationun köprü görevi görerek negatif yüklü iki ayrı ligandı bir arada tutmasıdır. Bu işlem sonucunda karışık iki ligandlı bir kompleks oluşur (Glaus ve diğ., 1995; Aas ve diğ., 1998):



(Eşitlik 1.6)

kararlılık sabiti, $\beta_{k,i,m}$

$$\beta_{k,i,m} = \frac{[M_k L_i (CrO_4)_m^{(kz-i-2m)}]}{[M^{z+}][L^-]^i [CrO_4^{2-}]^m}$$

(Eşitlik 1.7)

Burada M^{z+} kasyonu, L protonunu kaybetmiş organik ligandı ve $M_k L_i (CrO_4)_m^{(kz-i-2m)}$ ise karışık iki ligandlı kompleksi ifade eder. Literatürde karışık iki metalli veya ligandlı komplekslerin oluşum mekanizmaları hakkında fazla bilgi bulunmamaktadır.

Bazı araştırmacılar bu tip bileşiklerin metallerin yeraltı suyunda mobilitesine ve biyoyarayışlılığına etkisini araştırmıştır (Glau ve diğ., 1995; Kantar, 2001; Kantar ve diğ., 2005). Bazı alışmalar doğal organik asitlerin metal içeriğinin artması ile arsenatın organik molekülleri ile kompleks oluşturma kabiliyetinin arttığını göstermektedir (Redman ve diğ., 2002). Literatürde bu tip bileşiklerin oluşumu hakkında fazla bilgi bulunmadığından özellikle kromatlı-organik bileşiklerin kromun yeraltı suyunda taşınımını ve biyoyarayışlılığını nasıl etkileyeceği tam olarak bilinmemektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar ekzopolisakkaridlerin (EPS) metaller ile çok kuvvetli bileşikler oluşturdđunu ortaya çıkarmıştır (Salehizadeh ve Shajaosadati, 2003; Guibaud ve diğ., 2004; Kantar ve Honeyman, 2006). EPS bakteri hücre çeperi içerisinde ve dışında bulunan, bazı bakterilerin değişen ortam kosullarına uyum sağlamak için ortama yaydıkları ve molekül ağırlığı bir kaç binden bir kaç milyon daltona ulaşan organik moleküllerdir. Molekül ağırlığı ve içeriği ortam koşullarına bağlı olarak farklılık göstermektedir (Laspidou ve Rittmann, 2002). Ortamda mikrobiyal respirasyon ile CO₂ oluşumu, oluşan organik asitlerin etkisi ile ortam pH'sının değişmesi veya ortamdaki besin azalması gibi durumlar EPS oluşumunu tetikler (Sutherland, 1984; Laspidou ve Rittmann, 2002). Ayrıca biyofilm içerisinde hücre yoğunluğunun artması ile birlikte EPS'yi değrede edebilen enzimlerin oluşumu da EPS oluşumu için bir diğer mekanizma olarak görülmektedir (Davies, 1999). Örneğin, yüksek oksijen konsantrasyonlarında (% 70 hava doğunluğu) *Pseudomonas aeruginosa* biyofilmleri aljinik asit gibi yüksek molekül ağırlıklı organik polimerler üretmektedir (Sabra ve diğ., 2001).

Bir çalışmada glukoz ile beslenen bir anaerobik kemostat içerisine eklenen yüksek krom dozajına karşı uyum sağlamak için kemostat içerisinde bulunan bakteriler tarafından ortama EPS ve çözünebilir organik rnler (SMP) yayıldığı saptanmıştır (Aquino ve Stuckey, 2004). Polisakkaridler EPS'nin temel yapısını oluşturunca proteinler, nükleik asit ve lipid gibi moleküller EPS'nin diğer yapı taşları olarak görülmektedir. Proteinler içerisinde bol miktarda negatif yüklü amino asitler bulunmaktadır (Costerton ve diğ., 1978). Hung ve diğ. (2005) tarafından *Pseudomonas fluorescens* Biovar II kültüründen izole edilen EPS molekülleri üzerine yapılan çalışmaya göre uronik asitin EPS'de bulunan toplam karbohidratların % 70'ini oluşturdđu ve ayrıca EPS içerisinde asidik ve ntrl şeker guruplarına

(örnek: glukoz, fukoz, galaktoz) ilaveten % 2 oranında protein bulunduğu saptanmıştır. Metallerin EPS ile bileşik oluşturmasının en önemli nedeni EPS içerisinde bulunan ve genelde negatif yüklü karboksil, amino ve fosfat gibi reaktif fonksiyonel grupların bulunmasıdır (Wingender ve diğ., 1999; Kantar ve Honeyman, 2006). Özellikle, karboksil gruplar asidik EPS fonksiyonel gruplarının temelini oluşturmakta ve metallerle bileşik oluşturmada büyük rol üstlenmektedir (Hung ve diğ., 2005).

Puzon ve diğ. (2005) tarafından yapılan bir çalışmaya göre mikrobiyal prosesler sonucu ortaya çıkan organik moleküllerin Cr (III) ile kompleks oluşturarak Cr (III)'u çözülmüş iyonlar halinde suda tuttuğu görülmektedir. Alkalin koşullarda ve organik asitlerin bulunmadığı yeraltı sistemlerinde Cr (III) ya toprak yüzeyine adsorbe olmakta yada suda hidrolize olarak $Cr(OH)_x$ 'e dönüşmektedir. Yüksek pH değerlerinde $Cr(OH)_x$ (k) ve $Fe_xCr_{1-x}(OH)_3$ (k) gibi çözünürlüğü son derece düşük bileşiklerin oluşması kromun yeraltısuyunda mobilitesini azaltmaktadır (Mayes ve diğ., 2000; Kent ve diğ., 1994; Wittbrodt and Palmer, 1996; Rai ve diğ., 1987). Puzon ve diğ. (2005)'e göre mikrobiyal prosesler sonucu suda çözülmüş Cr-ligand bileşikleri olduğu gibi suda çözünürlüğü düşük ve tanecik boyutu yüksek organik makromoleküller (6-15 kDa) ile Cr (III)'un interaksiyona girdiği görülmektedir. Kolloid büyüklüğündeki bu bileşiklerin kromun yeraltısuyunda taşınımına etkileri tam olarak belli değildir.

Genel olarak bakıldığında ortam koşullarına (örnek: pH) bağlı olarak organik bileşikler Cr (III, VI) bileşikleri ile reaksiyona girerek: 1) kromun mobilitesi artırmakta veya azaltmaktadır; 2) Cr (VI) bileşiklerini indirgeyerek Cr (III) bileşiklerine veya Cr (III) bileşiklerini oksidize ederek Cr (VI)'ya dönüştürmektedir; 3) mikrobiyal prosesler sonucu oluşan CO_2 , Cr (III) ile reaksiyona girerek $CrCO_x$ bileşikleri oluşmaktadır; 4) Cr-EPS bileşikleri toprak bakterileri tarafından degradasyona uğrayarak Cr kolloidleri oluşmaktadır ve 5) Cr bileşikleri biyofilm makromolekülleri içerisinde tutularak mobilitesi azaltılmaktadır.

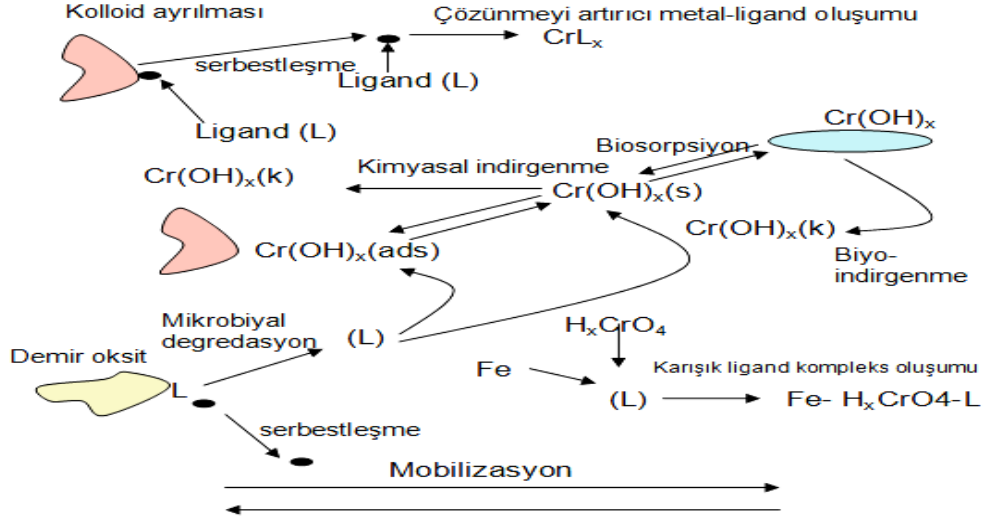
1.9.5.2. Yer altı sistemlerinde organik asitlerin etkisi altında Cr taşınımı

Doğal sistemlerde, organik asitler metallerle kompleks oluşturmak için önemli bir ligand kaynağı olarak ortaya çıkmaktadır. Doğal organik asitler, metallerin toprak

yüzeyine adsorpsiyonuna ve dolayısıyla yeraltısuyunda taşınımına bir kaç şekilde etki ederler. Bunlar;

- metallere bileşik oluşturarak (şelatlaşma) metallerin sudaki türlerini değiştirirler (Kantar ve diğ., 2005; Kantar ve Honeyman, 2006, 2005 a, b; Lenhart ve Honeyman, 1999). Ortam koşullarına bağlı olarak suda oluşan bu metal-organik ligand bileşikleri katı yüzeylerine çok az veya hiç adsorbe olmazlar. Yeraltı suyunda bu tip bileşiklerin oluşumu metallerin mobilitesini artırmaktadır.
- metallere karşı, toprak yüzeyinde sınırlı miktarda bulunan adsorpsiyon bölgelerine adsorbe olarak, metallerin adsorpsiyonunu azaltırlar (Boily ve Fein, 1996).
- toprak yüzeyine adsorbe olarak, toprakların yüzey özelliklerini (örnek: yüzey yükü) değiştirirler (Logue ve diğ., 2004).
- redoks reaksiyonlarında elektron vericisi veya alıcısı görevi üstlenip metalleri indirger veya yükseltgerler (Wittbrodt and Palmer, 1995).
- metal-organik ligand bileşiklerinin biyodegradasyonu ile yüzey aktif bileşiklerin oluşması (metal kolloidlerin oluşması) (Dodge ve Francis, 1997) kromun adsorpsiyonunu artırabilmektedir.

Yeraltı suyunda, toprakta ve atıklarda bulunan doğal organik moleküller ortam koşullarına bağlı olarak kromun biyoyararlılığını ve taşınımını etkileyebilmektedir (Puzon ve diğ., 2005; Dubbin, 2004; Kraemer ve diğ., 2002). Organik asitlerin genelde düşük pH'larda metal adsorpsiyonunu artırdığı ve alkaline koşullarda ise azalttığı gözlenmiştir (Kantar ve Honeyman, 2005b).



Şekil 1.6: Toprakta krom mobilizasyonuna/immobilizasyonuna etki eden faktörlerin ve proseslerin şematik gösterimi. ● işareti Cr kolloidini ve L ise organik ligandı temsil etmektedir (Doğan, M. ve diğ., 2011).

1.10. Biyosorpsiyon

1.10.1. 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 (Guiball ve diğ., 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 diğ.(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 yük 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 diğ. (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 diğ., 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 iyonlarının çözeltiye 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 diğ., 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 kullanıldıkları prosesin kontrolü daha kolay olacaktır. Ölü veya aktif olmayan biyolojik kütlenin 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 diğ., 1994).

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 diğ. (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 biyokütlenin metal giderim kapasitesini artırır ve biyosorpsiyon özelliğini değiştirir (Siegel ve diğ., 1990).

1.11. *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 pozitifler (Sneath, 1986; Collier ve diğ., 1998; Jamir ve diğ., 2004).

Pigmentasyon, *Pseudomonas* cinsinin genel bir karakteridir, ancak pigment oluşturmeyen türlere de sahiptir. Bazı türleri ayırt edici koloni morfolojisi gösterirler (Murray ve diğ., 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. Kemoorganotrofikler, fakat bazı türleri ototrofik şartlar altında da gelişebilir. Hiç bir türü fermentatif ve fotosentetik değildir (Collier ve diğ., 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 diğ.,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 piyosiyenin, 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 diğ., 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, biyoremediasyonda kullanım potansiyeline sahiptir (Essar ve diğ., 1990).

1.11.1. 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 diğ., 1973).

Yapılan çalışmalarda nehir suyundan *Pseudomonas spinosa*, distile sudan *Pseudomonas huttiensis*, *Pseudomonas cepacia* ve *Pseudomonas lanceolata* türleri izole edilmiştir (Carson ve diğ.,1973; Vachee ve diğ., 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 diğ., 1997). Sadhukhan ve diğ. (1997), balık solungacından ve midyesinden *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 nötrül veya alkali pH (7.0-8.5) aralığında daha iyi gelişmektedir (Cowan ve diğ., 1974).

1.11.2. Morfolojisi ve hücre yapısı

Pseudomonas suşlarının mikroskopik görünümleri nadiren büyük ve şekil olarak normalden çok farklı olabilir. Bazı türlerin hücreleri oval şekilli olabilirken bazı bitki patojenlerinin hücreleri 4 µm'den daha uzundur. 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 diğ., 1974).

1.11.3. 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 diğ., 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 sayısı 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 diğ., 1974).

1.11.4. Krom indirgeme ilişkileri

Literatürde pseudomonaslarla yapılmış olan bir çok krom indirgeme çalışması mevcuttur. Üremeleri için çok ekstrem şartlar gerektirmeyen ve kromla kontamine bölgelerden kolaylıkla izole edilebilen pseudomonaslar krom indirgeme çalışmaları için referans bakteriler arasındadır. Aravindhan ve diğ., (2006) bataklık arazilerden izole ettikleri *Pseudomonas* kültürleri ile yaptıkları krom indirgeme çalışmalarında sıcaklık, pH, krom konsantrasyonunun rolü, NADH, SO_4^{-2} ve polifenoller gibi katkı maddelerinin mikrobiyal Cr (VI) indirgeme oranına etkilerini incelemişlerdir. 300 mg/L krom konsantrasyonunda bile krom indirgeme muhtemel olup, indirgeme için 100 mg/L krom konsantrasyonu optimum değerdir ve bu *Pseudomonas* kültürleri 100 mg/L kromu 180 dakikada tamamen indirgemişlerdir. SO_4^{-2} ve polifenoller krom indirgemelerini inhibe ederken, NADH indirgemeyi pozitif yönde etkileyerek arttırmıştır.

Kroma olan toleransları türden türe, hatta suştan suşa bile değişirken, kromla kontamine olmuş bölgelerden izole edilen pseudomonaslar kroma toleransları bakımından yüksek değerlere sahip olabilirler. McLean ve Beveridge (2001) yaptıkları bir çalışmada kromatize-bakır-arsenat ile kontamine olmuş bir bölgeden izole ettikleri bir *Pseudomonas* türü (CRB5) ile krom indirgemelerini incelemişlerdir. CRB5 kromu bakır ve arsenat varlığında indirgeyerek, 520 mg/L kroma tolerans göstermiştir. Aerobik ve anaerobik şartlar altında kromu indirgeyen CRB5, ayrıca anerobik şartlar altında Co(III) ve U(VI)'yı da indirgemişlerdir. Araştırmacılar CRB5'in krom indirgemesine esas olarak stoplazmada yerleşen fakat hücre dışında da gözlenen çözünür bir enzimle aracılık ettiğini bulmuşlardır. Çözünür fraksiyonun redüktaz aktivitesi için K_m 23mg/L ve V_{max} 0,98 mg/saat/protein Cr'dur. Anerobik şartlarda membranla ilişkili kromat redüktazların etkili olabileceğini söyleyerek, bu

bakterinin hem aerobik hem de anaerobik şartlar altında krom indirgemesi, kromla ya da diğer toksik ağır metallere kontamine olmuş bölgelerde bioremediasyon için patlama yaratan bir detoksifiye stratejisine sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir. Diğer yandan *Pseudomonas fluorescens* LB300 suşu ile bir çalışma yapan Bopp ve diğ.,(1983) , ortaya ilginç bir sonuç koymuşlardır. Hudson nehrinin kromla kontamine olmuş üst sediment kısımlarından izole ettikleri bakterinin krom dirençliliğini plazmitle sağladığını belirtmişlerdir. Spontan segregasyon ya da mitomisin C kür ile plazmid alındığında (pLHB1), bakteri anında krom dirençlilik mekanizmasını yitirmiştir. pLHB1 plazmidi konjugasyon yoluyla *Escherichia coli* 'ye aktarıldığında, krom dirençliliğini hala bu bakteride sergilemeye devam etmiştir. *Pseudomonas putida* PRS2000 suşundan elde edilen cell-free süpernatant sıvıları ve hücre süspansiyonları ile yapılan krom indirgeme çalışmalarında ise kromat redüktaz aktivitesinin membran ilişkili olmayıp, çözünür bir proteinle sağlandığı ispatlanmıştır. Ham enzim aktivitesi ısı ile değişime uğrarken K_m 40 μM CrO_4^{-2} olarak hesaplanmıştır. Ayrıca gerek invitro gerekse bozulmamış hücrelerde, çalışmada kullanılan nitrat ve sülfat krom indirgemesine etki etmemiştir (Ishibashi ve diğ., 1990). Ayrıca Thompson ve diğ., (2010) *Pseudomonas putida*'nın önemli metabolik çok yönlülüğü, geniş biodegradatif fonksiyonları ve kontamine çevrelerdeki eşsiz bulunurluluğundan dolayı bioremediasyonda model bir organizma olarak nitelendirmişlerdir.

Rahman ve diğ., (2007) ev kanalizasyon suyundan izole ettikleri *Pseudomonas sp.* C-171 türünün 2000 ppm kadar Cr (VI)'ya tolerans gösterdiğini rapor etmişlerdir. Krom kaynağı olarak potasyum dikromat kullanan araştırmacılar, konsantrasyonu arttırdıkça bakterinin besiyerindeki büyüme oranının azaldığını göstermişlerdir. Maksimum büyüme oranını bakterilerin log fazında gözlemleyerek, krom indirgeme oranının inokülasyon miktarına bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca bakteri hücrelerinin etrafında krom hidroksit birikimine rastlamışlar ve hücrelerin hafif uzadıklarını göstermişlerdir.

Keyhan ve diğ.,(2003) de bir çalışmalarında bir çok bakteriyi krom indirgeme açısından test etmişlerdir. Bu bakterilerden bir tanesi de kromat bioremediasyonu için gelecek vadede *Pseudomonas putida* MK1'dir. Araştırmacılar ayrıca çevresel krom konsantrasyonları arttığı gibi, bu hücrelerde kütle birimi başına krom transformasyonunun da arttığını göstermişlerdir. Ancak bakteri büyümesi 0.8 mM

gibi bir krom konsantrasyonu ile inhibe olmuştur. Dahası hücre ekstraktları yavaş büyüme koşulları altında (besin taklidi- sınırlı alan şartları) kromat redüktaz aktivitesinin arttığını göstermelerine rağmen, bütün hücrelerin kromatı transforme etme yeteneklerinin büyük ölçüde azaldığını ifade etmişlerdir. Hem hücreler hem de hücreden ekstrakte edilen ChrR (*P. putida* kromat redüktazı) eşit derecede kromla kontamine olmuş bölgelerde inhibe olmuşlardır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Materyal örnekleri

Bu çalışmada Pamukkale Üniversitesi Bakterioloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonundan temin edilen bakteriler kullanılmıştır. Daha önce API identifikasyon kiti ve çeşitli biyokimyasal testlerle teşhis ve tanımlamaları yapılan bakterilerin isimleri, kodları ve izolasyon kaynakları Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1: Bakterilerin kodları ve izole edildiği kaynaklar

Suş kodu	Bakteri Adı	İzolasyon kaynağı
P1	<i>Pseudomonas</i> sp.	Aliğa Petrol Rafinerisi /İzmir Toprak
P8	<i>Chryseomonas luteola</i>	Aliğa Petrol Rafinerisi /İzmir Su
P14	<i>Pseudomonas</i> sp.	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
P44	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Zeytinyağı Fabrikası / Aydın Toprak
P46	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Zeytinyağı Fabrikası / Aydın Toprak
P52	<i>Pseudomonas</i> sp.	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™,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-Miller (LB)

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

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

Organik asitler(Merck)

- Galakturonik asit
- Glukuronik asit
- Aljinik asit
- Sitrik asit

Mac Farland Tüpleri

- X Çözeltisi % 1,175 BaCl₂ 2H₂O (w/v)
- Y Çözeltisi % 1 0,36 N H₂SO₄ (v/v)

X ve Y Çözeltileri Tablo 2.2' de belirtildiği oranlarda karıştırılarak No:1' den 10' a kadar Mac Farland tüpleri elde edilmiştir.

Tablo 2.2: Mac Farland Metoduna göre X ve Y çözeltilerinin karışım oranları

No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
X	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Y	9,9	9,8	9,7	9,6	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0

Potasyum Dikromat Çözeltisi (1000 ppm) ($K_2Cr_2O_7$) (Merck)

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

1000 mg/L Cr (VI) stok çözeltisi distile suda hazırlanarak 105 °C'de 15 dakika steril edilmiştir. Bunun için 100 ml distile suda 0,2829 g $K_2Cr_2O_7$ olacak şekilde tartım yapılmıştır. Çözeltinin pH değeri 6 N NaOH ile $7\pm 0,1$ 'ye ayarlanmıştır. Steril stok çözeltisi renkli şişede +4 °C'de buzdolabında maksimum 1 ay tutulmuştur. Arzu edilen Cr çözeltilerini içeren besiortamları hazırlamada, steril stok Cr (VI) kullanılmıştır.

Difenil-karbazid (DPC) (Merck)

- DPC 0,5 g
- Aseton 100 ml

Belirtilen miktarlarda difenil karbazit asetonda çözülür, +4 °C'de renkli şişelerde 1 hafta saklanır.

%10'luk Sülfirik asit Çözeltisi (H_2SO_4) (Merck)

%10'luk sülfirik asit çözeltisi hazırlamak için 5,7 ml H_2SO_4 alınır, 100 ml'ye tamamlanır. (Yoğunluğu: 1,84 g/cm³, yüzdesi: %95-97)

NaHCO₃ Tamponu

- NaHCO₃ 0,05 g
- Distile su 1000 ml

$5,86 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde NaHCO₃ tartılır ve 1000 ml distile su içerisinde çözülerek hazırlanır. +4 °C'de 1 ay saklanabilir.

NH₃-NH₄ Tamponu

- NH₃
- NH₄Cl

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.

Ayrırma 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 g
- Glisin 5,76 g
- SDS 1,0 g

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.

Yığıma Jelin Hazırlanışı

- Akrlamid/Bis Akrlamid (%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 aparatı iki cam arasına 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-Miller 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 gelişme sıcaklıklarının belirlenmesi

Bakterilerin optimum gelişme sıcaklıklarını belirlemek amacıyla TSB besi ortamlarında 25, 30, 37, 40, 42 °C'lerde inkübe edilmiş ve bakterilerin sıcaklık toleransları Mc-Farland metoduna göre belirlenmiştir.

2.2.4. Bakterilerin hegzavalent 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.

2.2.5. Bakterilerin krom indirgemesi

Yarı-kesikli Cr (VI) indirgeme çalışmalarında, *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 ve *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX-P22 suşları TSB besiyerinde 37 °C’de, son hacim 100 ml olacak şekilde hazırlanan krom içeren besiyerlerinde üretilerek bakterilerin krom indirgeme özellikleri belirlenmiştir. Sabit pH’da (7±0,2 ve 6±0,2) yapılan deneylerde indirgenme reaksiyonu ile birlikte pH’da meydana gelen değişimleri sabitlemek için NaHCO₃ tamponu (0,11 mM) kullanılmıştır.

2.2.6. 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 santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernetantların 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. R² değeri 0.99’un altındaki değerler kabul edilmemiştir.

2.2.7. pH’nın etkisi

Krom indirgemesine pH’nın etkisini belirlemek için, pH 6.0, 7.0, 7.5, 8.5, 9.0 ve 9.5’da Cr (VI) indirgeme deneyleri yapılmıştır. Besiyerinin pH’ı 6 N HCl ve 6 N NaOH ile ayarlanarak, pH 6.0, 7.0 ve 7.5 için NaHCO₃, pH 8.5, 9.0 ve 9.5 için ise NH₃-NH₄Cl tamponları pH’ı sabitlemek için besiyerlerine ilave edilmiştir.

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 suşu için 30, 50, 80 ve 110 ppm,

Pseudomonas mendocina DS0601-FX-P22 suşu için 10, 15, 20 ve 25 ppm olacak şekilde ilave edilmiştir.

2.2.9. Organik asitlerin Cr (VI) indirgemesine etkisi

Bakteriyel Cr (VI) indirgemesine elektron vericisi olarak organik asitlerin etkilerinin incelenmesi için aljinik asit, galakturonik asit, glukuronik asit ve sitrik asit kullanılmıştır. Organik moleküller besiortamına 1 g/L olacak şekilde ilave edilmiştir (Wang ve Xiao, 1995; Mabbett ve diğ., 2002).

2.2.10. Organik asitlerin ikili kombinasyonlarının Cr (VI) indirgemeye etkisi

P18 ve P22 suşları için en yüksek krom konsantrasyonlarında (25 ve 110 ppm) organik asitlerin ikili etkileşimleri de incelenerek krom indirgemesine olan etkileri gözlemlenmiştir. Besi ortamları hazırlanırken aljinik asit, galakturonik asit, glukuronik asit ve sitrik asit miktarları her biri için 1g/L olacak şekilde ilave edilmiştir.

2.2.11. Biyosorpsiyon

Pseudomonas mendocina DS0601-FX-P22 ve *Pseudomonas mendocina* PASS3 – P18 suşu 1000 ml'lik TSB besi ortamında 24 saatlik inkübasyondan sonra, +4 °C'de 6000 rpm devirde 20 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelet, Pastör fırınında antiseptik koşullarda 12-16 saat 120 °C'de kurutulmuştur. Kurutulmuş pellet biyokütle miktarı ölçülerek 1g/L olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki (P18 suşu için 30, 50, 80 ve 110, P22 suşu için 10, 15, 20 ve 25 ppm) 100 ml'lik Cr (VI) çözeltilerine ilave edilmiştir. Örnekler 37 °C'de inkübasyona bırakılarak, belirli aralıklarla difenilkarbazid metoduna göre krom konsantrasyonları belirlenmiştir.

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

2.2.12.1. Kromat redüktaz enziminin indüklenmesi

Krom varlığında, krom redüktazın indüklenip indüklenmediğini belirlemek için p18 ve P22 suşları için daha önce belirlenen krom konsantrasyonlarında ve kontrol grubu olarak da krom içermeyen besiortamında üretilmişlerdir. Hücrelerin periplazmik fraksiyonlarının protein profillerini karşılaştırmak için, konsantre periplazmik fraksiyonlar 100 µl örnek dilüsyon tamponunda süspanse 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 süspanse 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'e (pH: 7.3) karşı diyaliz uygulanmıştır.

2.2.12.2. Poliakrilamid jel elektroforezinin yapılışı

Elektroforez işlemi Laemmli (1970)'ye göre yapılmıştır.

2.2.12.3. Proteinlerin elektroroforezde yürütülmesi ve jellerin boyanması

Proteinler Yığma 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.

2.2.12.4. Proteinlerin moleküler ağırlıklarının hesaplanması

Ayırma jelinde proteinin göç ettiği 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 apsise, proteinlerin molekül ağırlıkları da ordinata konarak bir doğru çizilir. Daha sonra molekül ağırlığı hesaplanacak proteinin molekül ağırlığı da hesaplanır.

2.2.13. Scanning elektron mikroskop (SEM) ile görüntüleme

P. mendocina PASS3-P18 suşunun kromlu ve kromsuz ortamda SEM resimleri Akdeniz Üniversitesi TEMGA birimine çektirilmiştir. SEM için 110 ppm Cr (VI) içeren ve içermeyen 50ml'lik TSB besi ortamları hazırlanmış ve bu besi ortamına

%2'lik ekim yapılarak 37 °C, 125 rpm devirde çalkalamalı kültürde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Üretilen 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 Tryptic soy broth (TSB) olarak belirlenmiştir. Kullanılan diğer besiyerleri Nutrient Broth (NB) ve Luria Bertani-Miller (LB) ortamlarında bakteriler iyi gelişim gösterememişlerdir. TSB besi yeri daha sonra yapılan bütün krom indirgeme deneylerinde aktif olarak kullanılmıştır. Sonuçlar Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1: İzole edilen bakterilere uygun besi ortamının belirlenmesi

Besi ortamları	Bakteri Kodları											
	P1	P8	P14	P15	P18	P22	P27	P37	P39	P44	P46	P52
NB	+	++	++	+	+	+++	++	++	++	+	+	++
TSB	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++
LB	+	++	++	++	++	++	+	++	+	++	++	++

+++ : çok iyi gelişme, ++ : iyi gelişme , + : zayıf gelişme

3.2. Bakterilerin gelişme sıcaklıklarının belirlenmesi

İzolatların farklı sıcaklık değerlerine olan toleransı ve krom indirgeme çalışmaları için en uygun sıcaklık değerini belirlemek için stoğa alınan bakteriler TSB besi ortamında aktifleştirilerek 25, 30, 37, 40, 42 °C’lerde 24 saat inkübe edilmiş ve gelişme durumlarına Mc-Farland çözelti tüpleri ile bakılmıştır. Bulanıklık derecelerine göre en iyi gelişim 37 °C’de gözlenmiştir. Daha sonraki tüm krom indirgeme deneyleri 37 °C’de yapılmıştır. Gelişme durumları 1 ile 10 Mc-Farland derecesine göre çok iyi gelişme, iyi gelişme, az gelişme ve gelişme yok biçiminde

değerlendirilmiştir. Sonuçlar Tablo 3.2’de verilmiştir. Genel olarak bütün izolatlar tüm sıcaklık derecelerinde gelişme göstermesine rağmen izolatlardan sadece *Exiguobacterium aurantiacum* (P1) suşu 25 ve 42 oC’lerde hiçbir gelişme göstermemiştir.

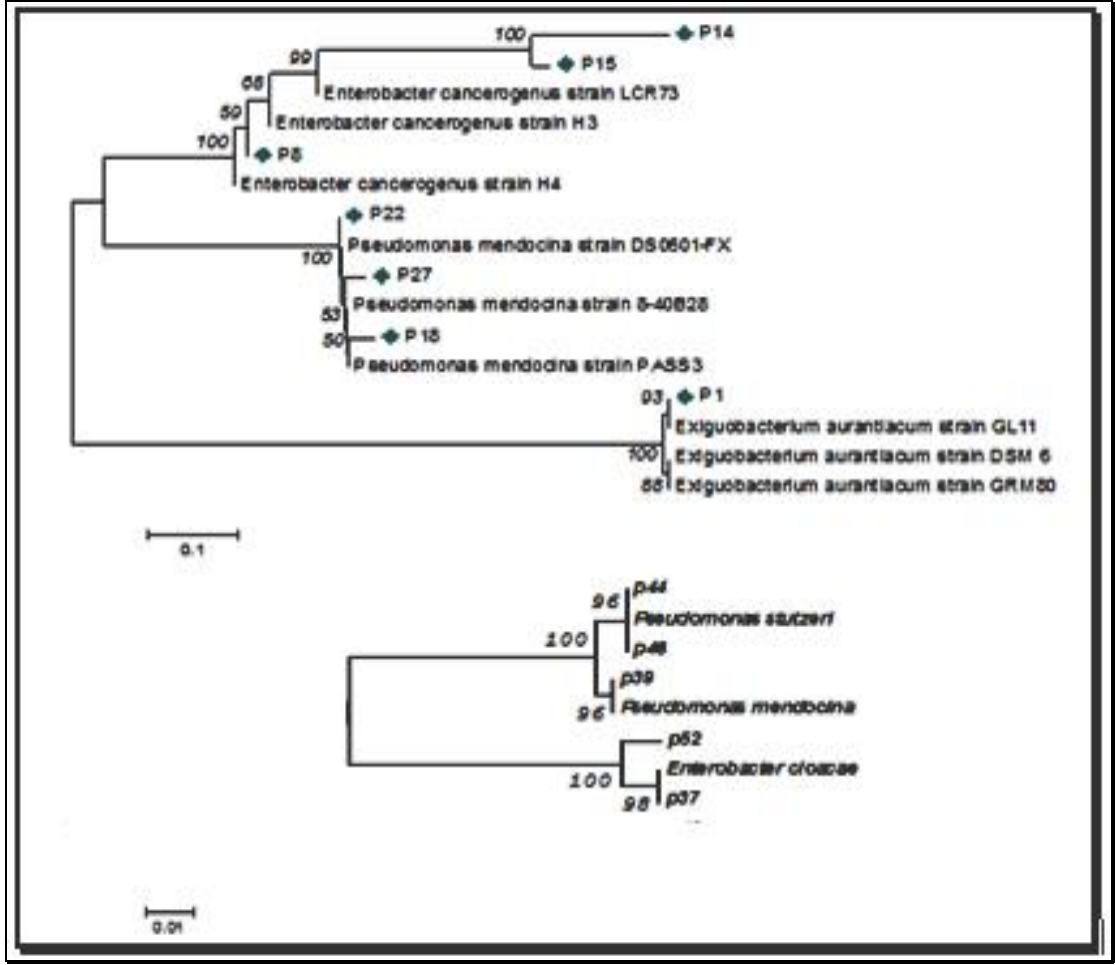
Tablo 3.2: İzole edilen bakterilerin sıcaklığa karşı toleransları

Sıcaklıklar (°C)	Bakteri Kodları											
	P1	P8	P14	P15	P18	P22	P27	P37	P39	P44	P46	P52
25	-	++	+++	++	++	+++	+++	++	+++	+	+	++
30	++	++	+++	++	++	+++	++	++	++	++	++	++
37	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	++	++	+++
40	++	++	++	++	++	+++	+++	++	+++	++	++	+++
42	++	+	+	+	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++

+++ : çok iyi gelişme, ++ : iyi gelişme , + : zayıf gelişme, - : gelişme yok

3.3. Bakterilerin Tiplendirilmesi

Daha önceki çalışmalarda API identifikasyon kitleri ve çeşitli biyokimyasal testlerle teşhis ve tanımlaması yapılan izolatların, REFGEN’e yaptırılan 16S rRNA sekans analizi sonuçlarının değerlendirilmesi neticesinde toplam 12 izolat içinde 5 farklı tür olduğu tespit edilmiştir. Bu izolatların 3’ü *Enterobacter cancerogenus*, 4’ü *Pseudomonas mendocina*, 1’i *Exiguobacterium aurantiacum*, 2’si *Pseudomonas stutzeri* ve 2’si *Enterobacter cloacae* olduğu görülmüştür. 16S rRNA sekans analizi ile tiplendirilen suşların tür adı ve izolasyon kaynakları Tablo 2.1’de (bkz s: 42), 16S rRNA sekans analizi ile ilgili filogenetik ağaç Şekil 3.1’de verilmiştir. Bu 12 izolat içinde *Pseudomonas* türü 6 izolat arasından daha sonra krom indirgeme çalışmaları için, kroma olan toleranslarına göre seçim yapılmıştır.



Şekil 3.1: İzolatların 16S rRNA analizine göre filogenetik ağacı

REFGEN analizleri neticesinde krom indirgemesi deneyleri için belirlenen P18 ve P22 suşlarının baz dizi analizleri ayrı ve birbirleri ile karşılaştırılarak suşlar arasında benzerlik ve farklılıklar tanımlanmıştır. *P. mendocina* PASS3-P18 suşu 830 baz çiftine sahipken, *P. mendocina* DS0601-FX-P22 suşu 992 baz çiftine sahiptir. Bakterilerin baz dizi analizleri Şekil 3.2 ,3.3 ve 3.4' te gösterilmiştir.

1	GCGCTGACGA	GAGCGCTAAC	ACATGGCAAG	TCGAGCAGAG
41	GAGGGGAGCT	TGCTCCCTGA	TTTAGCGGCG	GACGGGTGAG
81	TAAATGCCTAG	GAATCTGCCT	GGTAGTGGGG	GATAACGTTC
121	CGAAAAGGAAC	GCTAATACCG	CATACGTCCT	ACGGGAGAAA
161	GCAGGGGACC	TTCGGGCCTT	GCGCTATCAG	ATGAGCCTAG
201	GTCGGATTAG	CTAGTTGGTG	AGGTAATGGC	TCACCAAGGC
241	GACGATCCGT	AACTGGTCTG	AGAGGATGAT	CAGTCACACT
281	GGAACTGAGA	CACGGTCCAG	ACTCCTACGG	GAGGCAGCAG
321	TGGGGAAATAT	TGGACAATGG	GCGAAAAGCCT	GATCCAGCCA
361	TGCCGCGTGT	GTGAAAGAAAG	TCTTCGGATT	GTAAAGCACT
401	TTAAGTTGGG	AGGAAAGGGCA	TTAACCTAAT	ACGTTAGTGT
441	TTTGACGTTA	CCAACAGAAT	AAGCACCCGG	TAACCTTCGT
481	CCAGCAGCCG	CGGTAATACG	AAGGGTGCAA	GCGTTAATCG
521	GAATTACTGG	CCGTAAAAAGC	GCGCGTAGGT	GGTTCGTTAA
561	GTTGGATGTG	AAAGCCCCGG	GCTCAACCTG	GGAACCTGCAT
601	CCTAAACTGG	CGAGCTAGAG	TACGGTAGAG	GGTGGTGGAA
641	TTTCCTGTGT	AGCGGTGAAAT	TGCGTAGATA	TAGGAAGGAA
681	CACCAGTGGG	AGGGGACCAC	CCTGGGACTG	ATACTGACAC
721	TGAGGTGCGA	AAGCGTGGGG	GAGAAAACAG	GATTACATAC
761	CCTGGGAGGC	CCCGCCCGGA	AACGATGTCA	ACTAGGCCGT
801	TGAAAATCCT	TGGAGATTTT	AATTGGGCCA	

Şekil 3.2: *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 suşunun DNA baz dizileri (830 bp)

1	TGCGATGAGG	AACGCTAACC	ATGGCAAGTC	GAGCGGAGGA
41	AGGGGAGCTTG	CTCCCTGATT	TAGCGGGCGGA	CGGGTGAAGTA
81	ATGCCTAGGA	ATCTGCCTGG	TAGTGGGGGA	TAACGTTCCG
121	AAAAGGAACGC	TAAATCCCGCA	TACGTCCCTAC	GGGAGAAAAGC
161	AGGGGACCCTT	CGGGCCTTGC	GCTATCAGAT	GAGCCTAGGT
201	CGGATTAGCT	AGTTGGTGAG	GTAATGGCTC	ACCAAGGCCGA
241	CGATCCGTAA	CTGGTCTGAG	AGGATGATCA	GTACACTGG
281	AACTGAGACA	CGGTCCAGAC	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG
321	GGGAAATATTG	GACCAATGGGC	GAAAAGCCTGA	TCCAGCCATG
361	CCGCGTGTGT	GAAAGAAAGGTC	TTCGGATTGT	AAAGCACTTT
401	AAAGTTGGGAG	GAAAGGGCATT	AAACCTAATAC	GTTAGTGTTT
441	TGACGTTACC	AACAGAAATAA	GCACCCGGCTA	ACTTCGTGCC
481	AGCAGCCCGCG	GTAATACGAA	GGGTGCAAGC	GTTAATCGGA
521	ATTACTGGGC	GTAAAGCGCG	CGTAGGTGGT	TCGTTAAGTT
561	GGATGTGAAA	GCCCCGGGCT	CAACCTGGGA	ACTGCATCCA
601	AAACTGGCSGA	GCTAGAGTAC	GSTAGAGGCT	GATGSAATTT
641	CCTGTGTAGC	GGTGAAATGC	GTAGATATAG	GAAGGAACAC
681	CAGTGGCSGAA	GGCGACCACC	TGGACTGATA	CTGACACTGA
721	GGTGCGAAAAG	CGTGGGGAGC	AAACAGGATT	AGATACCCTG
761	GTAGTCCACG	CCGTAAAACGA	TGTCAACTAG	CCGTTGGAAAT
801	CCTTGAGATT	TTAGTGGCGC	AGCTAACGCA	TTAAGTTGAC
881	AAATTGACGGG	GGCCCCGCACA	AGCGGTGGAG	CATGTGGTTT
921	AAATTCGAAAGC	AACGCGAAGA	ACCTTACCTG	GCCTTGACAT
961	GCTGAGAACT	TTCCAGAGAT	GGATTGGTGC	CT

Şekil 3.3: *Pseudomonas mendocina* DS 0601-FX-P22 suşunun DNA baz dizileri (992 bp)


```

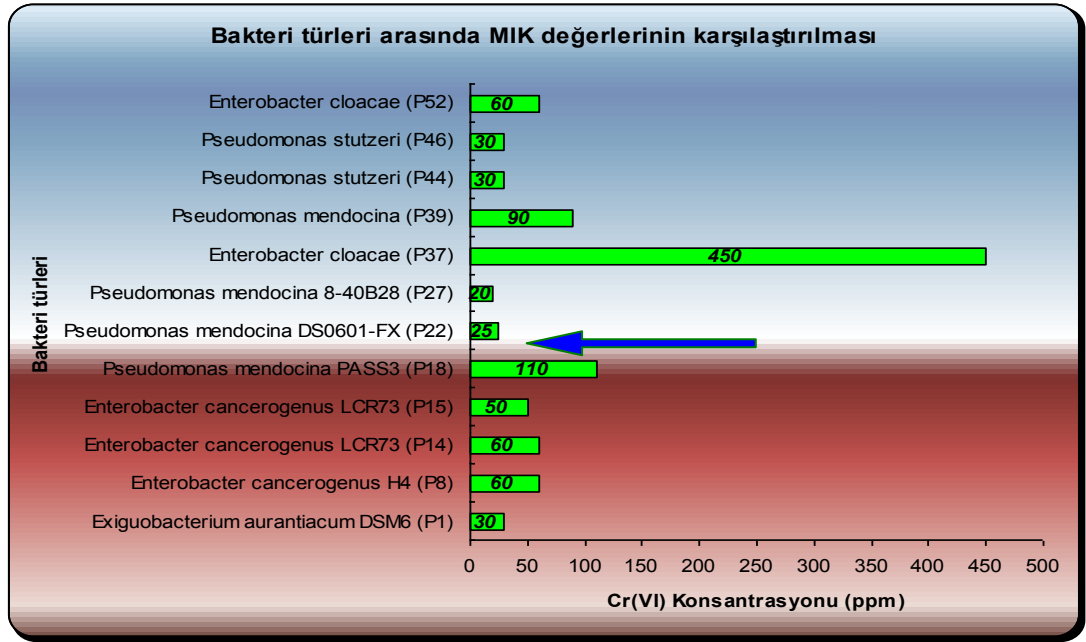
P22 GCGC?TGACGAGAGCGCTAACACATGGCAAGTCGAGCAGAGGAGGGGAGCTTGCTCCCTGATTT
P18 TCGCATGAGGA A?? CGCTAAC?CATGGCAAGTCGAGCGGAGGAAGGGAGCTTGCTCCCTGATTT
P22 AGCGGGCGGAC GGGTGAGTAA TGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGATAACGTTCCGAAAG
P18 AGCGGGCGGAC GGGTGAGTAA TGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGATAACGTTCCGAAAG
P22 GAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAG
P18 GAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAG
P22 ATGAGCCTAG GTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGGCAGCATCCGTAACT
P18 ATGAGCCTAG GTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGGCAGCATCCGTAACT
P22 GGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGCAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
P18 GGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGCAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
P22 AGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTC
P10 AGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTC
P22 TTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAATACGTTAGTGTGTTGACGT
P18 TTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAATACGTTAGTGTGTTGACGT
P22 TACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGC
P18 TACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGC
P22 GTTAATCGGAATTACTGGG CGTAAAAGCG CGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCC
P18 GTTAATCGGAATTACTGGG CGTAAA?GCG CGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCC
P22 CCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCTAAACTGGC GAGCTAGAGTACGG TAGAGGGTGTGGA
P18 CCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCTAAACTGGC GAGCTAGAGTACGG TAGAGGGTGTGGA
P22 ATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAA CACCAGTGGGAGGGGACCACCCT
P18 ATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAA CACCAGTGGGAGGGGACCACCCT
P22 GGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGGAGAAACAGGGATTACATACCCTGGG?
P18 TGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGG AGCAAACAG?GATTAGATACCCTGGTA
P22 AGGCCCGCCCGGAAACGATGTCAACTAGG CCGTTGGAAATCCTTGAGATTTAATTGGGCCA
P18 GTCCACGCCGT?? AAACGA TGCAACTAG? CCGTT GGAA?TCCTTGAGATTTAATTGGGCCA
P22 ACGCATTAAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGG CCGCAAGGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGG
P18 ?????????????????????????????????????????????????????????????????
P22 CTAGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTG
P18 ?????????????????????????????????????????????????????????????????
P22 GCCTTGACATGCTGAGAAGTTCCAGAGATGGATTGGTGCCT
P18 ?????????????????????????????????????????????????????????????????

```

Şekil 3.4: *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 ve *Pseudomonas mendocina* DS 0601-FX-P22 suşunun DNA baz dizi analizlerinin karşılaştırılması

3.4. Bakterilerin Hekzavalent Krom Dirençlilik Mekanizmalarının Belirlenmesi

Bakterilerin krom dirençliliği, minimum inhibisyon konsantrasyonuna göre belirlenmiştir. Krom konsantrasyonu 10 ile 500 ppm aralığında tutularak toplam hacim 5 ml olacak şekilde Broth Dilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Gözle görülür bir gelişmenin olmadığı minimum krom konsantrasyonu MİK olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca sonuçlar petri ekimi yapılarak da doğrulanmıştır. Sonuçlar Şekil 3.5'te verilmiştir.



Şekil 3.5: Bakterilerin MİK değerleri

Krom indirgeme deneyleri için yapılan ön denemelerimiz sonunda kromun 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.

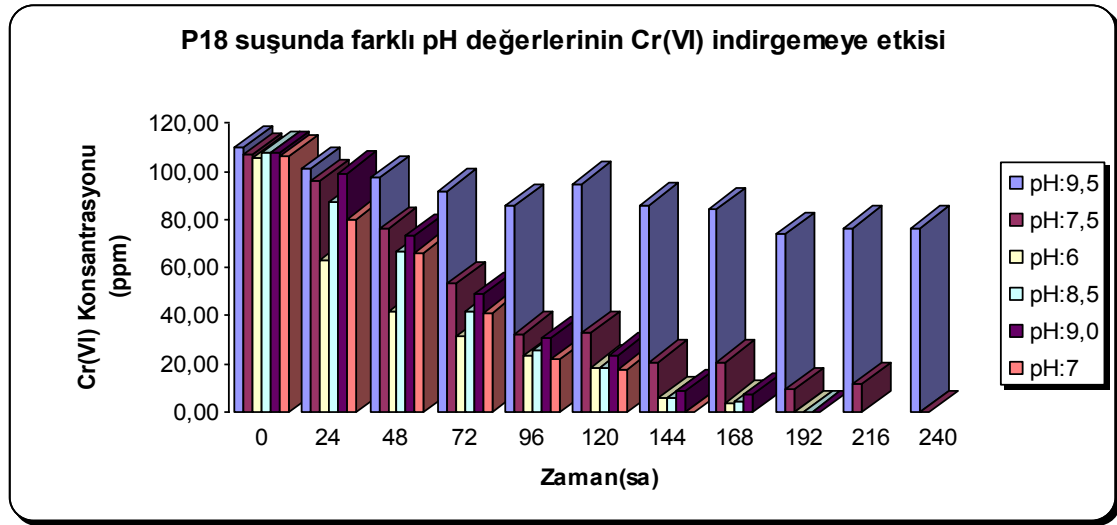
3.5. Krom İndirgeme Deneyleri

3.5.1. Krom indirgemeye pH'nın 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 NaHCO_3 tamponu kullanılarak sabitlenmiştir. Çalışma sonunda elde edilen sonuçlara göre, *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 suşu 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 Tablo 3.3'te ve Şekil 3.6'da verilmiştir.

Tablo 3.3: P18 suşunda ait farklı pH değerlerinin Cr (VI) indirgemeye etkisi(OD₅₄₀)

Zaman(sa)	pH:9,5	pH:7,5	pH:6	pH:8,5	pH:9,0	pH:7
0	109,78±0,00	106,81±1,97	105,32±2,47	107,80±0,99	107,80±0,99	106,31±3,46
24	100,87±2,97	95,92±0,00	63,25±4,95	87,01±2,97	99,38±1,48	80,08±5,05
48	97,40±1,51	76,12±0,99	41,78±1,67	66,50±5,23	73,15±4,95	66,22±0,99
72	91,91±3,02	53,30±0,94	31,57±1,98	41,96±0,49	48,89±4,45	41,28±1,17
96	85,52±6,43	32,56±0,99	23,15±2,48	25,63±1,98	30,54±0,96	21,67±2,02
120	94,93±0,99	33,05±2,48	18,70±0,99	18,70±0,00	23,65±0,99	17,71±0,99
144	86,02±0,99	20,68±0,99	5,88±5,88	5,83±0,00	8,80±0,99	0,00±0,00
168	84,04±1,98	20,68±1,98	3,90±3,90	4,34±1,48	7,31±0,50	0,00±0,00
192	74,13±1,97	9,29±1,49	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
216	76,61±1,48	11,77±2,97	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
240	76,61±1,48	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00



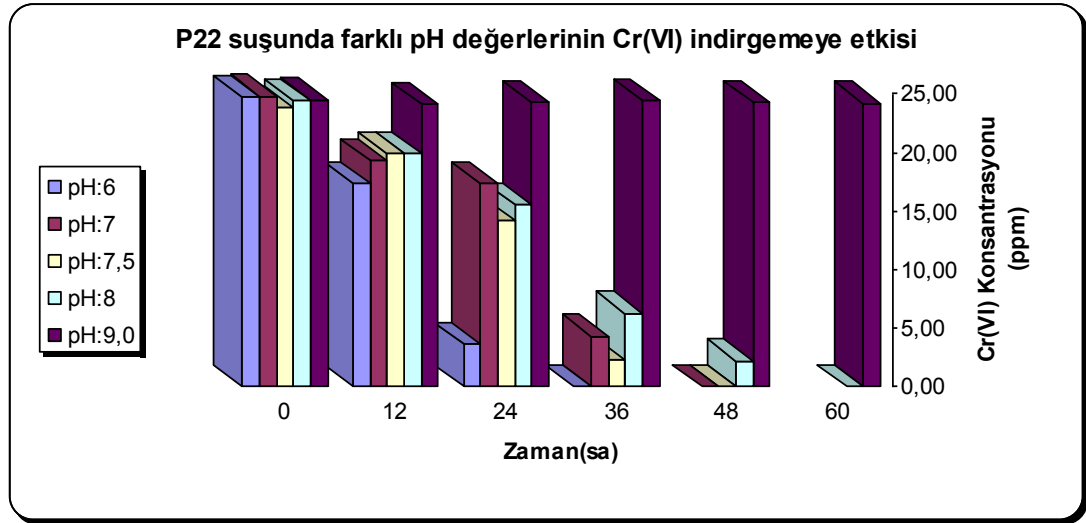
Şekil 3.6: *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 suşunun pH değişimine bağlı Cr (VI) indirgemesi

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 suşu 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 Tablo 3.4 ve Şekil 3.7'de verilmiştir.

Tablo 3.4: P22 suşunda ait farklı pH değerlerinin Cr (VI) indirgemeye etkisi(OD₅₄₀)

Zaman(sa)	pH:6	pH:7	pH:7,5	pH:8	pH:9,0
0	24,71±0,01	24,78±0,17	23,85±0,65	24,46±0,43	24,48±0,02
12	17,35±0,40	19,26±0,06	19,90±0,13	19,90±0,10	24,12±0,15
24	3,56±0,44	17,30±0,45	14,20±0,17	15,52±0,48	24,27±0,00
36	0,00±0,00	4,25±0,22	2,25±0,42	6,21±0,06	24,40±0,10
48	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	2,13±0,09	24,25±0,02
60	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	24,20±0,07

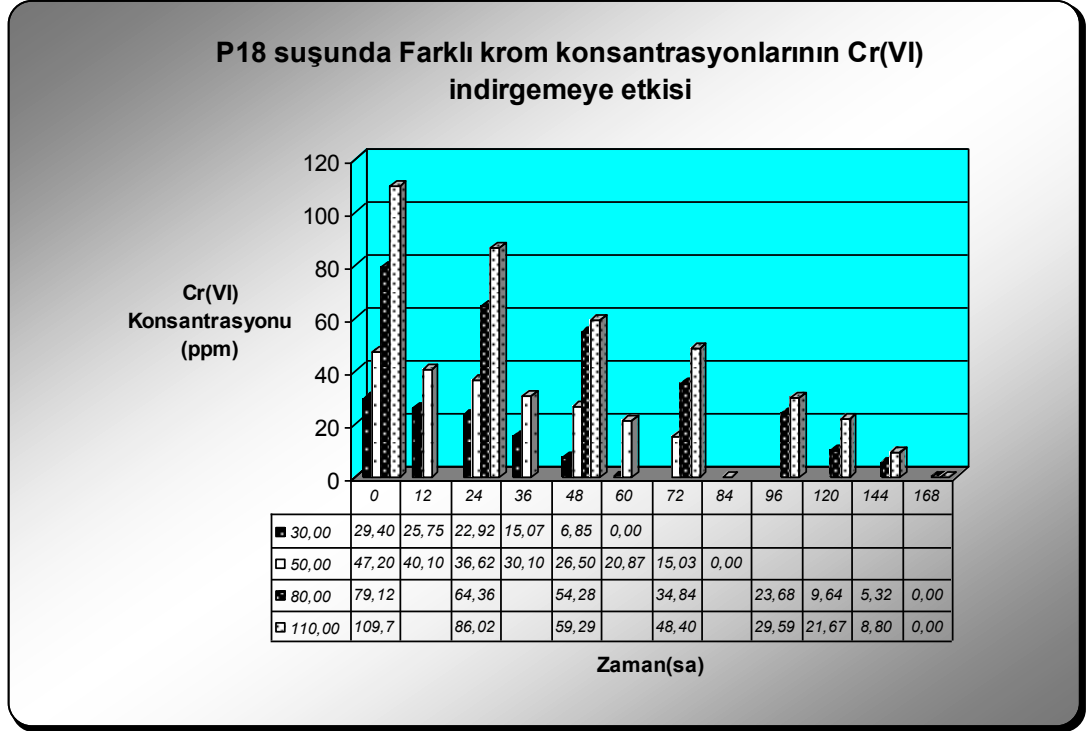


Şekil 3.7: *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX-P22 suşunun pH değişimine bağlı Cr (VI) indirgemesi

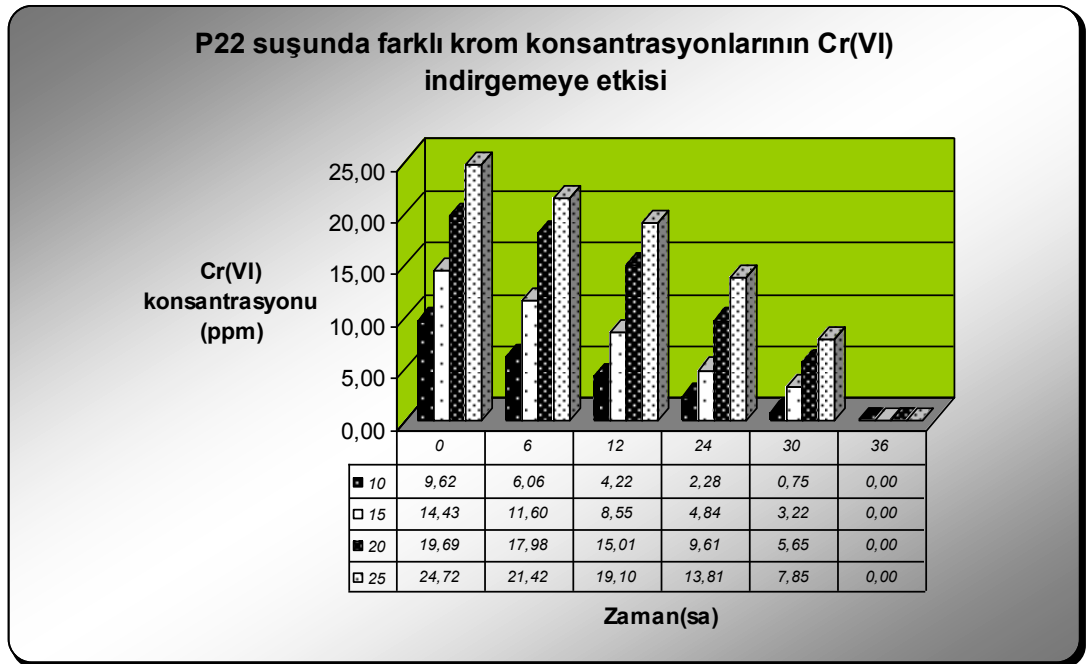
3.5.2. Krom indirgemeye farklı krom konsantrasyonlarının etkisi

Krom indirgeme deneyleri için uygun pH ortamları belirlendikten sonra her iki bakteri suşu için de farklı krom konsantrasyonlarının krom indirgemesi üzerine olan etkilerini incelemek için TSB besi ortamına P18 suşu için sırası ile 110, 80, 50 ve 30 ppm'lik Cr (VI) konsantrasyonları ilave edildikten sonra % 2'lik bakteri inokülasyonu yapılarak inkübasyona bırakılmışlardır. Aynı şekilde P22 suşu için de

sırası ile 25, 20, 15 ve 10 ppm'lik Cr (VI) konsantrasyonları ilave edilerek % 2'lik bakteri inokulasyonu yapılmıştır. İnkübasyona bırakılan deney gruplarından her iki bakteri için de arzu edilen inkübasyon periyotlarında örnekler alınarak krom indirgeme miktarları gözlemlenmiştir. Sonuçlar Şekil 3.8 ve 3.9 da verilmiştir.



Şekil 3.8: P18 suşunda farklı krom konsantrasyonlarının Cr (VI) indirgemeye etkisi



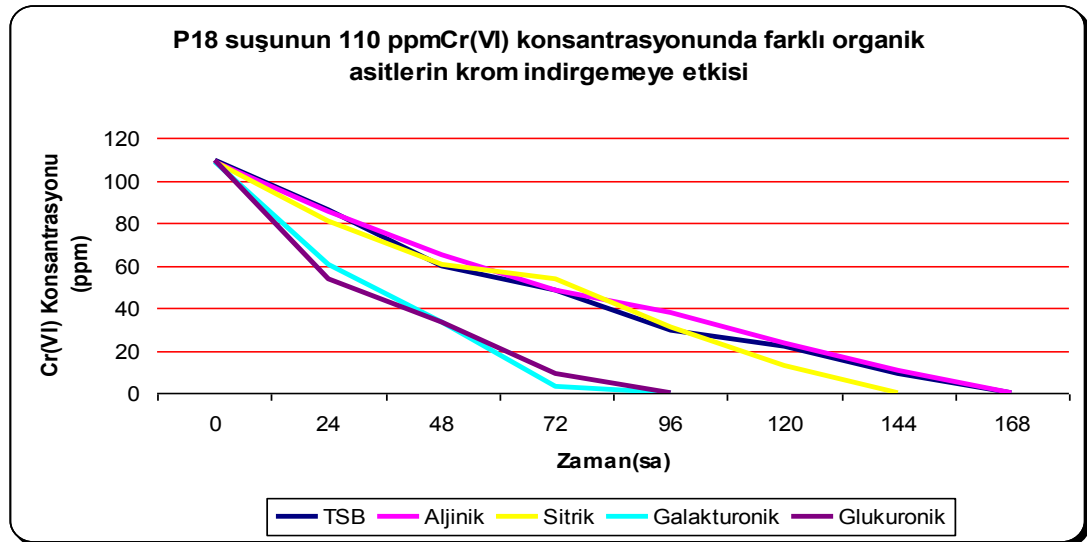
Şekil 3.9: P22 suşunda farklı krom konsantrasyonlarının Cr (VI) indirgemeye etkisi

3.6. Krom indirgemeye farklı organik asitlerin etkisi

Organik moleküllerce Cr (VI) 'nın indirgemesi, çalışmada kullanılan doğal organik asitlerin molekül ağırlığı ve yapısına bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Cr (VI)'nın doğal organik asitler tarafından indirgenmesi için ortamın pH'sı, sıcaklığı, iyonik gücü ve ortamda mevcut diğer redoks reaktif metallerin konsantrasyonu oldukça önemlidir. Sonuçlar Tablo 3.5 ve Şekil 3.10'de gösterilmiştir.

Tablo 3.5: 110 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit ortamlarında P18 suşuna ait Cr (VI) indirgemesi (OD₅₄₀)

Zaman (sa)	TSB (Kontrol)	Galakturonik asit	Glukuronik asit	Sitrik asit	Aljinik asit
0	109,78±0,00	108,87±0,91	109,28±0,49	108,87±0,00	108,87±0,41
24	86,02±0,99	60,28±0,00	53,35±0,00	80,57±5,45	85,03±0,99
48	59,29±0,99	33,55±0,99	33,55±0,00	60,28±0,00	65,23±0,00
72	48,40±2,97	2,86±0,99	9,29±0,50	53,84±50	48,40±0,00
96	29,59±4,95	0,00±0,00	0,00±0,00	31,07±6,44	37,51±0,99
120	21,67±3,96	0,00±0,00	0,00±0,00	12,76±1,98	23,15±1,48
144	8,80±1,98	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	10,28±1,49
168	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

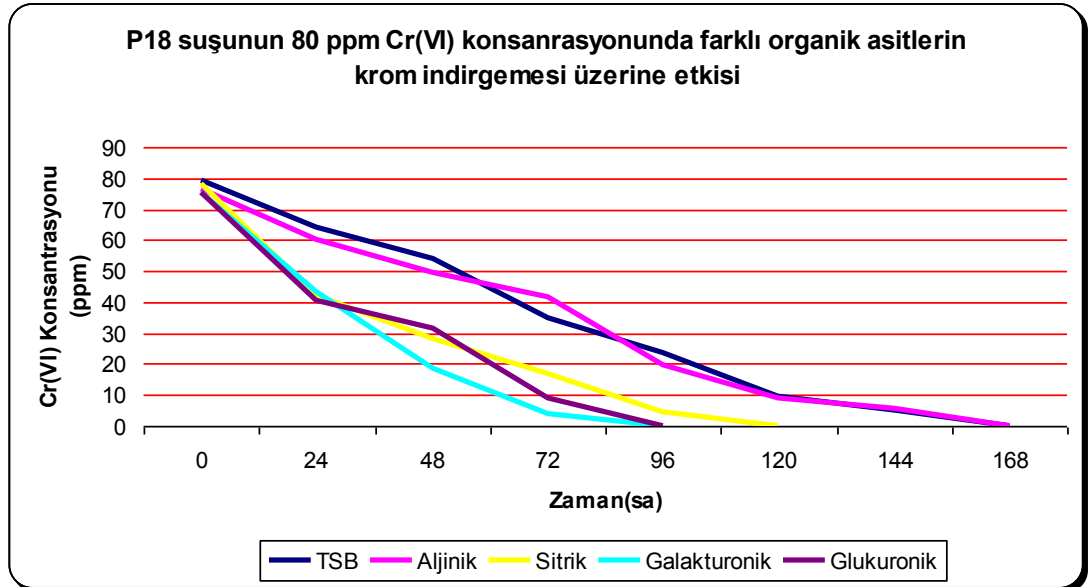


Şekil 3.10: P18 suşunun 110 ppm Cr (VI) konsantrasyonunda farklı organik asitlerin krom indirgemeye etkisi

Krom konsantrasyonunun 80 ppm'e çekilmesi, sitrik asitli ortamlardaki hücrelere az da olsa pozitif yönde etki ederek kromu 24 saat daha erken indirgemelerine vesile olarak 120. saate indirgemeleri ile sonuçlanmıştır. Sonuçlar Tablo 3.6 ve Şekil 3.11'de gösterilmiştir.

Tablo3.6: 80 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit ortamlarında P18 suşuna ait Cr (VI) indirgemesi (OD₅₄₀)

Zaman (sa)	TSB (Kontrol)	Galakturonik asit	Glukuronik asit	Sitrik asit	Aljinik asit
0	79,12±0,00	75,32±0,20	75,52±0,72	78,04±1,80	76,24±0,72
24	64,36±3,96	43,48±1,08	40,24±0,00	42,04±3,96	60,04±0,36
48	54,28±1,80	18,64±1,44	31,24±0,36	28,00±1,44	49,24±3,24
72	34,84±0,36	3,88±1,80	9,28±1,44	16,84±0,36	41,68±1,44
96	23,68±7,20	0,00±0,00	0,00±0,00	4,24±0,00	19,72±1,80
120	9,64±5,40	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	8,92±2,52
144	5,32±0,36	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	5,68±0,00
168	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

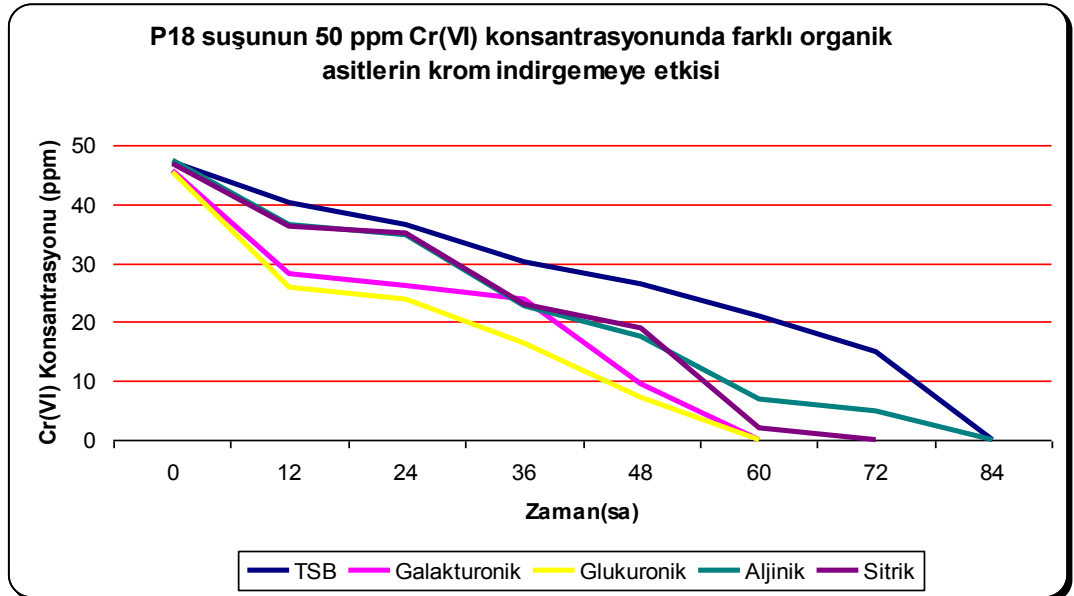


Şekil 3.11: P18 suşunun 80 ppm Cr (VI) konsantrasyonunda farklı organik asitlerin krom indirgemeye etkisi

Aynı bakteri için krom miktarı 60 ppm azaltılarak, 50 ppm krom içeren TSB ve farklı organik asitlerin bulunduğu ortamlarda yapılan denemelere göre, krom miktarının MİK değerine göre neredeyse % 55 oranında azaltılması kontrol grubunda (TSB) buluna P18 suşu krom indirgeme süresini yarı yarıya düşürerek 84. saatte 50 ppm kromun tamamını indirgeyebilmişlerdir. Sonuçlar Tablo 3.7 ve Şekil 3.12’de gösterilmiştir.

Tablo 3.7: 50 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit ortamlarında P18 suşuna ait Cr (VI) indirgemesi (OD₅₄₀)

Zaman (sa)	TSB (Kontrol)	Galakturonik asit	Glukuronik asit	Sitrik asit	Aljinik asit
0	47,20±0,45	45,62±0,23	45,40±0,90	46,75±0,45	47,42±0,67
12	40,10±0,55	28,30±2,20	25,82±0,67	36,17±0,67	36,62±1,12
24	36,62±0,12	26,27±2,03	23,80±1,35	35,05±0,90	34,82±0,67
36	30,10±2,70	23,80±1,35	16,24±3,06	22,90±4,50	22,67±5,17
48	26,50±3,40	9,40±0,90	7,15±0,45	18,85±5,85	17,45±3,55
60	20,87±1,13	0,00±0,00	0,00±0,00	1,97±0,68	6,92±1,57
72	15,03±1,12	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	4,90±2,25
84	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

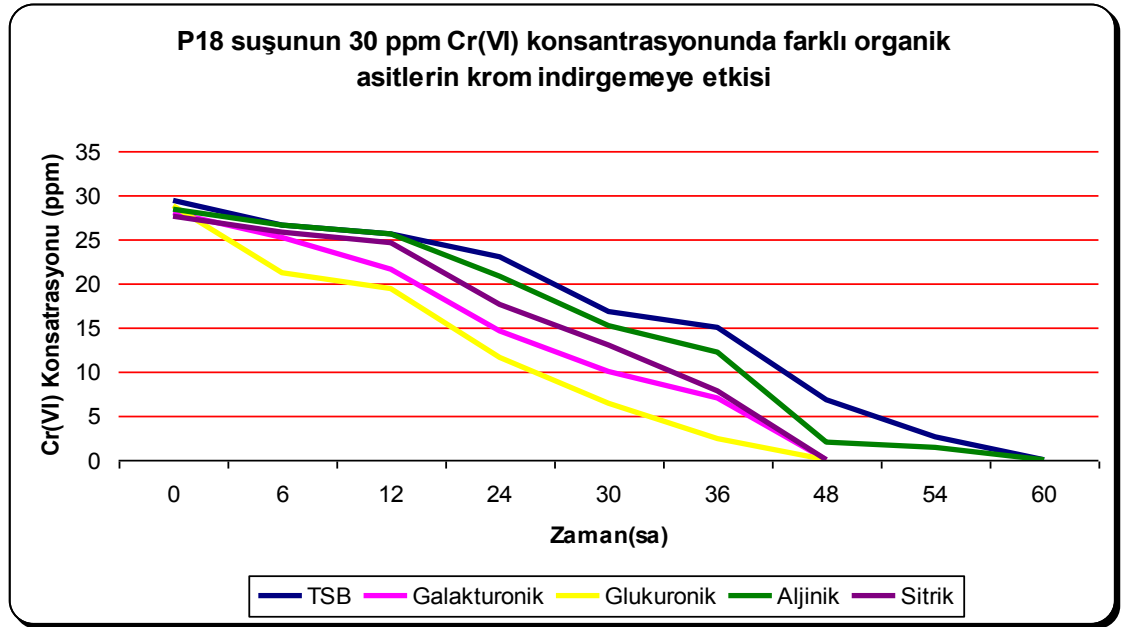


Şekil 3.12: P18 suşunun 50 ppm Cr (VI) konsantrasyonunda farklı organik asitlerin krom indirgemeye etkisi

MİK değerine (110 ppm) göre yaklaşık % 73 oranında azaltılarak 30 ppm krom konsantrasyonu ile yapılan deneme sonuçlarına göre, P18 suşu kontrol grubu (TSB) ortamlarında kromun tamamını 60 saatte sıfırlamışlardır. Sonuçlar Tablo 3.8 ve Şekil 3.13'te gösterilmiştir.

Tablo 3.8: 30 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit ortamlarında P18 suşuna ait Cr (VI) indirgemesi (OD₅₄₀)

Zaman (sa)	TSB (Kontrol)	Galakturonik asit	Glukuronik asit	Aljinik asit	Sitrik asit
0	29,40±0,00	28,05±0,00	28,86±0,27	28,45±0,67	27,51±0,27
6	26,70±0,54	25,13±0,32	21,16±0,40	26,70±0,54	25,87±0,25
12	25,70±0,18	21,55±0,56	19,41±1,08	25,62±0,54	24,54±0,81
24	22,92±0,00	14,68±0,67	11,58±1,89	20,89±0,67	17,65±0,14
30	16,71±1,08	10,09±0,94	6,31±1,48	15,22±0,68	12,93±0,79
36	15,07±0,29	6,99±1,35	2,40±1,08	12,25±1,48	7,80±0,00
48	6,85±1,21	0,00±0,00	0,00±0,00	1,99±0,13	0,00±0,00
54	2,53±0,94	0,00±0,00	0,00±0,00	1,32±0,27	0,00±0,00
60	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

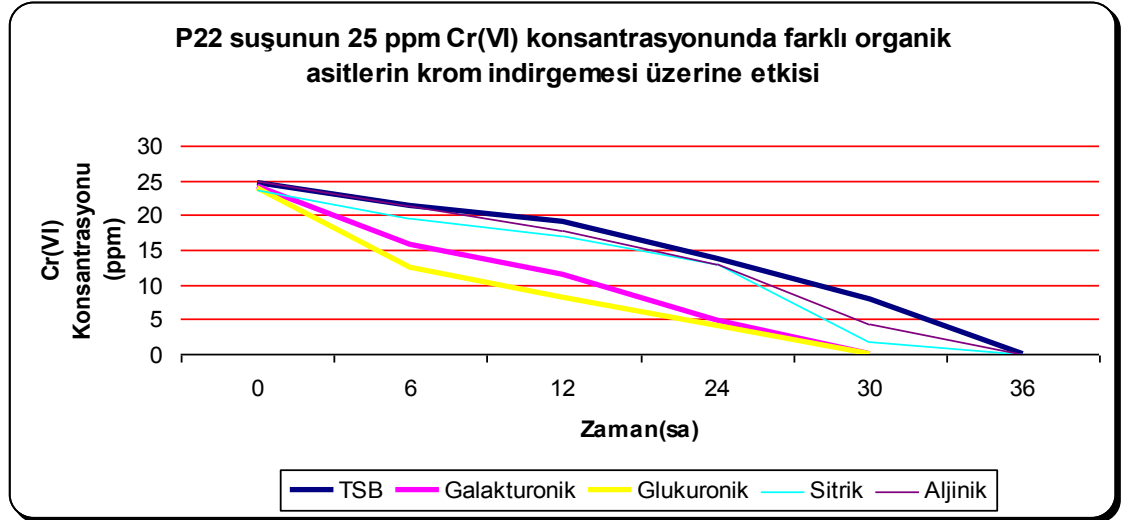


Şekil 3.13: P18 suşunun 30 ppm Cr (VI) konsantrasyonunda farklı organik asitlerin krom indirgemeye etkisi

P22 suşunda MİK değeri olan 25 ppm krom konsantrasyonunda yapılan farklı organik moleküllerin Cr (VI) indirgemesine olan etkileri incelendiğinde, herhangi bir organik asit içermeyen kontrol grubu (TSB) ortamındaki hücreler yaklaşık 25 ppm kromu inkübasyon periyodununun 36. saatinde tamemem tüketmişlerdir. Sonuçlar Tablo 3.9 ve Şekil 3.14'te gösterilmiştir.

Tablo 3.9: 25 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit ortamlarında P22 suşuna ait Cr (VI) indirgemesi (OD₅₄₀)

Zaman (sa)	TSB (kontrol)	Galakturonik asit	Glukuronik asit	Sitrik asit	Aljinik asit
0	24,72±0,23	24,05±0,00	23,93±0,12	23,71±0,11	24,95±0,00
6	21,42±0,15	15,83±1,02	12,34±0,22	19,66±0,56	21,46±0,56
12	19,10±0,45	11,55±0,12	8,07±0,22	17,07±0,00	17,86±0,34
24	13,81±0,56	4,81±0,34	4,13±0,34	13,02±2,02	12,91±0,79
30	7,85±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,88±0,78	4,24±2,93
36	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

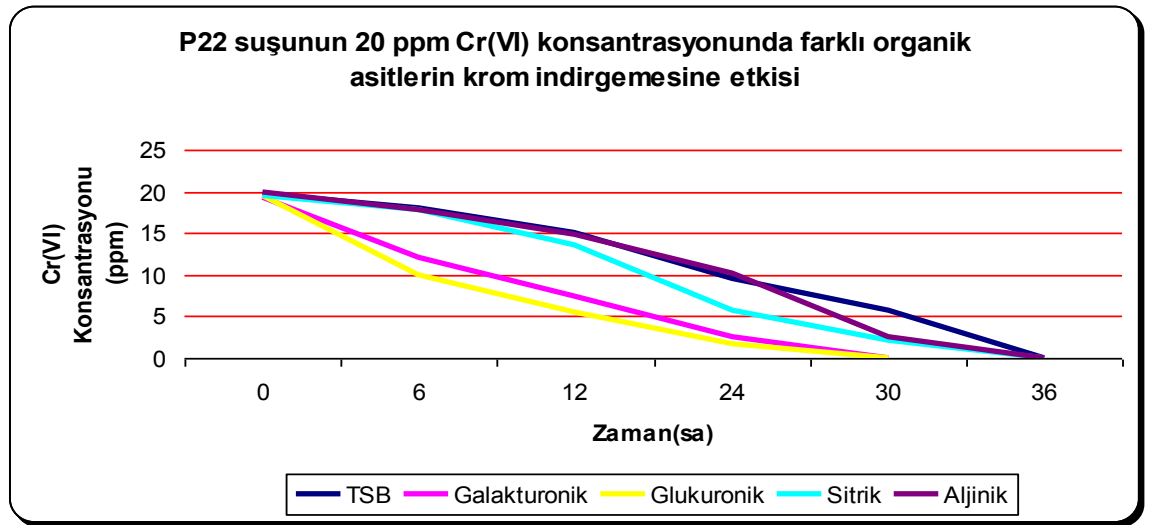


Şekil 3.14: P22 suşunun 25 ppm Cr (VI) konsantrasyonunda farklı organik asitlerin krom indirgemeye etkisi

20 ppm'lik krom konsantrasyonu ile yapılan krom indirgeme denemelerinde, krom indirgeme süreleri açısından 25 ppm krom konsantrasyonu denemelerinden hiçbir fark gözlenmemiştir. TSB kontrol grubu 36 saatte 20 ppm kromu tamamen sıfırlarken, galakturonik asitli ve glukuronik asitli ortamlarda inkübasyon periyodunun 30. saatinde, sitrik asitli ve aljinik asitli ortamlarda ise yine kontrol grubu ile aynı sürede sıfırlamışlardır. Sonuçlar Tablo 3.10 ve Şekil 3.15'te gösterilmiştir.

Tablo 3.10: 20 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit ortamlarında P22 suşuna ait Cr (VI) indirgemesi (OD₅₄₀)

Zaman (sa)	TSB (kontrol)	Galakturonik asit	Glukuronik asit	Sitrik asit	Aljinik asit
0	19,69±0,09	19,33±0,07	19,42±0,18	19,51±0,09	19,96±0,00
6	17,98±0,36	12,13±0,45	10,06±0,90	17,80±0,00	17,89±0,09
12	15,01±0,45	7,36±0,36	5,56±0,36	13,48±0,36	14,74±0,90
24	9,61±0,45	2,50±0,54	1,78±0,18	5,74±3,42	10,15±1,17
30	5,65±0,99	0,00±0,00	0,00±0,00	2,15±2,15	2,51±2,51
36	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

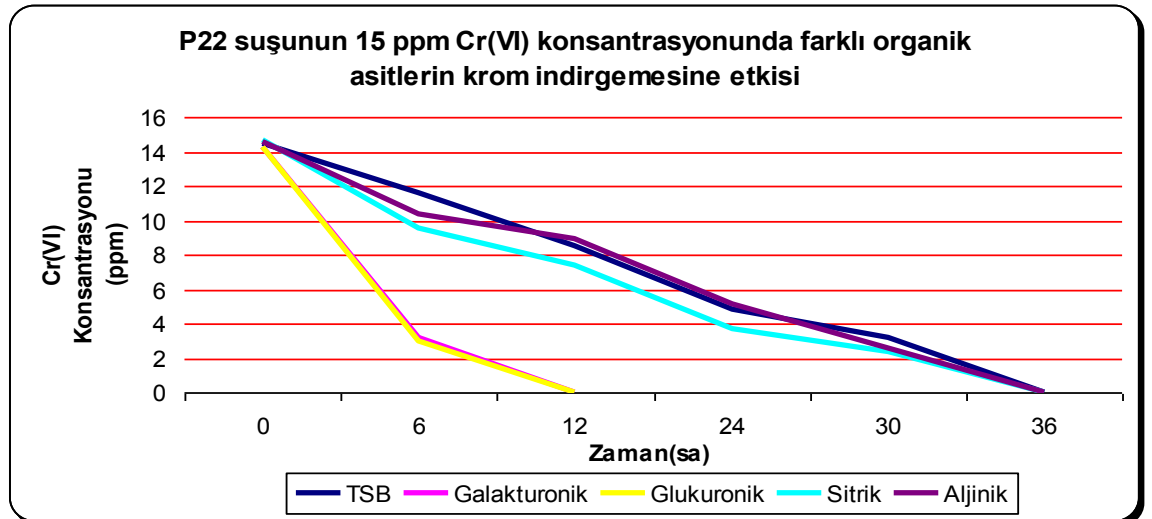


Şekil 3.15: P22 suşunun 20 ppm Cr (VI) konsantrasyonunda farklı organik asitlerin krom indirgemeye etkisi

Krom miktarının % 40 oranında azaltılması ile 15 ppm krom konsantrasyonunda yapılan farklı organik asitlerin P22 suşunda krom indirgemesi üzerine olan etkileri gözlenerek sonuçlar Tablo 3.21 ve Şekil 3.26’te gösterilmiştir. Galakturonik asitli ve glukuronik asitli ortamda yetişen P22 suşu krom indirgemesinde etkili olarak inkübasyon periyodunun ilk 12. saatinde yaklaşık 15 ppm kromu tamamen sıfırlamışlardır. Sonuçlar Tablo 3.11 ve Şekil 3.16’da gösterilmiştir

Tablo 3.11: 15 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit ortamlarında P22 suşuna ait Cr (VI) indirgemesi (OD₅₄₀)

Zaman (sa)	TSB (kontrol)	Galakturonik asit	Glukuronik asit	Sitrik asit	Aljinik asit
0	14,43±0,13	14,29±0,13	14,23±0,07	14,63±0,07	14,57±0,27
6	11,60±0,40	3,22±0,68	3,02±0,20	9,50±0,34	10,38±1,08
12	8,55±0,75	0,00±0,00	0,00±0,00	7,41±0,00	8,89±0,00
24	4,84±0,40	0,00±0,00	0,00±0,00	3,69±0,20	5,11±0,68
30	3,22±0,27	0,00±0,00	0,00±0,00	2,34±0,20	2,55±0,81
36	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

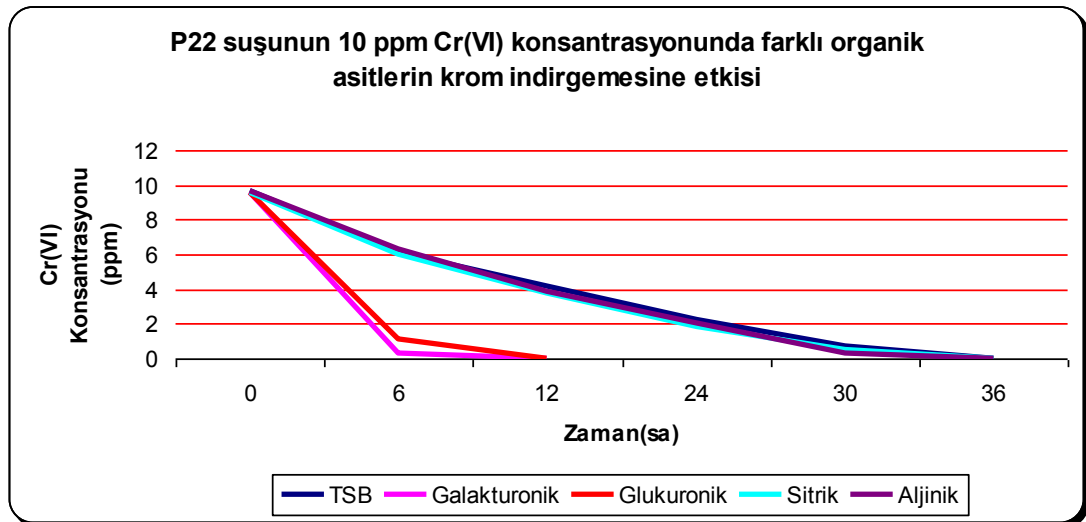


Şekil 3.16: P22 suşunun 15 ppm Cr (VI) konsantrasyonunda farklı organik asitlerin krom indirgemeye etkisi

Krom miktarı 10 ppm'e çekilerek yapılan farklı organik asitlerin P22 suşunda krom indirgemesi üzerine olan etkileri gözlenmiştir. 25, 20 ve 15 ppm krom ortamlarında yapılan denemelerle paralel sonuçlar elde edilmiştir. P22 suşunun gelişim ortamına galakturonik asit ve glukuronik asit ilave edildiğinde kontrole kıyasla krom indirgemesinde daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Deney sonuçları Tablo 3.12 ve Şekil 3.17'de gösterilmiştir.

Tablo 3.12: 10 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit ortamlarında P22 suşuna ait Cr (VI) indirgemesi (OD₅₄₀)

Zaman (sa)	TSB (kontrol)	Galakturonik asit	Glukuronik asit	Sitrik asit	Aljinik asit
0	9,62±0,09	9,57±0,14	9,57±0,04	9,57±0,14	9,71±0,09
6	6,06±0,23	0,35±0,00	1,07±0,36	5,97±0,94	6,27±0,03
12	4,22±0,45	0,00±0,00	0,00±0,00	3,72±0,40	3,82±0,32
24	2,28±0,31	0,00±0,00	0,00±0,00	1,83±0,31	2,01±0,05
30	0,75±0,23	0,00±0,00	0,00±0,00	0,53±0,09	0,35±0,09
36	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00



Şekil 3.17: P22 suşunun 10 ppm Cr (VI) konsantrasyonunda farklı organik asitlerin krom indirgemeye etkisi

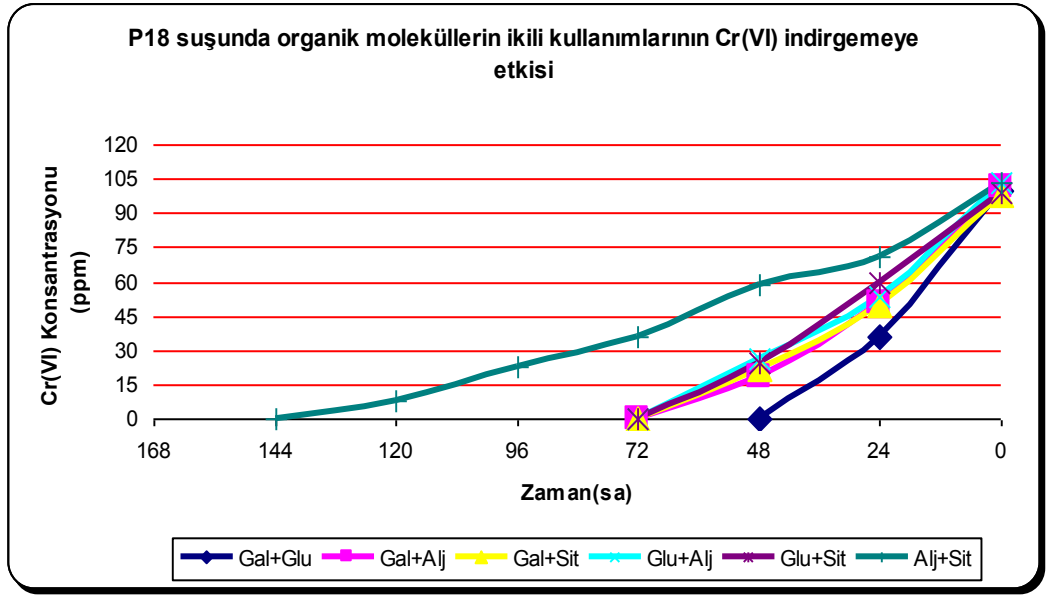
3.7. Organik asitlerin ikili kombinasyonlarının Cr (VI) indirgemeye etkisi

Bu çalışmada farklı organik moleküllerin ikili kullanımlarının krom indirgemesine olan etkilerini incelemek için galakturonik asit, glukuronik asit, sitrik asit ve aljinik asit maddelerinin her birinden 1 g/L olacak biçimde besiyerine ilave edilerek Cr (VI) indirgeme deneyleri hem P18 hem de P22 suşlarının her ikisi için sadece MİK değeri olan (110 ve 25 ppm) krom konsantrasyonlarında çalışılmıştır. Buna göre P18 ve P22 suşu için en yüksek krom konsantrasyonlarında organik moleküllerin ikili etkilerinin Cr (VI) indirgemesine etkileri araştırılmıştır. Krom indirgeme deneyleri, galakturonik+glukuronik, galakturonik+aljinik, galakturonik+sitrik, glukuronik+aljinik, glukuronik+sitrik ve aljinik+sitrik şeklinde organik asitlerin ikili kombinasyonları sağlanarak dizayn edilmiştir. Sonuçlar birbirleri ile karşılaştırılarak organik moleküllerin Cr (VI) indirgemesi üzerine antogonistik mi yoksa sinerjistik bir etki mi gösterdikleri belirlenmiştir. Sonuçlar tablo ve şekillerle ifade edilmiştir.

P18 suşunda 110 ppm krom konsantrasyonunda organik asitlerin tek başlarına etkileri incelendiğinde (Tablo 3.5, Şekil 3.10) galakturonik asitli ve glukuronik asitli ortamda 96. saatte indirgenen yaklaşık 110 ppm krom, organik asitler beraber kullandıklarında bu süre yarı yarıya düşürülerek kromun tamamı 48. saatte sıfırlanmıştır. Sonuçlar Tablo 3.13 ve Şekil 3.18'de gösterilmiştir.

Tablo 3.13: P18 suşunda organik moleküllerin ikili kullanımlarının Cr (VI) indirgemeye etkisi (OD₅₄₀)

Zaman(sa)	Gal+Glu	Gal+Alj	Gal+Sit	Glu+Alj	Glu+Sit	Alj+Sit
0	99,88±0,99	101,86±0,99	97,90±0,99	103,35±0,49	98,88±1,01	103,35±0,49
24	35,53±0,99	50,38±1,98	49,88±1,48	53,35±1,98	59,29±0,00	71,17±0,99
48	0,00±0,00	18,70±0,00	21,67±0,00	26,12±0,40	24,64±1,98	58,79±0,50
72	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	36,02±0,50
96	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	22,66±1,98
120	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	7,81±0,00
144	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

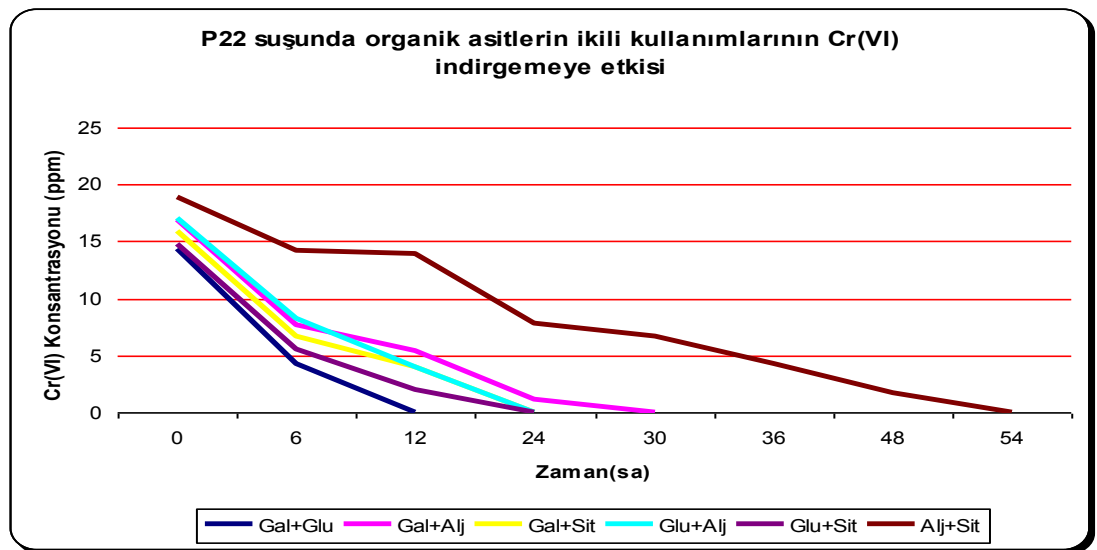


Şekil 3.18: P18 suşunda organik moleküllerin ikili kullanımlarının Cr (VI) indirgemeye etkisi

P22 suşunun galakturonik+glukuronik asitli ortamda krom indirgeme durumları incelenecek olursa, tek başlarına hem galakturonik asitli hem de glukuronik asitli ortamlarda 25 ppm krom konsantrasyonunu 30 saatte indirdikleri (Tablo 3.19 ve Şekil 3.24) dikkate alındığında ikili kullanımları bu süreyi inkübasyon periyodunun 12. saatine çekmiştir. Diğer taraftan galakturonik asitin, sitrik asit ile kullanımı da krom indirgeme süresini kısaltmıştır. 25 ppm krom eklendiğinde tek başlarına galakturonik asitli ortamda 30, sitrik asitli ortamda 36 saat süren krom indirgemesi beraber kullanıldıklarında 24 saate düşmüştür. Başka bir konu ise, galakturonik asitin aljinik asit ile kullanımı krom indirgeme süresini etkilememiştir. Sonuçlar Tablo 3.14 ve Şekil 3.19'da gösterilmiştir.

Tablo 3.14: P22 suşunda organik moleküllerin ikili kullanımlarının Cr (VI) indirgemeye etkisi (OD₅₄₀)

Zaman(sa)	Gal+Glu	Gal+Alj	Gal+Sit	Glu+Alj	Glu+Sit	Alj+Sit
0	14,37±0,00	16,85±0,00	15,95±0,00	17,07±0,22	14,71±0,56	18,87±0,00
6	4,25±0,23	7,62±0,67	6,61±0,56	8,19±0,56	5,6±0,00	14,15±0,45
12	0,00±0,00	5,42±0,50	4,02±0,67	3,91±0,56	2,00±0,00	13,92±0,45
24	0,00±0,00	1,16±0,16	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	7,85±0,45
30	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	6,72±0,57
36	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	4,25±0,55
48	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,77±0,22
54	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00



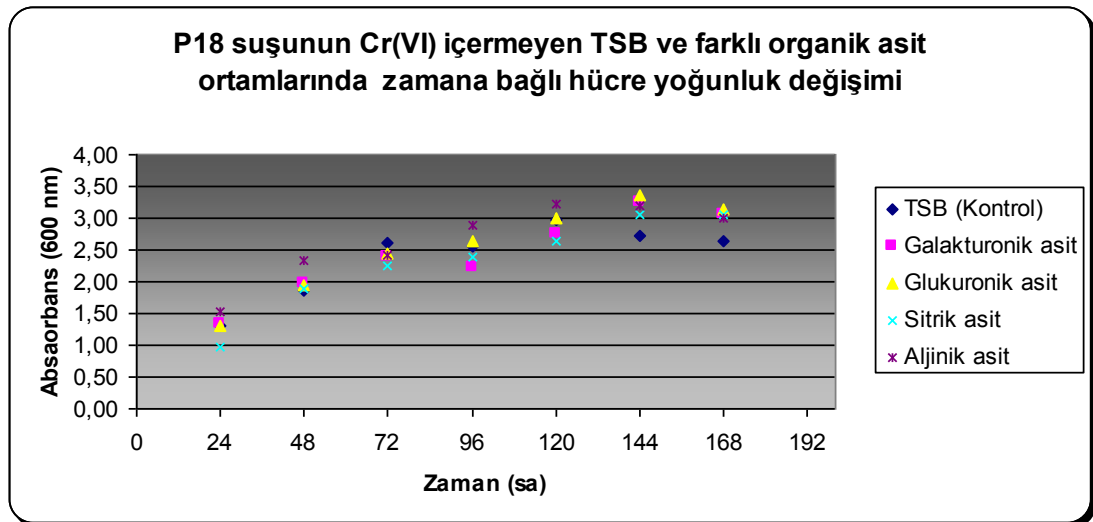
Şekil 3.19: P22 suşunda organik moleküllerin ikili kullanımlarının Cr (VI) indirgemeye etkisi

3.8. Kromun hücre gelişimine toksik etkisi

P18 suşunda, organik asit içermeyen TSB ve farklı organik asitleri içeren kromsuz besi yerleri hücre gelişimi için farklı krom konsantrasyonu denemelerine karşı kontrol gruplarını temsil etmektedirler. Deney gruplarının hücre yoğunlukları spektrofotometrede 600 nm’de ölçülmüştür. Sonuçlar Tablo 3.15’te verilmiştir ve Şekil 3.20’de şekilsel diyagramla ifade edilmiştir.

Tablo 3.15: Cr (VI) içermeyen TSB ve farklı organik asit ortamlarında P18 suşuna ait hücre yoğunlukları (OD₆₀₀)

Zaman (sa.)	TSB (Kontrol)	Galakturonik asit	Glukuronik asit	Sitrik asit	Aljinik asit
24	1,30±0,05	1,34±0,00	1,31±0,02	0,97±0,06	1,52±0,03
48	1,87±0,00	1,97±0,02	1,95±0,03	1,89±0,02	2,32±0,18
72	2,60±0,06	2,40±0,08	2,45±0,13	2,26±0,06	2,41±0,02
96	2,56±0,16	2,22±0,14	2,63±0,08	2,40±0,06	2,88±0,17
120	2,96±0,14	2,75±0,10	3,00±0,05	2,63±0,00	3,21±0,08
144	2,71±0,02	3,25±0,15	3,35±0,07	3,05±0,14	3,20±0,04
168	2,63±0,00	3,06±0,06	3,15±0,13	3,05±0,15	3,01±0,04

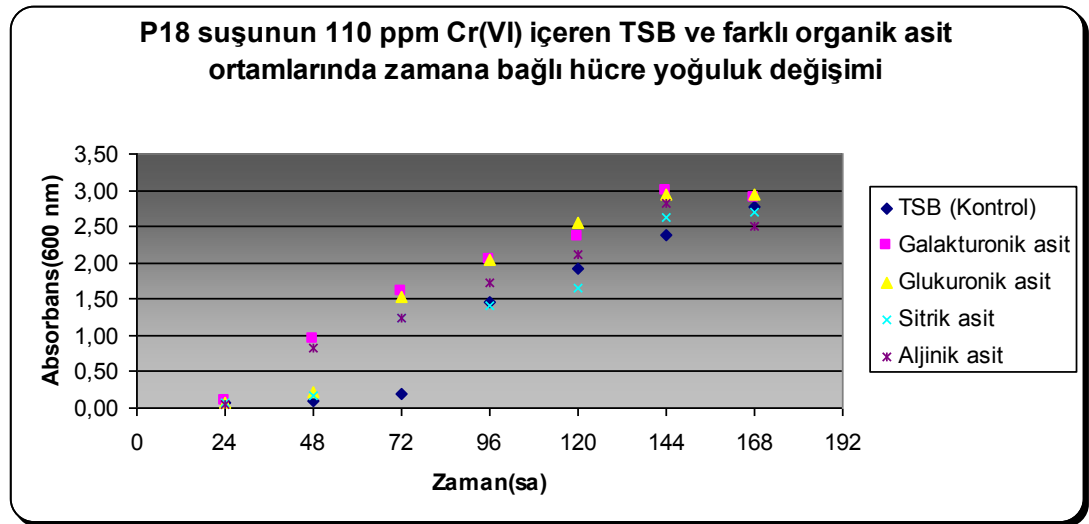


Şekil 3.20: P18 suşunun Cr (VI) içermeyen TSB ve farklı organik asit ortamlarında zamana bağlı hücre yoğunluk değişimi

Aynı besi yeri ortamlarına sadece farklı olarak 110 ppm Cr (VI) ilavesi yapıldığında hücre gelişimlerinde gözlenen değişimler Tablo 3.16'da verilmiştir. Sonuçlar şekil 3.21'de şekilsel diyagramla gösterilmiştir.

Tablo 3.16: 110 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit ortamlarında P18 suşuna ait hücre yoğunlukları (OD_{600})

Zaman (sa.)	TSB (Kontrol)	Galaktronik asit	Glukuronik asit	Sitrik asit	Aljinik asit
24	0,07±0,01	0,09±0,01	0,08±0,01	0,07±0,01	0,06±0,00
48	0,10±0,01	0,94±0,02	0,23±0,03	0,18±0,00	0,82±0,02
72	0,19±0,04	1,60±0,02	1,53±0,04	1,23±0,07	1,24±0,01
96	1,47±0,11	2,05±0,08	2,03±0,05	1,40±0,01	1,73±0,01
120	1,93±0,05	2,35±0,25	2,55±0,13	1,65±0,02	2,12±0,12
144	2,37±0,12	2,98±0,12	2,93±0,11	2,62±0,05	2,82±0,00
168	2,76±0,23	2,90±0,10	2,95±0,15	2,71±0,07	2,50±0,00

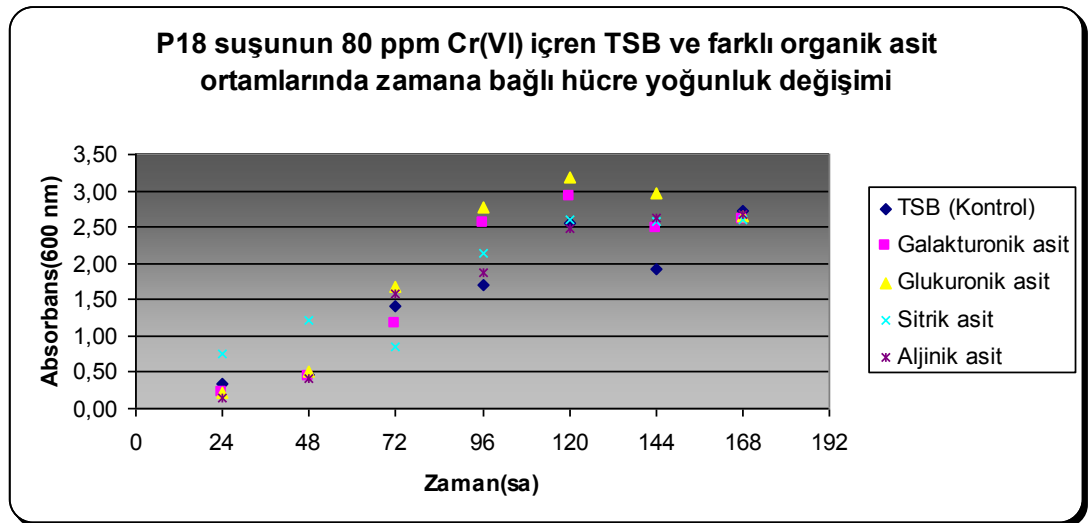


Şekil 3.21: P18 suşunun 110 ppm Cr (VI) içeren TSB ve farklı organik asit ortamlarında zamana bağlı hücre yoğunluk değişimi

Başlangıç krom konsantrasyonlarının bakteri hücre gelişimleri üzerine etkilerinin olup olmadığını anlamak adına krom konsantrasyonlarını azaltma yoluna gidilmiştir. Bunun için aynı besi yeri ortamlarına sadece 80 ppm Cr(VI) konsantrasyonu ilavesi yapılarak, bu konsantrasyonun TSB ve organik asitli ortamlarda hücre gelişimleri gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.17’de verilmiştir ve Şekil 3.22’de şekilsel diyagramla gösterilmiştir.

Tablo 3.17: 80 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit ortamlarında P18 suşuna ait hücre yoğunlukları (OD₆₀₀)

Zaman (sa.)	TSB (Kontrol)	Galaktronik asit	Glukuronik asit	Sitrik asit	Aljinik asit
24	0,35±0,05	0,21±0,04	0,23±0,02	0,76±0,20	0,14±0,01
48	0,45±0,02	0,43±0,01	0,52±0,03	1,22±0,06	0,41±0,03
72	1,41±0,01	1,17±0,18	1,68±0,04	0,84±0,10	1,59±0,15
96	1,69±0,04	2,54±0,23	2,76±0,10	2,13±0,07	1,88±0,13
120	2,54±0,43	2,91±0,04	3,19±0,09	2,61±0,40	2,47±0,09
144	1,91±0,21	2,47±0,15	2,96±0,19	2,58±0,08	2,63±0,04
168	2,72±0,06	2,61±0,03	2,65±0,09	2,60±0,18	2,68±0,24

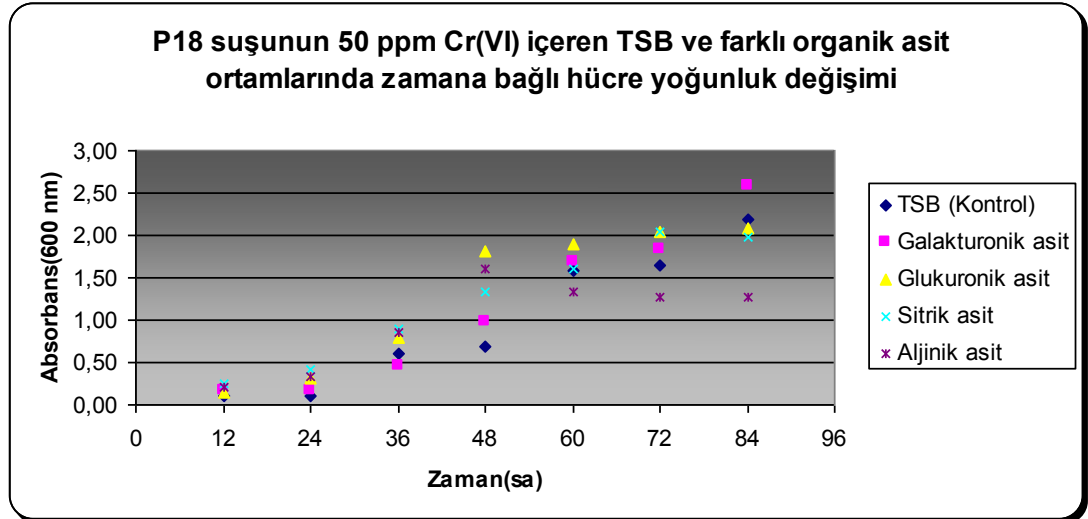


Şekil 3.22: P18 suşunun 80 ppm Cr (VI) içeren TSB ve farklı organik asit ortamlarında zamana bağlı hücre yoğunluk değişimi

Yine aynı besi ortamlarına bu kez 50 ppm konsantrasyonunda Cr (VI) ilavesi yapılmıştır. 110 ppm ve 80 ppm konsantrasyon denemelerine bağlı olarak krom konsantrasyonu azaltıldıkça hücre gelişimlerinin de buna zıt yönde arttığını söyleyebiliriz. 50 ppm krom konsantrasyonu içinde yapılan denemeler sonunda elde edilen sonuçlar Tablo 3.18’de verilerek, Şekil 3. 23’te şematize edilmiştir.

Tablo 3.18: 50 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit ortamlarında P18 suşuna ait hücre yoğunlukları (OD_{600})

Zaman (sa.)	TSB (Kontrol)	Galaktronik asit	Glukuronik asit	Sitrik asit	Aljinik asit
12	0,11±0,00	0,17±0,01	0,15±0,00	0,25±0,01	0,20±0,01
24	0,11±0,00	0,17±0,01	0,31±0,16	0,41±0,14	0,34±0,14
36	0,61±0,49	0,45±0,12	0,79±0,08	0,89±0,41	0,85±0,13
48	0,69±0,57	0,98±0,07	1,81±0,36	1,33±0,01	1,60±0,54
60	1,59±0,09	1,68±0,07	1,90±0,55	1,60±0,23	1,33±0,11
72	1,65±0,09	1,84±0,03	2,05±0,39	2,05±0,35	1,28±0,13
84	2,19±0,08	2,58±0,03	2,09±0,06	1,97±0,12	1,27±0,13

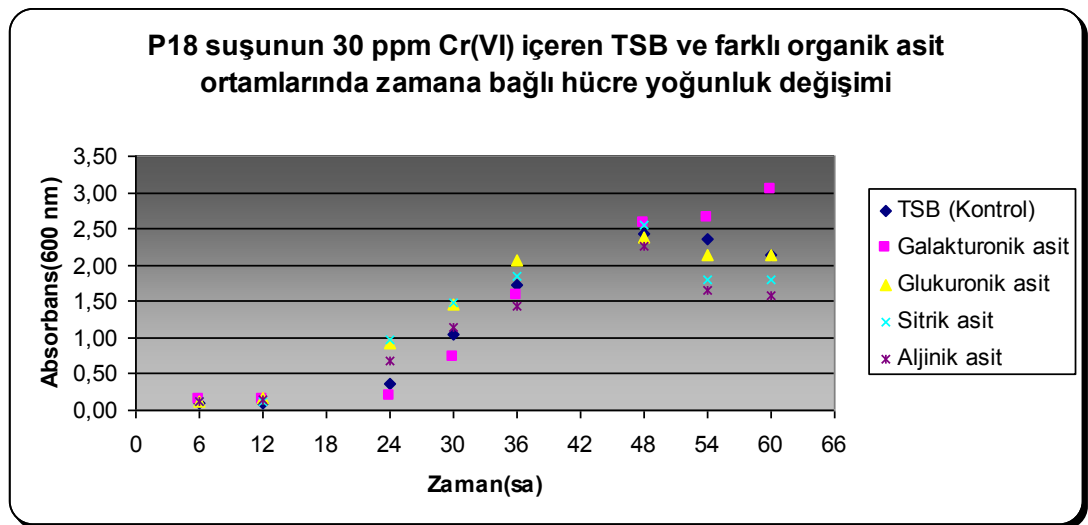


Şekil 3.23: P18 suşunun 50 ppm Cr (VI) içeren TSB ve farklı organik asit ortamlarında zamana bağlı hücre yoğunluk değişimi

P18 suşu için son olarak denediğimiz 30 ppm krom konsantrasyonunun hücre gelişimleri üzerine etkisi incelenmiş ve sonuçlar Tablo 3.19’da verilmiş olup ayrıca Şekil 3.24’te şekille şematize edilmiştir. Daha önce yapılan 110, 80 ve 50 ppm krom konsantrasyonlarına göre, krom konsantrasyonunun azaltılması ile hücre gelişimleri büyük oranda bu durumdan etkilenmiştir. Total inkübasyon süresi, krom indirgeme deneyleri de dikkate alınarak 60 saate düşmüştür. Hücrelerin ortamda bulunan 30 ppm kroma olan toleransları, 24 saatlik bir adaptasyon sürecini aşmayı gerektirmiştir. 24.saatten sonra hücreler normal aktif yaşam süreçlerine ancak ulaşmışlardır. Fakat bu süreç diğer konsantrasyon denemelerine göre daha da kısalmıştır.

Tablo 3.19: 30 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit ortamlarında P18 suşuna ait hücre yoğunlukları (OD_{600})

Zaman (sa)	TSB (Kontrol)	Galakturonik asit	Glukuronik asit	Sitrik asit	Aljinik Asit
6	0,09±0,02	0,15±0,04	0,13±0,03	0,11±0,00	0,13±0,01
12	0,10±0,00	0,15±0,04	0,17±0,02	0,13±0,01	0,15±0,01
24	0,37±0,05	0,19±0,00	0,93±0,09	0,98±0,07	0,68±0,04
30	1,05±0,03	0,74±0,06	1,45±0,15	1,48±0,02	1,14±0,03
36	1,72±0,01	1,58±0,06	2,06±0,04	1,85±0,01	1,44±0,10
48	2,44±0,04	2,58±0,25	2,39±0,26	2,55±0,19	2,25±0,19
54	2,35±0,05	2,64±0,26	2,14±0,51	1,80±0,03	1,66±0,06
60	2,15±0,05	3,05±0,31	2,14±0,55	1,80±0,03	1,59±0,05

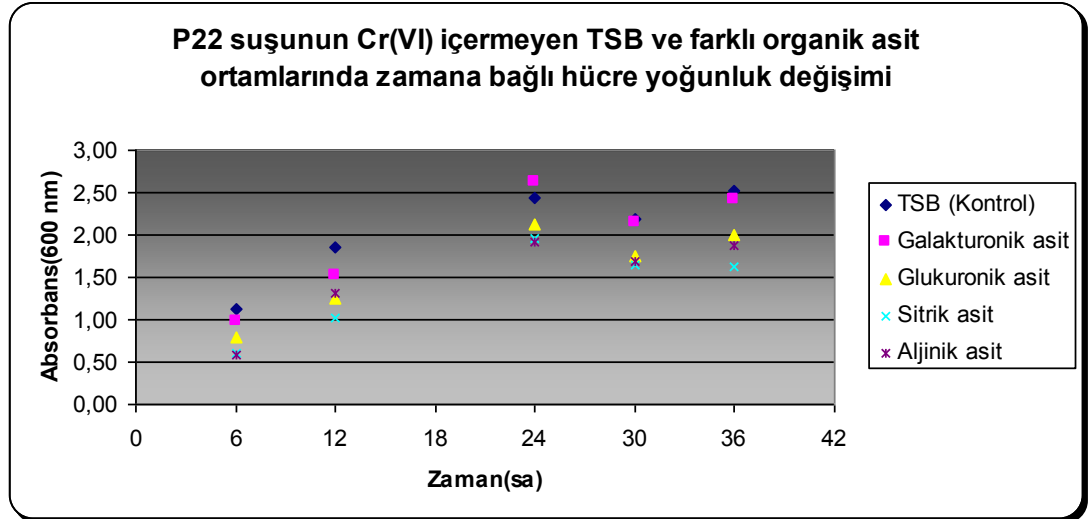


Şekil 3.24: P18 suşunun 30 ppm Cr (VI) içeren TSB ve farklı organik asit ortamlarında zamana bağlı hücre yoğunluk değişimi

P22 suşu ile kromsuz ortamda TSB ve organik moleküller için yapılan hücre gelişim denemelerinden elde edilen sonuçlar Tablo 3.20’de ve Şekil 3.25’te verilmiştir. Genel olarak P18 suşu için yapılan deneme sonuçları ile paralel bir korelasyon gözlenmektedir. Fakat suşların farklılığı, inkübasyon süresi ve periyotlarını da dikkate alırsak, değişken sonuçlar gözlenmesi olasıdır. Organik moleküller hücre yoğunluğu üzerine TSB ortamına göre çok fazla etki etmemişlerdir.

Tablo 3.20: Cr (VI) içermeyen TSB ve farklı organik asit ortamlarında P22 suşuna ait hücre yoğunlukları (OD_{600})

Zaman (sa)	TSB (Kontrol)	Galakturonik asit	Glukuronik asit	Sitrik asit	Aljinik asit
6	1,12±0,12	0,97±0,01	0,80±0,00	0,60±0,05	0,58±0,06
12	1,85±0,31	1,52±0,06	1,24±0,32	1,03±0,05	1,31±0,09
24	2,43±0,19	2,63±0,01	2,12±0,28	1,95±0,06	1,91±0,09
30	2,19±0,27	2,14±0,02	1,75±0,25	1,64±0,14	1,68±0,08
36	2,53±0,38	2,41±0,15	2,01±0,29	1,63±0,09	1,87±0,07

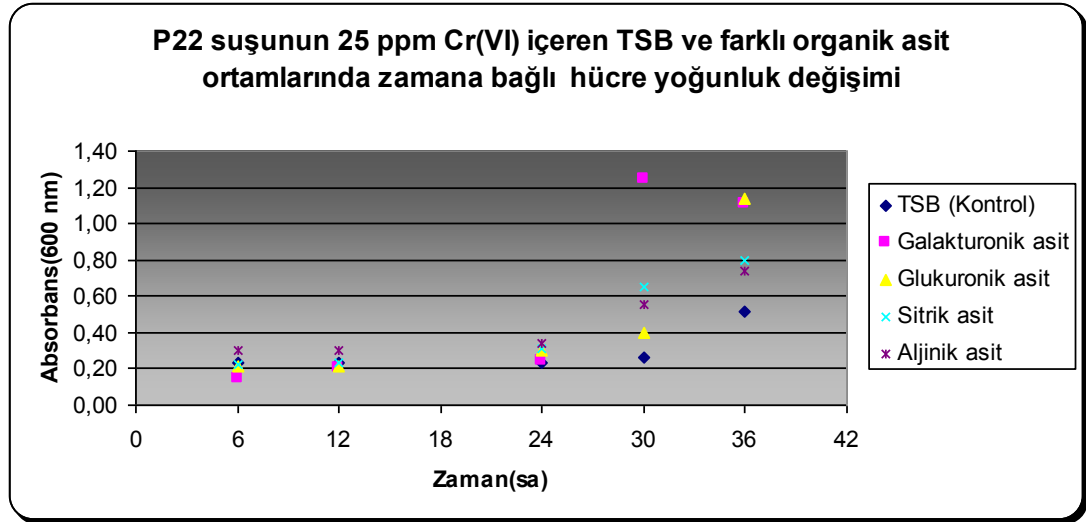


Şekil 3.25: P22 suşunun Cr (VI) içermeyen TSB ve farklı organik asit ortamlarında zamana bağlı hücre yoğunluk değişimi

P22 suşu için yapılan denemelerde en yüksek konsantrasyon olarak ilk etapta bakterinin MİK'i olan 25 ppm krom konsantrasyonu kullanılarak hücre gelişimleri gözlenmiştir. Sonuçlar Tablo 3.21'de verilmiştir. Ayrıca şema olarak da Şekil 3.26'da gösterilmiştir.

Tablo 3.21: 25 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit ortamlarında P22 suşuna ait hücre yoğunlukları (OD_{600})

Zaman (sa.)	TSB (Kontrol)	Galaktronik asit	Glukuronik asit	Sitrik asit	Aljinik asit
6	0,23±0,05	0,15±0,02	0,21±0,01	0,22±0,02	0,30±0,01
12	0,23±0,05	0,20±0,03	0,21±0,01	0,23±0,01	0,30±0,01
24	0,23±0,05	0,24±0,04	0,30±0,00	0,31±0,01	0,34±0,02
30	0,26±0,04	1,24±0,14	0,40±0,05	0,65±0,07	0,55±0,06
36	0,52±0,04	1,11±0,11	1,14±0,05	0,80±0,02	0,74±0,04

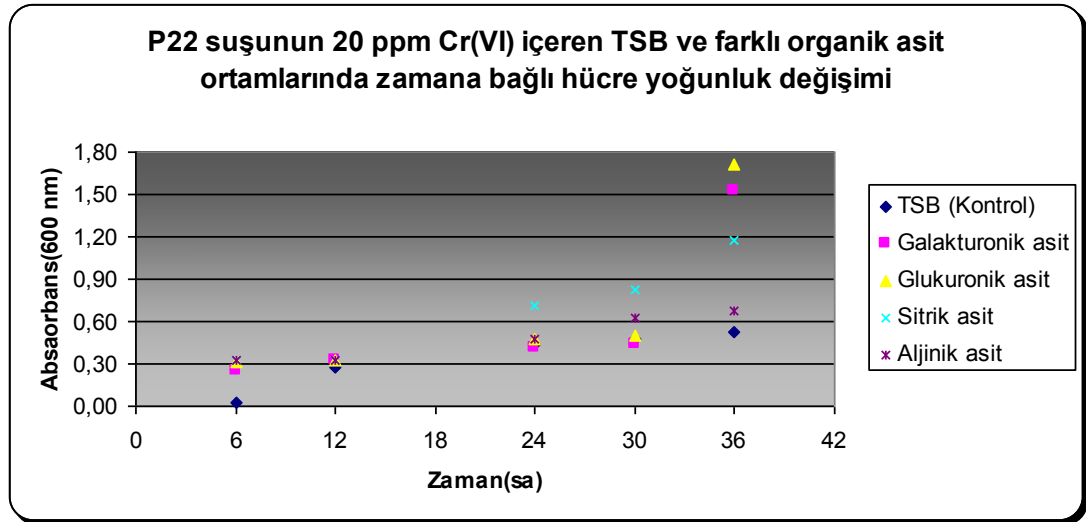


Şekil 3.26: P18 suşunun 25 ppm Cr (VI) içeren TSB ve farklı organik asit ortamlarında zamana bağlı hücre yoğunluk değişimi

20 ppm krom kullanıldığında ise hücre gelişimindeki değişim 25 ppm krom kullanımından pek farklı olmamıştır. Bakteriler inkübasyon sürelerinin başında yine kroma karşı bir adaptasyon süreci geçirmişlerdir. Bu süreci ancak 30 ve 36. saatlerden sonra aşmışlardır. Galakturonik ve glukuronik asitin yanı sıra bu kez sitrik asit ve aljinik asitli ortamlardaki hücreler inkübasyon periyodu sonunda TSB ortamı hücrelerine fark atmışlardır. Sonuçlar Tablo 3.22’de verilmiştir, Şekil 3.13’te şematize edilmiştir.

Tablo 3.22: 20 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit ortamlarında P22 suşuna ait hücre yoğunlukları (OD₆₀₀)

Zaman (sa)	TSB (Kontrol)	Galakturonik asit	Glukuronik asit	Sitrik asit	Aljinik asit
6	0,02±0,00	0,25±0,01	0,31±0,00	0,32±0,00	0,33±0,00
12	0,28±0,02	0,33±0,07	0,33±0,00	0,32±0,00	0,33±0,01
24	0,44±0,05	0,41±0,01	0,47±0,05	0,71±0,30	0,47±0,05
30	0,47±0,04	0,44±0,02	0,50±0,06	0,83±0,27	0,63±0,01
36	0,52±0,04	1,53±0,09	1,71±0,03	1,17±0,49	0,67±0,01

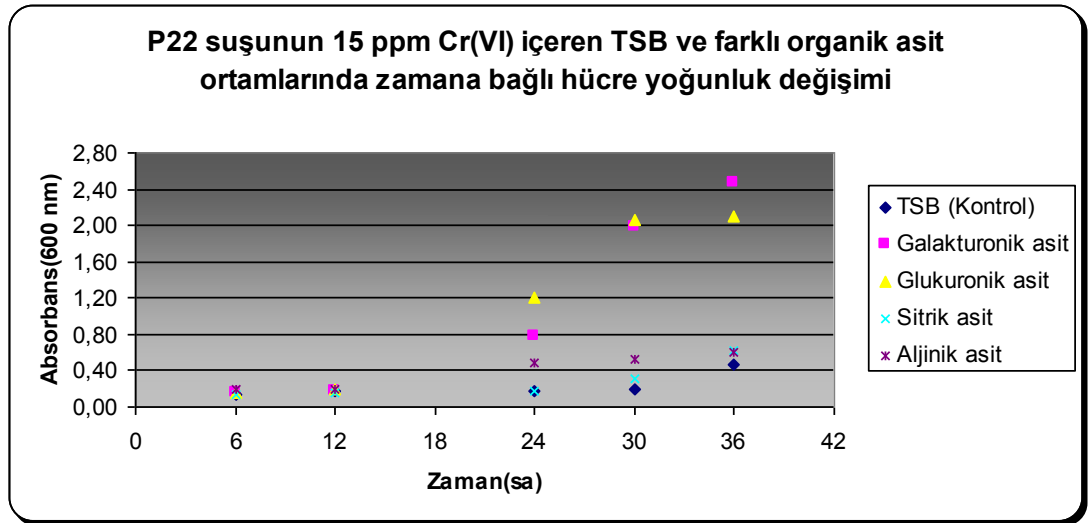


Şekil 3.27: P22 suşunun 20 ppm Cr (VI) içeren TSB ve farklı organik asit ortamlarında zamana bağlı hücre yoğunluk değişimi

15 ppm'lik krom denemelerinde 25 ve 20 ppm krom konsantrasyonlarına göre ortamlardaki hücre gelişim düzeyleri galakturonik ve glukuronik asitli ortamlarda gözle görülür bir artış söz konusu iken, TSB, ve aljinik asitli ortamlarda çok fazla bir değişim söz konusu olmamıştır. Sonuçlar Tablo 3.23'te gösterilmiştir. Şekil 3.28'de şekilsel dizaynı da mevcuttur.

Tablo 3.23: 15 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit ortamlarında P22 suşuna ait hücre yoğunlukları (OD_{600})

Zaman (sa)	TSB (Kontrol)	Galaktronik asit	Glukuronik asit	Sitrik asit	Aljinik asit
6	0,14±0,01	0,16±0,00	0,16±0,00	0,13±0,01	0,20±0,01
12	0,17±0,02	0,18±0,00	0,20±0,00	0,15±0,01	0,20±0,01
24	0,17±0,02	0,77±0,17	1,20±0,12	0,17±0,01	0,49±0,06
30	0,20±0,00	1,99±0,11	2,07±0,09	0,32±0,01	0,52±0,03
36	0,47±0,01	2,46±0,14	2,10±0,04	0,63±0,01	0,60±0,02

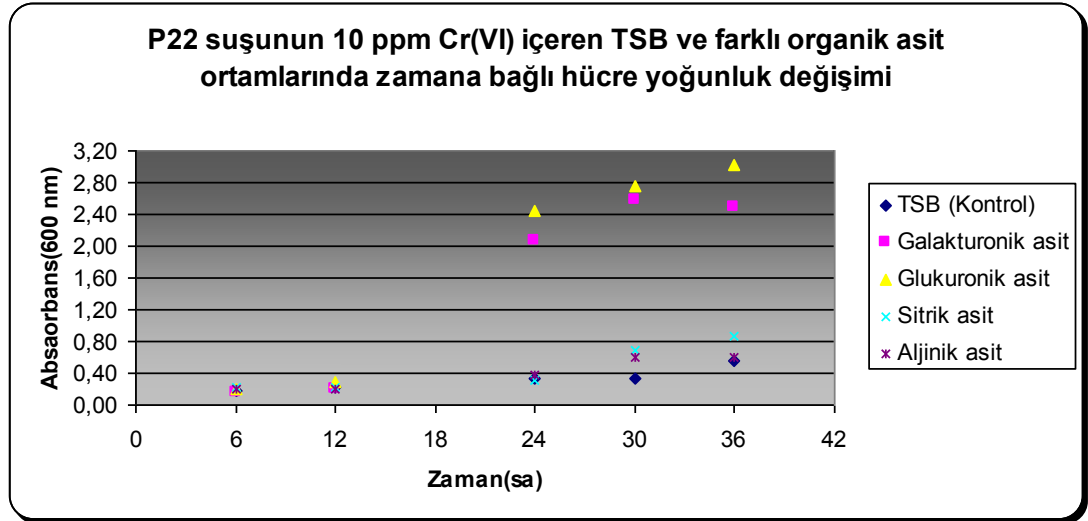


Şekil 3.28: P22 suşunun 15 ppm Cr (VI) içeren TSB ve farklı organik asit ortamlarında zamana bağlı hücre yoğunluk değişimi

Başlangıç krom konsantrasyonu 10 ppm olduğunda, kromun hücre gelişimine toksik etkisi incelendiğinde, kontrole kıyasla organik asit içeren ortamlarda çok daha iyi bir gelişme gösterdiği tespit edilmiştir. Elektron vericisi olarak galakturonik asit ve glukuronik asit kullanıldığında, kromun toksik etkisinin minimum seviyede olduğu görülmüştür. Sonuçlar Tablo 3.24 ve Şekil 3.29’da verilmiştir.

Tablo 3.24: 10 ppm Cr (VI) ilavesi yapılan TSB ve farklı organik asit ortamlarında P22 suşuna ait hücre yoğunlukları (OD_{600})

Zaman (sa.)	TSB (Kontrol)	Galakturonik asit	Glukuronik asit	Sitrik asit	Aljinik asit
6	0,17±0,01	0,15±0,01	0,19±0,00	0,22±0,01	0,19±0,00
12	0,23±0,04	0,20±0,00	0,29±0,01	0,22±0,01	0,20±0,00
24	0,33±0,02	2,06±0,14	2,45±0,20	0,32±0,00	0,37±0,01
30	0,33±0,01	2,58±0,22	2,75±0,12	0,70±0,20	0,60±0,05
36	0,56±0,02	2,48±0,34	3,03±0,22	0,86±0,24	0,60±0,55



Şekil 3.29: P22 suşunun 10 ppm Cr (VI) içeren TSB ve farklı organik asit ortamlarında zamana bağlı hücre yoğunluk değişimi

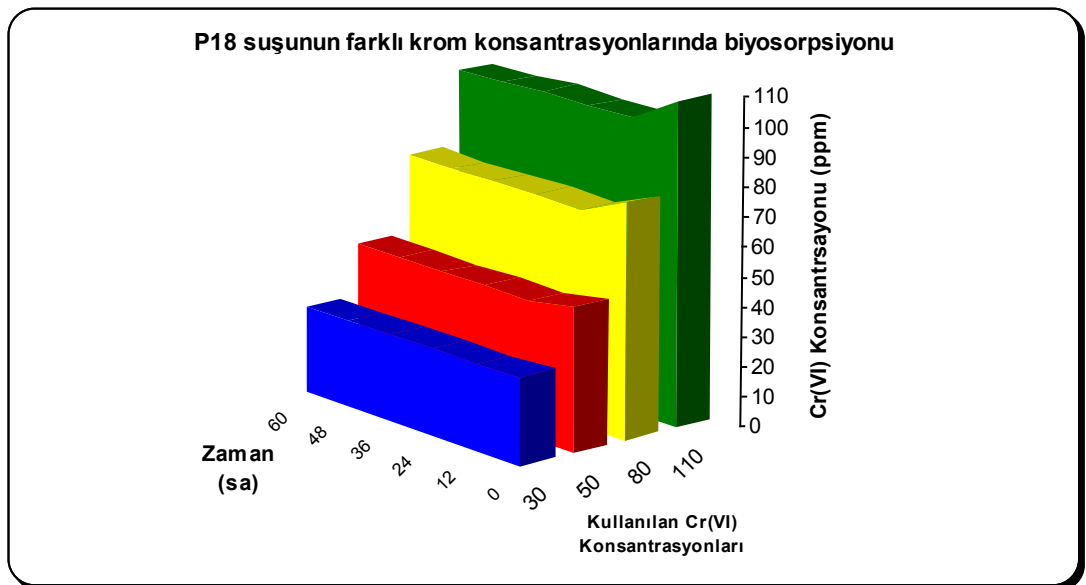
3.9. Biyosorpsiyon

Biyosorpsiyon deneylerinde hem P18 suşu için hem de P22 suşu için daha önce krom indirgeme deneylerinde kullanılan bütün krom konsantrasyonları için yapılmıştır. Bu konsantrasyonlar sırası ile P18 suşu için 110, 80, 50 ve 30 ppm, P22 suşu için 25, 20, 15 ve 10 ppm krom konsantrasyonlarıdır.

Deney sonuçlarına göre, P18 suşunun kurutulmuş ölü hücreleri ilk 12 saatlik inkübasyon periyodunda 110 ppm krom konsantrasyonunda % 9.06, 80 ppm krom konsantrasyonunda % 8.19, 50 ppm krom konsantrasyonunda % 5.98, 30 ppm krom konsantrasyonunda ise % 2.27 oranında Cr (VI) biyosorplamışlardır. Çalışmanın ilerleyen saatlerinde krom miktarında herhangi bir azalma olmadığı ve biyosorpsiyonun durduğu gözlenmiştir. Sonuçlar Tablo 3.25 ve Şekil 3.30'da gösterilmiştir.

Tablo 3.25: P18 suşunda farklı konsantrasyonlarda Cr (VI) biyosorpsiyonu (OD₅₄₀)

Zaman(sa)	30 ppm	50 ppm	80 ppm	110 ppm
0	29,53±0,14	48,77±0,23	79,12±0,72	109,28±0,50
12	28,86±0,27	45,85±2,25	72,64±2,88	99,38±0,50
24	29,13±0,00	46,75±1,80	73,36±2,16	99,38±1,49
36	28,86±0,27	46,30±1,35	73,36±2,16	100,37±0,00
48	28,89±0,24	46,82±1,28	73,00±1,80	99,38±0,49
60	28,86±0,00	46,82±1,28	74,08±1,44	99,39±0,50

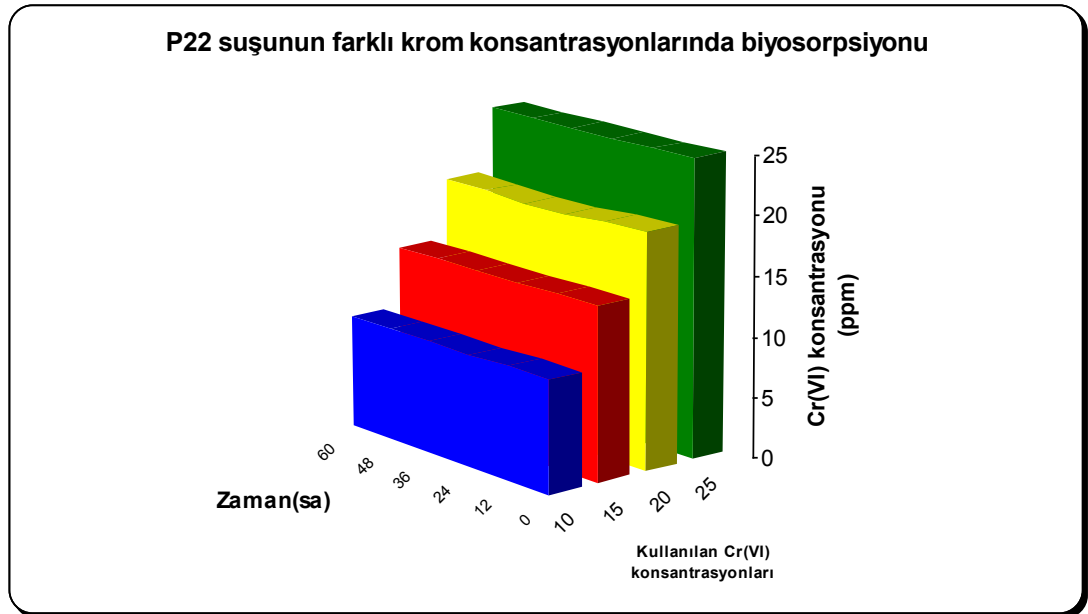


Şekil 3.30: P18 suşunun 30, 50, 80 ve 110 ppm Cr (VI) konsantrasyonlarında biyosorpsiyonu

P22 suşunun kurutulmuş ölü hücreleri ise 60 saatlik inkübasyon periyodunda 25 ppm krom konsantrasyonunda % 1.33, 20 ppm krom konsantrasyonunda % 1.84, 15 ppm krom konsantrasyonunda % 4.82, 10 ppm krom konsantrasyonunda ise % 0.95 oranında Cr (VI) biyosorplamışlardır. Daha sonra krom miktarında herhangi bir azalma olmadığı ve biyosorpsiyonun durduğu gözlenmiştir. Sonuçlar Tablo 3.26 ve Şekil 3.31’de gösterilmiştir.

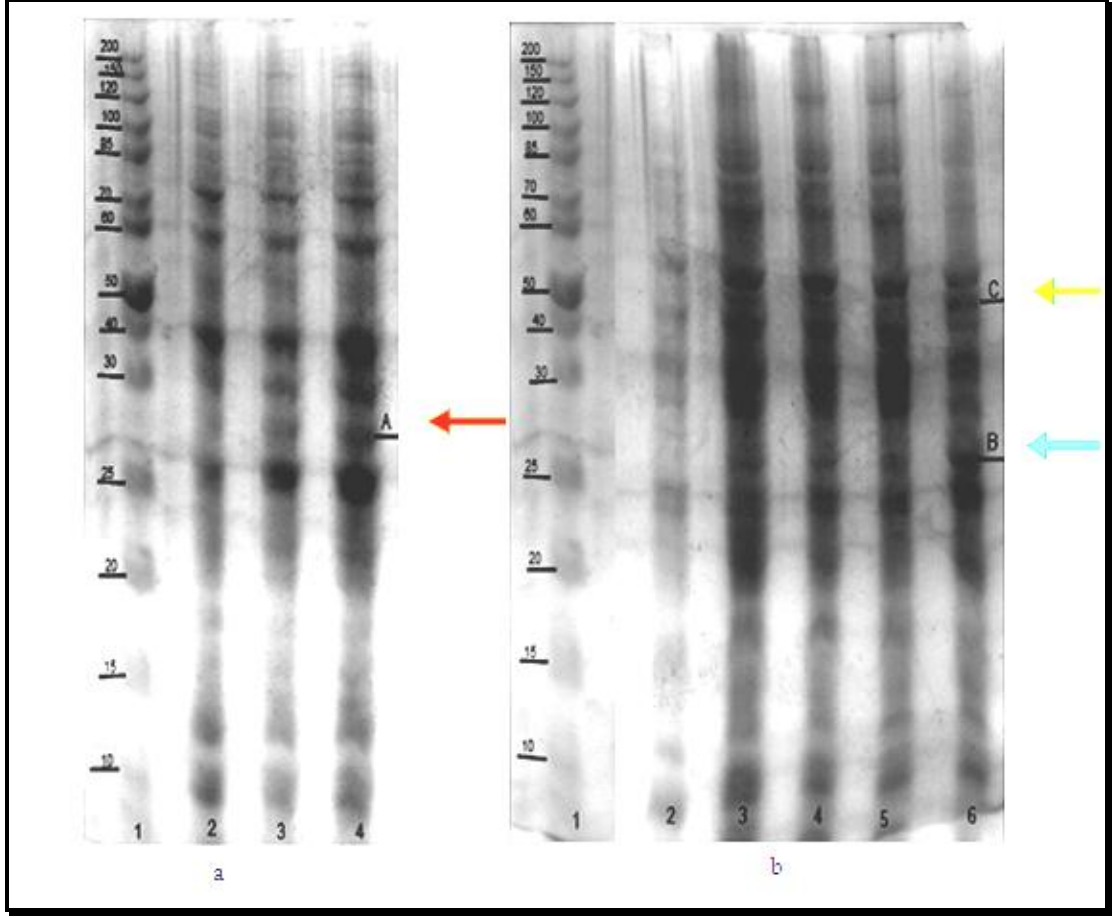
Tablo 3.26: P22 suşunda farklı konsantrasyonlarda Cr (VI) biyosorpsiyonu (OD₅₄₀)

Zaman(sa)	10 ppm	15 ppm	20 ppm	25 ppm
0	9,44±0,09	14,50±0,03	19,60±0,18	24,83±0,11
12	9,44±0,09	14,43±0,13	19,51±0,09	24,72±0,00
24	9,30±0,04	14,30±0,14	19,15±0,09	24,61±0,11
36	9,35±0,09	14,30±0,00	19,06±0,18	24,61±0,11
48	9,35±0,00	14,30±0,13	19,24±0,00	24,50±0,00
60	9,35±0,00	14,30±0,13	19,24±0,00	24,50±0,00



Şekil 3.31: P22 suşunun 10, 15, 20 ve 25 ppm Cr (VI) konsantrasyonlarında biyosorpsiyonu

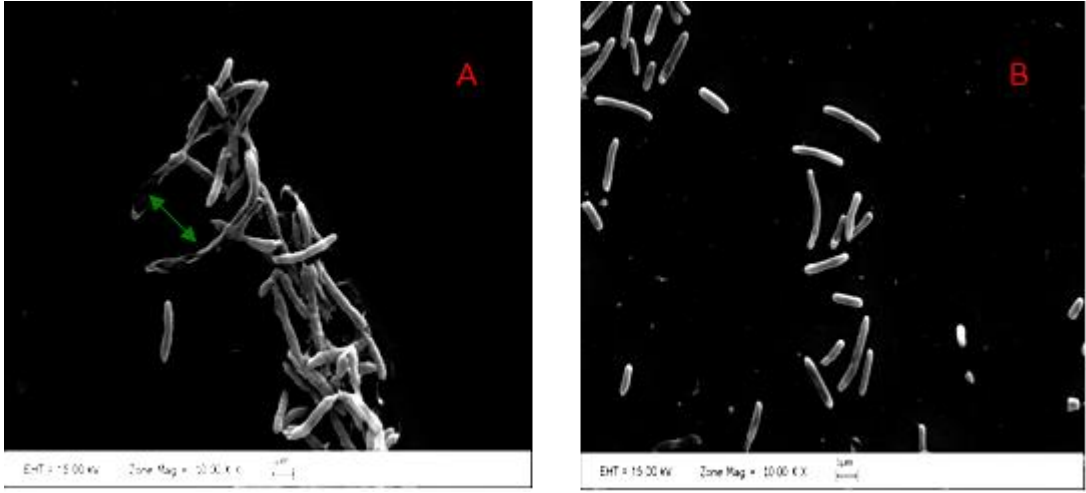
3.10. Elektroforez



Şekil 3.32. a: *P. 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); b: *P. 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 DS0601-FX-P22 ve PASS3-P18 suşlarının periplazmik protein profillerinin SDS-PAGE görünümleri Şekil 3.32’de verilmiştir. Şekil 3.32a’da P22 suşunda kromat redüktaz olabilecek tek bir protein bandı bulunmuştur. Bu protein bandının moleküler ağırlığı yaklaşık 31 kDa olarak hesaplanmıştır. *P. mendocina* PASS3-P18 de kromat redüktaz enzimi olabileceğini düşündüğümüz iki ayrı protein bandı gözlenmiştir. Bu protein bantlarından biri yaklaşık olarak 29 kDa büyüklüğünde iken diğer bandın moleküler büyüklüğü yaklaşık olarak 52 kDa’dur.

3.11. Scanning Elektron Mikroskop Görüntüleri



Şekil 3.33: A) *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 suşunun 110 ppm kromlu ortamdaki görüntüsü, B) Kromsuz ortamdaki görüntüsü

Her iki ortamdaki hücreler dikkatle incelendiğinde kromlu ortamdaki hücrelerin daha uzun ve genişlemiş olduğu ve şekillerinde bir dejenerasyon olduğu açıkça görülebilmektedir. Kromsuz ortamda gelişen hücreler daha parlak, düzgün ve klasik basil şekillerini korurken, 110 ppm krom içeren ortamda gelişen hücreler kromun toksik etkisinden dolayı tahriş olmuş, parçalanmış ve ipliksi bir görünüm almışlardır.

4. TARTIŞMA

Mikrobiyal krom indirgememesinin, mikroorganizmaların fermentasyon şartlarının geliştirilmesiyle doğrudan ilişkisi vardır. Diğer taraftan da seçilen mikroorganizmaların kapasitesinin araştırılması gerekmektedir. Endüstriyel çalışmalarda biyolojik proseslerin iyileştirilmesi temel teşkil etmektedir. Bu da, kromu indirgeme yeteneğine sahip mikroorganizmalarda verimin artırılması, kromu indirgeyen yeni mikroorganizmaların seçilmesi ya da krom indirgeme yeteneği bilinen mikroorganizmaların özelliklerinin iyileştirilmesi ile sağlanmaktadır. Bu amaçla, optimum şartlar araştırılmaktadır.

Literatür ışığı altında Cr (VI) indirgemesi üzerine çeşitli faktörlerin etkilerini araştırmak üzere yapılan bu çalışmada Pamukkale Üniversitesi Bakteriyoloji laboratuvarı kültür stoklarından temin edilen 12 adet bakteri kullanılmıştır. Bakterilerin tür seviyesinde tespit ve tanımlanması günümüzde de yaygın bir genotipik yöntem olan 16S rRNA analizi ile yapılmıştır. Bu analiz sonunda 12 adet bakterinin 3'ünün *Enterobacter cancerogenus*, 4'ünün *Pseudomonas mendocina*, 1'inin *Exiguobacterium aurantiacum*, 2'sinin *Pseudomonas stutzeri*, ve 2 tanesinin de *Enterobacter cloacae* olduğu görülmüştür. Bu suşların Cr (VI) indirgeme yetenekleri belirlenmiş ve farklı organik asitlerin krom indirgeme özelliklerine olan etkilerinin anlaşılabilmesi için bazı kültürel parametreler optimize edilmiştir. Bu bağlamda, bakteriyel krom indirgeme sürecine pH'nın etkisi, farklı krom konsantrasyonu ve farklı organik asitlerin tek başlarına ve ikili kombinasyonlarının etkileri araştırılmıştır. Diğer yandan bakterilerin krom indirgemesi yapıp yapmadıklarını kanıtlamak için ayrıca ölü bakteri hücreleri ile farklı krom konsantrasyonlarında biyosorpsiyon kapasiteleri de araştırılmıştır. Ayrıca bakterilerin değişik krom konsantrasyonları ile muameleleri sonucunda indüklenmiş olan kromat redüktazların varlığını kanıtlamak için SDS-PAGE protein profilleri yapılmış ve kromun bakteri hücreleri üzerinde negatif etkilerinin somut görüntüleri SEM ile çekilmiştir.

4.1. Krom İndirgeme deneyleri için suşların seçimi

İki bakterinin DNA baz dizi analizleri birbirleri ile karşılaştırıldığında dikkate değer farklar olduğu görülmüştür. Şekil 3.4'te (bkz s: 58) görüldüğü gibi bakterilerin birbirlerinden farklı olan baz dizileri kırmızı renk ve eksik olan baz dizileri de soru işareti (?) ile gösterilmiştir. Her iki bakteri de farklı başlangıç bölgelerine sahip olup, *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 suşunda 59 baz çifti farklı iken, diğer 771 baz çifti ise *Pseudomonas mendocina* DS 0601-FX-P22 suşu ile aynıdır. *Pseudomonas mendocina* strain DS 0601-FX-P22 suşu ise ek olarak 162 farklı baz çiftine sahiptir. Neticede bakterilerin farklı MİK değerlerine sahip olmaları genetik olarak bu farklı bölge ve dizilere sahip olmalarından kaynaklı olabilir. Hangi gen bölgelerinin krom indirgeme ile ilgili olup olmadığını anlamak için ayrıca moleküler genetik çalışmaları yapılmalıdır.

4.2. Krom İndirgemeye pH'nın Etkisi

Bakteriyal krom indirgemesinin pH, sıcaklık, hücre inokülasyon miktarı, krom konsantrasyonu ve organik substratlar gibi çok sayıda faktörle ilişkili olduğu bilinmektedir. Özellikle kültür başlangıç pH'sının krom indirgeme üzerine önemi çok fazla olup bakteriyel krom indirgemesini etkilemektedir. Bir çok araştırmacı, sıklıkla krom indirgemede bakterilerin optimum pH değerlerini araştırmış ve araştırmaya devam etmektedirler. Cheng ve Li (2009) yaptıkları bir çalışmada, *Bacillus* sp. MDS05 suşunun kromu indirgeyebilmek için optimum pH'sını 7.0–9.0 aralığında tuttuğunu, maksimum krom indirgemesini pH=8'de gerçekleştirdiğini bildirmektedirler. Aynı araştırmacılar bakterinin ekstrem pH değerlerinde (5.0, 6.0 ve 10.0) krom indirgeme oranının sınırlandığını da belirtmişlerdir. Camargo ve diğ., (2003a) de kroma dirençli toprak bakterilerinde optimal pH'nın 7.0–8.0 aralığında olduğunu rapor etmişlerdir. Wang ve Xiao, (1995) çalışmalarında *Bacillus* sp. ve *Pseudomonas fluorescens*'de krom indirgemesi için optimum pH'yı 7.0 olarak bulmuş ve bakterilerin krom indirgemelerinin pH 6.0'da inhibe olduğunu söylemektedirler. *Bacillus* sp. XW4 ve bir gram pozitif izolatta optimum başlangıç pH'sı ise 9'dur (Liu ve diğ., 2004; Shakoori ve diğ., 2000). *Bacillus coagulans*'ta ise optimum pH 7.0'dir (Philip ve diğ., 1998). Bu optimal pH derecelerindeki değişiklik de, kromun detoksifikasyonunda maksimum Cr (VI) indirgemeye ulaşılabilmesi için

farklı kültürlerde optimum pH derecesinin belirlenerek, krom indirgeme için pH modifikasyonunun yapılmasının önemli olduğunu göstermektedir.

Bu bağlamda, yapılan çalışmada ilk aşama olarak izolatların en iyi krom indirgedikleri pH dereceleri belirlenerek krom indirgeme deneyleri için en uygun pH değerleri seçilmiştir. Bu amaçla Cr (VI) giderimi üzerine pH değişiminin etkisi pH 6.0, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 ve 9.5 aralığında hazırlanan besiyerleri ve en yüksek krom konsantrasyonları 110 ve 25 ppm kullanılarak araştırılmıştır. Besiyerlerinin pH'ları tampon kullanılarak sabitlenmiştir (Tablo 3.3, 3.4; Şekil 3.6, 3.7; bkz s: 60, 61).

Çalışma sonunda elde edilen sonuçlara göre, *Pseudomonas mendocina* PASS3-P18 suşu 110 ppm Cr (VI) 'u pH 7.0'de inkübasyonun 144. saatinde sıfırlamıştır. P18 suşu için krom indirgeme sürecinde en uygun pH olarak kabul edilen pH 7.0'de bakteri hücreleri kromun toksik etkisinden dolayı ancak 72. saatte kroma karşı geliştirdikleri adaptasyonla bu negatif etkiyi atlatarak hücre yoğunluğu ortalama 0.93 absorbansa ulaşmıştır. Diğer pH aralıklarında bakterinin kromu sıfırlama zamanının ortalama olarak 192. ve 240. saatler olduğu bulunmuştur. pH 9.0, 8.5 ve 7.5'da gelişen hücreler kroma karşı pH 7.0 hücrelerine kıyasla 24 saat daha erken adapte olmuşlardır. Fakat pH 7.0'de gelişen P18 hücreleri 110 ppm kromun tamamını onlardan daha önce tüketmiştir. Diğer pH gruplarına göre yaklaşık 110 ppm krom konsantrasyonu en kısa sürede sıfırlanan pH ortamı olduğu için, P18 suşu için bundan sonra yapılan bütün krom indirgeme deneyleri pH 7.0'de sabitlenmiştir. pH 9.5'da inoküle edilen hücrelerin, hem kromun toksik etkisi hem de yüksek alkali pH'nın etkisinden dolayı ortamda aktif biçimde üremediği ve bu pH değerinde kromu indirgemediği tespit edilmiştir. pH 9.0, 8.5, 7.5 ve 6.0 olduğunda, P18 suşunda hücre gelişimi olmasına rağmen kromun indirgeme süresinin uzadığı gözlenmiştir (Tablo 3.3, 3.4, Şekil 3.6, 3.7; bkz s: 60, 61).

Pseudomonas mendocina DS0601-FX-P22 suşu ise 25 ppm Cr (VI) 'u pH 6.0'da inkübasyonun 36. saatinde sıfırlamıştır. pH 9.0'da hücreler yüksek alkali pH'dan dolayı inhibe olarak gelişememişlerdir. Diğer pH değerlerinde ise kromun toksik etkisini ancak atlatan hücreler 25 ppm krom ortalama 48. ve 60. saatlerde sıfırlamışlardır. En kısa sürede pH 6.0'da gözlenen Cr (VI) indirgemesinde dolayı daha sonra yapılan krom indirgeme deneyleri *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX-P22 için pH 6.0'da gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonunda elde ettiğimiz sonuçlar,

literatür bilgilerini doğrular niteliktedir (Cheng ve Li, 2009; Wang ve Xiao, 1995). Buna ilaveten, *Pseudomonas mendocina* suşlarının aynı türe ait olmalarına rağmen farklı pH değerlerinde krom indirgeme yeteneklerinin varlığı, suş farklılığından kaynaklanmıştır (Tablo 3.3, 3.4; Şekil 3.6, 3.7; bkz s: 60,61).

4.3. Başlangıç Krom Konsantrasyonunun İndirmeye ve Hücre Gelişimine Etkisi

Krom metali toprak ve su ortamının önemli kirleticilerinden olup insan aktivitelerinin bir sonucu olarak biyokimyasal, hücresel, populasyon ve kommunité düzeylerinde organizmalarda toksik etkiye neden olmaktadır. Şehirsél atık sular, tarımsal erozyon, endüstriyel ve madencilik aktiviteleri gibi bulaşma etkenlerinin sonucunda çevrenin kromla kontaminasyonu dikkat edilmesi gereken bir problem haline gelmiştir. Ayrıca, krom serbest radikal oluşumuna da neden olarak oluşan bu radikallerin aminoasitler, proteinler, karbonhidratlar, nükleik asitler ve lipidlere saldırarak bu biyomoleküllere zarar vermektedirler.

Mikroorganizmaların tolere edebildiği metal dozu, mikroorganizma ve metal iyonunun türüne göre değişmektedir. Ayrıca tolere edilebilir metal dozu mikroorganizmaların adaptasyonu ile arttırılabilir.

Krom organizmalar için essensiyel bir element (Bailar, 1997) olmasının yanında kanserojenik (Venitt ve Levy, 1974), mutajenik (Nishioka, 1975) ve yüksek toksik (Sharma ve diğ., 1995; Petrilli ve De Flora, 1977) özelliklerinden dolayı ortamda miktarının artmasıyla organizmalar üzerinde olumsuz etkilere sebep olur. Çalışmamızda da, 110 ppm ve 25 ppm başlangıç Cr (VI) konsantrasyonları bakteriler üzerinde ciddi toksik etkilere sebep olmuş ve gelişmelerini etkilemişlerdir. Daha sonra yapılan başlangıç krom konsantrasyonu denemelerinde konsantrasyonlar azaltıldıkça gözlenen hücre gelişim sonuçları bu durumu desteklemiştir ve krom etkisinde P18 ve P22 suşlarının hücre sayısı ve büyüme hızlarının olumsuz etkilendiği ve buna bağlı olarak da krom indirgeme süreçlerinin farklılık gösterdiği gözlenmiştir. Bakterilerin kromlu ortamdaki hücre gelişimine bakıldığında, kontrole kıyasla (Tablo 3.16, 3.21, Şekil 3.21, 3.26; bkz s: 75,80) her iki bakterinin krom konsantrasyonu artışına bağlı olarak hücre gelişimlerinin azaldığı gözlenmiştir.

Organizmaların kroma olan toleransları türden türe, beslenme şekline, çevresel etkenlere, krom konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Birçok araştırmacı krom konsantrasyonunun türler üzerine olan etkilerini incelemiş ve tolere ettikleri krom miktarlarını rapor etmişlerdir. 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 sebebinin 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 diğ. 2008 yılında aynı bakteri ile yapmış oldukları çalışmada düşük krom konsantrasyonunda indirgemenin daha hızlı ve komplike olduğunu yüksek konsantrasyonlarda ise daha uzun inkübasyon sürelerine ihtiyaç duyulduğunu rapor etmişlerdir. P18 suşu ile yapılan bu çalışma da Ashwini ve diğ., (2008)'ni onaylar niteliktedir. P18 suşu için 110 ppm ve 80 ppm krom konsantrasyonlarında 168 saat gibi çok uzun bir inkübasyon süresi gözlenmiştir. Pal ve Paul (2004) ise kroma dirençli 34 tane bakteriden oluşan bir grup üzerinde yapmış oldukları çalışmada başlangıç krom konsantrasyonu ve hücre yoğunluğunun artması ile indirgemenin arttığını bulmuşlardır. Benzer sonuçlar bu çalışmada da gözlenmiştir. P18 suşu için inkübasyon periyodunun ilk 24 saatinde 110 ppm krom konsantrasyonunda 23.76 ppm, 80 ppm krom konsantrasyonunda 14.76 ppm, 50 ppm krom konsantrasyonunda 10.58 ppm ve 30 ppm krom konsantrasyonunda ise sadece 6.48 ppm krom indirgenmiştir. Aynı şekilde P22 suşu için ilk 24 saatlik inkübasyonda aralarında çok büyük farklar olmasa da 25 ppm krom konsantrasyonunda 10.91, 20 ppm krom konsantrasyonunda 10.08, 15 ppm krom konsantrasyonunda 9.59 ve 10 ppm krom konsantrasyonunda ise sadece 7.34 ppm krom indirgenmiştir. Bu sonuçlar Pal ve Paul (2004)'un sonuçları ile desteklenmektedir (Tablo 3.5, 3.6; Şekil 3.10-3.11; bkz s: 63, 64).

Nelumbo nucifera'da 50 µM Cr konsantrasyonunda 168 saatlik etkileşimden sonra Cr'un %79'unun akümüle edildiği gözlenmiştir (Vajpayee ve diğ., 1999). Wang ve diğ., (1997) fitoplanktonlardaki Cr (VI)'ın biyokonsantrasyonunun farklılığına dikkat çekmişlerdir. Büyüyen kültüre Cr (VI) eklenmesiyle hücre canlılığında bir azalışa

rağmen, bazı *Enterobacter cloacae* (Wang ve diğ., 1989b), *E. coli* (Shen ve Wang, 1994b), *P. flourescens* ve *Bacillus sp.* (Wang ve Xiao, 1995) kültürlerinde başlangıç Cr (VI) oranının artmasıyla Cr (VI) indirgeme oranı artmaktadır. Benzer sonuç *E. coli* kültürlerinde gözlenmiştir (Shen ve Wang, 1994b).

Sunulan bu çalışmada yukarıda da belirtildiği gibi literatür araştırmalarına paralel sonuçlar elde edilmiş olmakla birlikte, daha yüksek başlangıç krom konsantrasyonlarında krom indirgeme süresinin uzamasına rağmen indirgenen krom miktarının arttığı tespit edilmiştir. P18, başlangıç krom konsantrasyonu 30 ppm iken kromu indirgeme zamanı 48 saat, 50 ppm'de 84 saat olarak kaydedilmiştir. 110 ppm ve 80 ppm krom konsantrasyonlarında ise 168 saat olarak gözlenmiştir (Tablo 3.5-3.8; Şekil 3.10-3.13; bkz s: 63-66). Krom miktarındaki artışa bağlı olarak indirgeme zamanı da artmıştır, fakat P22 suşu için indirgeme süreleri değişmezken, krom konsantrasyonu azaldıkça indirgenen krom miktarı da azalmaktadır. 25, 20, 15 ve 10 ppm krom konsantrasyonlarında P22 suşuna ait inkübasyon periyodununun 36. saatinde bütün krom miktarları sıfırlanmıştır (Tablo 3.9-3.12; Şekil 3.14-3.17; bkz s: 67-70).

Organik moleküller, elektron vericisi veya alıcısının varlığı, ağır metal ve protein denatürantlarının krom indirgeme ile hücre gelişimleri üzerine etkisi birçok araştırmacı tarafından çalışılmaktadır (Cheung ve Gu, 2007; Sharma, 2002). Philip ve diğ.(1998)' ne göre 1000 mg/L oranlarında nitrat ve sülfat miktarları *Bacillus coagulans*'ın krom indirgemesine etki etmemektedir. *Bacillus sp.* suşlarının krom indirgemelerini 1400 mg/L nitrat ve 1200 mg/L sülfat miktarlarının da etkisi bulunmamaktadır (Wang ve Xiao, 1995). Ancak *Enterobacter cloacae* HO1' in anaerobik şartlarda krom indirgeme aktivitesinin 4 mg/L ZnSO₄ veya 425 mg/L NaNO₃ varlığında etkilendiği de rapor edilmiştir (Komori ve diğ., 1989). *Escherichia coli*' nin anaerobik şartlarda krom indirgeme oranı 8000 mg/L sülfat varlığında azalırken 8000 mg/L nitrat varlığında etkilenmemiştir (Shen ve Wang, 1995). Bu çalışmalar nitrat ve sülfatın genel olarak bakterilerin krom indirgeme üzerine etkilerinin olduğunu göstermektedir.

TSB kontrol grubu ve organik asitler karşılaştırılacak olursa, ilk 24 saatlik inkübasyonda TSB, galakturonik asit ve glukuronik asit ortamlarındaki hücre gelişimleri genel olarak birbirlerine yakinken, sitrik asitli ortamda gelişim daha azdır. Fakat aljinik asitli ortamda en yüksek gelişme gözlenmiştir. Kontrol grubu ile

karşılaştırıldığında, organik asit içeren besiyerlerinde bakterilerin krom varlığında daha iyi gelişim gösterdikleri tespit edilmiştir. Bu da elektron vericisi olarak kullanılan organik asitlerin, kromun toksik etkisini azalttığı şeklinde yorumlanmıştır. Genel olarak, ilk 24 saatte hem TSB hem de organik asitler için hücre yoğunlukları kromsuz ortamda 1.00-1.50 gibi absorbans değerlerini aşarken, 110 ppm krom konsantrasyonunda hücre yoğunluğu 0.07-0.08 olmuştur. Galakturonik ve glukuronik asitli ortamdaki hücre yoğunlukları TSB ortamındaki hücre yoğunluklarına göre daha yüksekken, aljinik ve sitrik asitli ortamlardaki hücre yoğunlukları daha düşüktür. Bu durum organik asitlerin kroma karşı adaptasyon sürecini kısaltarak bu süreci daha çabuk atlatalmaları için yardımcı oldukları ve bunun sonucunda organik asitli ortamlardaki hücrelerin TSB ortamındaki hücrelere göre daha hızlı geliştikleri ve böylece inkübasyon periyodu boyunca TSB ortamında gelişen hücrelere göre daha çabuk yaşlandıkları şeklinde açıklanabilir (Tablo 3.5; Şekil 3.10; bkz s: 63).

Başlangıç konsantrasyonu 80 ppm iken TSB ortamındaki hücre yoğunluğu % 26,92 oranında, galakturonik asitli ortamda % 15,67 oranında, glukuronik asitli ortamda %17,16 oranında, sitrik asitli ortamda % 78,35 ve aljinik asitli ortamda % 9,21 oranındadır(Tablo 3.6; Şekil 3.11; bkz s: 64). Bu oranlar, 50 ppm krom konsantrasyonunda ise TSB de % 36,90 oranında, galakturonik asitli ortamda % 49,75 oranında, glukuronik asitli ortamda % 92,82 oranında, sitrik asitli ortamda % 70,37 ve aljinik asitli ortamda % 68,96 oranındadır (Tablo 3.7; Şekil 3.12; bkz s: 65). Bakterilerin en aktif oldukları 60. ve 72. saatteki gelişme durumlarına bakılacak olursa, galakturonik, glukuronik, ve sitrik asitli ortamlardaki hücre gelişim oranları TSB besi ortamındaki hücre gelişim oranlarından daha fazlayken aljinik asitte bu oran düşmüştür. Başlangıç konsantrasyonu 30 ppm olduğunda ise 110, 80 ve 50 ppm konsantrasyona kıyasla çok daha iyi gelişim sağlanmıştır(Tablo 3.8; Şekil 3.13; bkz s: 66).

Genel olarak, P18 suşu 110, 80, 50 ve 30 ppm krom konsantrasyonlarında galakturonik veya glukuronik asit içeren ortamda daha iyi gelişim gösterirken sitrik asitli veya aljinik asitli ortamlarda hücre gelişimi zayıf kalmıştır (Tablo 3.16-3.19; Şekil 3.21-3.24; bkz s: 75-78).

P22 suşunda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Genel olarak hücre yoğunluğu, krom konsantrasyon artışına bağlı olarak azalmıştır. Ancak besiyerine organik asit ilavesi hücre gelişiminde olumlu yönde etki etmiştir. Tüm konsntrasyonlarda en

etkili organik asitler galakturonik ve glukuronik asit olmuştur (Tablo 3.21-3.24; Şekil 3.26-3.29; bkz s: 80-83).

4.4. Organik asitlerin ve ikili kombinasyonlarının krom indirgemesi üzerine etkileri

Bakteriler, topraktaki toksik metalleri taşıma özelliğine sahiptirler. Toksik olan Cr (VI), doğal ortamda biyotik ve abiyotik proseslerle, daha az çözünebilir ve insanlar üzerinde nispi olarak daha zararsız olan Cr (III)' e indirgenmektedir; ve Cr (VI)' nın Cr (III)' e bakteriyel indirgenmesi, farklı besinlerin varlığında ya da değiştirilmiş besin şartlarında gerçekleşir (Priester et al. 2006). Kromu indirgeme yeteneğine sahip olan mikroorganizmalar kromu indirgemek için çok sayıda organik bileşiği elektron vericisi olarak kullanırlar (Philip ve diğ., 1998; Liu ve diğ., 2004; Wang ve Xiao, 1995). Liu ve diğ. (2006), çalışmalarında glukozun krom indirgemesi üzerine etkisini test etmişler ve glukoz ilave edildiğinde 72 saatlik inkübasyon sonunda kromun konsantrasyonunun 40 mg/L' den 4,24 mg/L' ye düşerken glukoz olmayan aynı besiyerinde bu oranın ancak 16,24 mg/L olduğunu rapor etmişlerdir. Glukozun olumlu etkisi *Penicillium sp.*' de gözlenmiştir (Wang ve diğ. 1998). Garbisu ve diğ. (1998) glukoz ilavesinin *Bacillus subtilis*'de ciddi anlamda olumlu etki yaptığını söylemektedirler. Araştırmacıların sonuçları, çalışmamızda elde edilen sonuçları doğrular niteliktedir.

Agrobacterium radiobacter, *Bacillus cereus*, *E. coli* ATCC33456 ve *Pseudomonas fluorescens* LB300 bakterilerinin aerobik şartlarda krom indirgemesinde elektron vericisi olarak glikozu kullanabilmektedirler (Wang ve Shen, 1995). Besi ortamına 2,7 g/L oranında glukoz ilave edildiğinde *Bacillus sp.* suşu 24 saat içerisinde 20 mg/L krom miktarını 12 mg/L' ye indirgemektedir (Wang ve Xiao, 1995).

Cr (VI) indirgemesi için *Enterobacter cloacae* HO1, karbon kaynağı olarak sükrozu kullanmaktadır (Rege, 1997). Kromun, yeraltı sistemlerinde mevcut humik asit, fulvik asit gibi doğal organik asitler ile sitrik asit, aljinik asit gibi mikrobiyal yollarla oluşan ligandlarla kuvvetli bileşikler oluşturduğu da bilinmektedir (Dubbin, 2004).

Kantar ve diğ.(2008) da galakturonik, glukuronik ve aljinik asit gibi organik asitleri, Cr (VI) ile kirlenmiş toprakların in-situ stabilizasyonunda kullanmışlardır. Bu bağlamda sunulan bu çalışmada da galakturonik asit, glukuronik asit, sitrik asit ve

aljinik asit moleküllerinin tek başlarına ve ikili kombinasyonlarının Cr (VI) indirgemesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu etkiler P18 ve P22 suşları için farklı başlangıç krom konsantrasyonlarında ayrı ayrı incelenmiştir (Tablo 3.5-3.12; Şekil 3.10-3.17; bkz s: 63-70).

Buna göre; P18 suşunda kontrol grubu TSB ortamında 168 saat süren krom indirgemesi, 110 ppm ve 80 ppm krom konsantrasyonlarında galakturonik ve glukuronik tek başlarına kullanıldıklarında bu süre 96 saate düşmüştür. 50 ppm krom konsantrasyonunda herhangi bir organik asit yokken 84 saat süren krom indirgemesi galakturonik ve glukuronik asit kullanıldığında 60 saate düşmüştür. Krom miktarı 30 ppm'e çekildiğinde ise kontrol grubunda 60 saat sürerken galakturonik ve glukuronik eklendiğinde 48 saat sürmüştür. Sitrik asit kullanıldığında ise, 110 ppm krom konsantrasyonunda 144 saat, 80 ppm krom konsantrasyonunda 120 saat, 50 ppm konsantrasyonunda 72 saat ve 30 ppm konsantrasyonunda ise 48 saatte indirgenmiştir. Aljinik asit krom indirgemesine tek başına kullanıldığında P18 suşu için hiçbir etki göstermemiştir. Kontrol grubu ile aynı sürelerde krom indirgeyen aljinik asit ortamı hücreleri, 110 ve 80 ppm'de 168 saatte, 50 ppm'de 84 saatte ve 30 ppm'de 60 saatte kromu indirgeyebilmiştir (Tablo 3.5-3.8; Şekil 3.10-3.13; bkz s: 63-66).

110 ppm krom içeren farklı organik asitlerin bulunduğu besi ortamlarında yapılan denemelere göre normal indirgeme süresini 72 saat kısaltan galakturonik asit ve glukuronik asit ortamları birbirleriyle yarış halinde olup inkübasyon periyodunun ilk 96 saatinde yaklaşık 110 ppm kromun tamamını indirgeyerek sıfırlanmışlardır. Fakat 72. saatte galakturonik asit ortamında ortalama sadece 2.86 ppm krom varken, glukuronik asitli ortamda ise 9.29 ppm krom mevcuttur. Bu sonuç aslında belki de galakturonik asitli ortamda bulunan bakterilerin kromu, glukuronik asitli ortamda bulunan hücrelere göre daha erken indirgemiş olabileceklerini düşündürmektedir (Tablo 3.5; Şekil 3.10; bkz s: 63).

Aljinik asitli ortamdaki hücreler ise diğer organik asitli ortamdaki hücrelerin tam aksine, kontrol grubundaki hücrelerden de daha düşük indirgeme aktivitesi sergileyerek, kontrol grubu ile aynı sürede (168. sa) indirgeyebilmişlerdir. 144. saatte kontrol grubunda (TSB) ortalama 8.80 ppm krom mevcutken, aljinik asitli ortamda aynı sürede 10.28 ppm krom vardır. Bu da TSB'nin bile gerisinde olduğunun

kanıtıdır. Yani aljinik asit 110 ppm krom içeren ortamlarda krom indirgemesine etki etmemiştir (Tablo 3.5; Şekil 3.10; bkz s: 63).

Başlangıç krom konsantrasyonu 80 ppm olduğunda, kontrol grubu da dahil galakturonik, glukuronik asitli ve aljinik asitli ortamlarda Cr (VI) indirgeme süresinde değişiklik olmamıştır. TSB ve aljinik asitli ortamda kromun sıfırlanma zamanı 168. saat iken galakturonik ve glukuronik asitli ortamlarda 96. saattir. Sonuçlar Tablo 3.16 ve Şekil 3.21’de gösterilmiştir. Krom konsantrasyonunun 80 ppm’e çekilmesi, sitrik asitli ortamlardaki hücelere pozitif yönde etki ederek kromu 24 saat daha erken indirgemelerine vesile olarak 120. saate indirgemeleri ile sonuçlanmıştır (Tablo 3.6; Şekil 3.11; bkz s: 63).

Krom konsantrasyonu 50 ppm iken, galakturonik, glukuronik asitli ortamlarda kromun sıfırlanma zamanı 60 saat olmuştur. 48. saatte galakturonik asitli ortamda ortalama 9.40 ppm krom bulunurken, glukuronik asitli ortamda sadece ortalama 7.15 ppm krom kalmıştır. Krom konsantrasyonu azaldıkça daha önce gözlenen galakturonik ve glukuronik asitli ortamların birbirleri ile yarış hali 48. saatte gözlenen son krom konsantrasyonlarına bağlı olarak yön değiştirerek glukuronik asitli ortamdaki hücelere aynı sürede daha fazla krom indirgemişlerdir. Aljinik asitli ortamda bulunan hücelere bu durumdan hala etkilenmeyerek 50 ppm kromu kontrol grubun (TSB) ortamında gelişen hücelere aynı sürede indirgeyerek inkübasyon periyodunun 84. saatinde tamamen sıfırlamışlardır. Bu durum aljinik asitli P18 suşu için krom indirgemesinde pek de etkili olmadığına bir işarettir (Tablo 3.7; Şekil 3.12; bkz s: 65).

Galakturonik asitli ve glukuronik asitli ortamlarda hücelere TSB ve aljinik asitli ortamlara göre yine kromu daha kısa sürede indirgeyerek farklarını korumuşlardır. 30 ppm kromu her iki ortam da 48. saatte sıfırlamışlardır. Fakat daha önce de bahsettiğimiz galakturonik asitli ve glukuronik asitli ortamlardaki hücelere arasındaki yarışın yön değiştirdiği 30 ppm krom ortamı denemelerinde daha belirginleşmiştir. Yani daha yüksek krom konsantrasyonlarında galakturonik asitli ortamda bulunan hücelere kromu daha hızlı indirgerken, krom konsantrasyonu azaldıkça bu yarışta glukuronik asit öne geçmektedir. 36. saatte galakturonik asitli ortamda 6.99 ppm bulunurken, glukuronik asitli ortamda sadece 2.40 ppm krom kalmıştır. Söz konusu durum bu kez sitrik asitli ortamda bulunan hücelere için de geçerlidir. Krom

konsantrasyonunun azaltılarak 30 ppm'e çekilmesi sitrik asitli ortamdaki hücreleri de bu yarışa ortak ederek galakturonik ve glukuronik asitli ortamlardaki hücreler ile aynı sürede kromu indirgemelerine vesile olmuştur. (Tablo 3.8; Şekil 3.13; bkz s: 66).

Aljinik asitli ortamda bulunan hücreler, krom miktarının 30 ppm'e çekilmesi ile ancak krom indirgeme deneylerine ortak olmuştur. TSB kontrol grubuna göre çok etkili olmamasına rağmen 6 saat daha önce kromun tamamını indirgeyebilmişlerdir. Fakat dikkat edecek olursak 48. saatte 1.99 ppm krom içeren ortam, 54. saatte 1.32 ppm krom içermektedir. Yani aradan 6 saat geçmesine rağmen sadece 0.67 ppm krom indirgenebilmiştir. Bu durum P18 suşunun aljinik asitli ortamda kromu verimli bir şekilde indirgeyemediğini bir kez daha kanıtlar niteliktedir (Tablo 3.8; Şekil 3.13; bkz s: 66).

P22 suşunda ise; 25 ve 20 ppm krom konsantrasyonlarında kontrol grubu TSB ortamında 36 saat süren krom indirgemesi galakturonik ve glukuronik asit kullanıldığında bu süre 30 saate düşerken, 15 ve 10 ppm krom konsantrasyonlarında bu süre her iki organik asit için 12 saate gerilemiştir. Sitrik asit ve aljinik asit kullanıldığında ise krom konsantrasyonlarının tümünde tek başlarına krom indirgemesinde olumlu ya da olumsuz hiçbir etki göstermemişlerdir (Tablo 3.9-3.12; Şekil 3.14-3.17; bkz s: 67-70).

Galakturonik asitli ve glukuronik asitli ortamda gelişen hücreler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aynı miktar kromu 30. saatte indirgeyebilmişlerdir. Kromun tamamı her iki ortamda da sadece 6 saatlik bir farkla indirgenerek daha önce bitirilmesine rağmen, krom indirmesine bu konsantrasyonda pek de etkili olmamışlardır denilebilir. P18 suşu ile karşılaştırılacak olursa 110 ppm'de kontrol grubu ile bu iki ortam için krom indirgeme süresi bakımından aralarında neredeyse yarı yarıya fark vardır (Tablo 3.5; Şekil 3.10; bkz s: 62). P22 suşunda böyle bir sonuç gözlenmesi P22 suşunun kroma olan toleransının gerçekten çok düşük olmasından dolayı pek de şaşırtıcı değildir. Fakat hem galakturonik hem de glukuronik asit P22 suşunda 25 ppm krom indirgemesi için uygundur demek yalnız olmaz. (Tablo 3.9; Şekil 3.14; bkz s: 67).

25 ve 20 ppm krom ortamlarında yapılan denemelere göre yine sadece galakturonik asitli ve glukuronik asitli ortamda yetişen P22 suşu krom indirgemesinde etkili

olmuştur. Krom indirgeme süresini 25 ve 20 ppm denemelerine göre 26 saat daha kısaltarak inkübasyon periyodunun ilk 12. saatinde yaklaşık 15 ppm kromu tamamen sıfırlamışlardır. TSB kontrol grubuna göre yaklaşık 15 ppm kromu 24 saat daha erken bitiren bu iki ortamda da ilk 6 saatte 11 ppm'den daha fazla krom indirgenmiştir. Bu iki ortamda gelişen hücreler kromun toksik etkisini ancak atlatabilmişlerdir (Tablo 3.11; Şekil 3.16; bkz s: 69).

Sitrik asitli ve aljinik asitli ortamlarda gelişen hücreler 15 ppm'de de kromun toksik etkisinden hala kurtulamayıp, kontrol grubu (TSB) hücreleri ile aynı sürede, inkübasyon periyodunun 36. saatinde yaklaşık 15 ppm kromu ancak indirgeyebilmişlerdir. (Tablo 3.11; Şekil 3.16; bkz s: 69).

Krom miktarı 10 ppm'e çekilerek yapılan farklı organik asitlerin P22 suşunda krom indirgemesi üzerine olan etkileri gözlenmiştir. 25, 20 ve 15 ppm krom ortamlarında yapılan denemelerle paralel sonuçlar elde edilmiştir. Galakturonik asitli ve glukuronik asitli ortamda yetişen P22 suşu krom indirgemesinde yine etkili olmuştur. İnkübasyon periyodunun ilk 12. saatinde yaklaşık 10 ppm kromu tamamen sıfırlamışlardır. TSB kontrol grubuna göre yaklaşık 10 ppm kromu 24 saat daha erken bitiren galakturonik asitli ortamda ilk 6 saatlik periyotta sadece 0.35 ppm, glukuronik asitli ortamda ise sadece 1.07 ppm krom kalmıştır (Tablo 3.12; Şekil 3.17; bkz s: 70).

Krom miktarının % 60 oranında azaltılarak 10 ppm krom içeren ortamlarda yapılmasına rağmen, sitrik asitli ve aljinik asitli ortamlarda gelişen hücreler hiçbir şekilde krom indirgeme sürelerine etki etmeyip TSB kontrol grubu ile aynı sürede yaklaşık 10 ppm kromu tamamen sıfırlamışlardır. Bu sonuç her iki organik asidin de P22 suşu için krom indirgeme deneyleri için uygun olmadıklarını doğrulamıştır. İnkübasyon periyodunun 30. saatinde TSB kontrol grubu ortamında 0.75 ppm, sitrik asitli ortamda 0.53 ppm ve aljinik asitli ortamda ise sadece 0.35 ppm krom kalmıştır. Fakat yukarıda da belirtildiği gibi bütün inkübasyon periyotlarının gözlenmesi mümkün olsa belki de kontrol grubu dahil sitrik asitli ve aljinik asitli ortamlarda yaklaşık 10 ppm krom 36. saatten önce sıfırlamış oldukları görülebilirdi (Tablo 3.12; Şekil 3.17; bkz s: 70).

Her iki bakteri suşu için de galakturonik ve glukuronik asit tek başlarına kullanıldıklarında kromu verimli bir şekilde etkilerken, sitrik asit P18 suşunda krom konsantrasyonuna bağlı olarak krom indirgemesinde etkili olmasına rağmen, P22 suşu için krom konsantrasyonuna bağlı kalmaksızın krom indirgemesini etkilememiştir. Diğer yandan aljinik asit her iki bakteri suşu için de krom indirgemesinde herhangi bir görev üstlenmeksizin etkisiz eleman görevi görmüştür. M. Doğan ve diğ. (2011)'nin yaptığı çalışma da aljinik asit *P.putida* hücrelerinde galakturonik ve glukuronik asite göre krom indirgemesinde daha etkili olmuşlardır. Bu çalışma da galakturonik ve glukuronik yakın etkilere sahipken, yine M. Doğan ve diğ.'nin çalışmalarında ise glukuronik asit, galakturonik asite göre krom indirgemesinde daha etkili olmuştur.

Sunulan bu çalışmada ayrıca organik asitlerin ikili kombinasyonlarının krom indirgemesi üzerine etkilerine bakıldığında, P18 suşunda galakturonik asitli ve glukuronik asitli ortamda 96. saatte indirgenen yaklaşık 110 ppm krom, organik asitler beraber kullandıklarında bu süre yarı yarıya düşürülerek kromun tamamı 48. saatte sıfırlanmıştır. Diğer yandan, 0. saatte yapılan gözlemlerde dikkatleri başka bir yöne çeken şey; eklenen kromun önemli bir miktarının daha ilk eklendikleri anda organik asitler tarafından tutulduklarını ve bağlandıklarını ortaya koymuştur. Organik asitlerin sahip oldukları krom bağlayan grupların sayısı arttıkça bu bağlanma da artmıştır ve bu çalışmada organik asitlerle yapılan bütün krom indirgeme deneylerinde görülmüştür. Fakat organik asitler ikili kullanıldıklarında bu tutunma durumu bariz şekilde açığa çıkmıştır. Ayrıca galakturonik asit ve glukuronik asit birbirleri ve sitrik asitle kullandıkları zaman daha fazla tutunma gözlenmesine rağmen aljinik asitle kullandıklarında daha az krom tutunmuştur. Bu bağlamda krom indirgemesi için hangi organik asidin daha etkili olduğu hakkında ayrıca bir fikir verebilir.

P18 suşu galakturonik asitli ve glukuronik asitli ortamda 110 ppm krom 96 saatte, sitrik asitli ortamda 144 saatte ve aljinik asitli ortamda ise herhangi bir etki görülmemiş ve 168 saatte indirgenmişlerdi (Tablo 3.5; Şekil 3.10; bkz s: 63). Galakturonik asit, aljinik ve sitrik asitle beraber kullandıklarında ise, galakturonik+sitrik asitli ortamda 110 ppm krom 72. saatte ve galakturonik+aljinik asitli ortamda da yine 72. saatte tamamen indirgenmiştir. Galakturonik ve sitrik asit krom indirgemesinde tek başlarına kullanıldıklarında zaten etkili olmalarına rağmen,

aljinik asitin normalde bir etkiye sahip olmaması fakat galakturonik asitle kullanıldığında krom indirgemesini pozitif yönde etkilemesi dikkat çekicidir. Ayrıca galakturonik+sitrik asit ilk eklendiklerinde galakturonik+aljinik asite göre daha fazla krom tutmalarına rağmen aljinik asitin pozitif etkisi 48. saatte gözlenen kalan krom miktarlarından da anlaşılabilir. Galakturonik+sitrik asitli ortamda 48. saatte 21.67 ppm, galakturonik asitli ortamda ise sadece 18.70 ppm krom kalmıştır (Tablo 3.13; Şekil 3.18; bkz s: 72).

Yine P18 suşunda glukuronik+galakturonik, glukuronik+aljinik ve glukuronik+sitrik asit beraber kullanıldıklarında ise krom indirgemesini önemli ölçüde etkileyerek, glukuronik+galakturonik asitli ortamda 48. saatte, glukuronik+aljinik asitli ve glukuronik+sitrik asitli ortamlarda 72. saatte 110 ppm kromu tamamen indirgemişlerdir. Aynı şekilde glukuronik ve sitrik asit krom indirgemesi yönündeki pozitif etkileri aşıkardır. Aljinik asitin normalde bir etki sahip olmaması fakat glukuronik asitle kullanıldığında krom indirgemesini pozitif yönde etkilemesi dikkat çekicidir. Fakat bu kez 48. saat dikkate alındığında glukuronik+aljinik asitli ortamda 26.12 ppm, glukuronik+sitrik asitli ortamda ise 24.64 ppm krom kalmıştır. Yani aljinik asit galakturonik asitle kullanıldığında krom indirgemesini glukuronik asit ile kullanımına göre daha etkili olabilir. Aynı şekilde sitrik asitin galakturonik asit ile kullanımı, glukuronik asit ile kullanımına göre daha etkili olabilir (Tablo 3.13; Şekil 3.18; bkz s: 72).

Sitrik asit ve aljinik asitin galakturonik ve glukuronik asitli ortamlarla beraber kullanımları krom indirgemesini pozitif yönde etkilemiştir (Tablo 3.23, Şekil 3.28). Fakat bu iki organik asitin beraber kullanımları krom indirgemesine P18 suşu için farklı bir boyut sunmuştur. Sitrik asit açısından düşünüldüğünde tek başına kullanılırken 110 ppm kromu 144 saatte indirgediği (Tablo 3.15; bkz s: 74) dikkate alınırsa aljinik asit ile kullanımı ona hiç bir avantaj sağlamayarak yine aynı sürede 110 ppm kromu tamamen sıfırlamıştır. Fakat olayın boyutu aljinik asit açısından düşünüldüğünde, normalde krom indirgemesine etki etmediği de dikkate alınarak (Tablo 3.13; Şekil 3.18; bkz s: 72) sitrik asit ile kullanıldığında krom indirgemesine etki ederek 24 saat daha erken bitirmesine vesile olmuştur, öyle ki bu sonucu yorumlamak ince bir noktadır. Bu bağlamda aljinik asitin P18 suşu için krom indirgemesinde etkisiz eleman olduğunu söylemek hiç de yanlış olmaz, aksine kesin bir biçimde bu sonuç desteklenmiş olur. Çünkü kontrol grubuna göre krom

indirgeme sürecinde her hangi bir etkiye sahip değilken sitrik asit ile kullanıldığında süreyi 24 saat geriye çekmesi aljinik asitten kaynaklı bir sonuç değildir, sitrik asit tek başına zaten yine bu süre zarfında kromun tamamını sıfırlayabilmektedir (Tablo 3.13; Şekil 3.18; bkz s: 72).

Sunulan çalışmada P22 suşunda galakturonik+glukuronik asitli ortamda krom indirgeme durumları incelenecek olursa, tek başlarına hem galakturonik asitli hem de glukuronik asitli ortamlarda 25 ppm krom konsantrasyonunu 30 saatte indirgemişlerdir (Tablo 3.9; Şekil 3.14; bkz s: 67). İkili kullanımları bu süreyi inkübasyon periyodunun 12. saatine çekmiştir. Diğer taraftan galakturonik asitin, sitrik asit ile kullanımı da krom indirgeme süresini kısaltmıştır. 25 ppm krom eklendiğinde tek başlarına galakturonik asitli ortamda 30, sitrik asitli ortamda 36 saat süren krom indirgemesi beraber kullanıldıklarında 24 saate düşmüştür. Sitrik asit tek başına kullanıldığında 25 ppm ve diğer krom konsantrasyonlarında krom indirgemesine etki etmemişken, galakturonik asitle kullanıldığında etkili olması dikkat çekicidir. Başka bir konu ise, galakturonik asitin aljinik asit ile kullanımı krom indirgeme süresini etkilememiştir. Zira galakturonik asitli ortamda krom indirgeme zaten 30 sürmüştür (Tablo 3.9; Şekil 3.14; bkz s: 67). Bu da yine aljinik asitin krom indirgemesinde etkisiz eleman olduğunu kanıtlar niteliktedir. Benzer olarak glukuronik asitin galakturonik asit ile kullanımı yukarıda da ifade edildiği gibi, indirgeme süresini 6 saate çekerken, sitrik asit ile beraber kullanımlarında da krom indirgeme süresini etkilemişlerdir. Tek başlarına glukuronik asitli ortamda 25 ppm krom 30 saatte, sitrik asitli ortamda 36 saatte indirgenirken (Tablo 3.9; Şekil 3.14; bkz s: 67), beraber kullanımları bu süreleri 24 saate çekmiştir. Galakturonik asitle kullanımında olduğu gibi, glukuronik asitin sitrik asitle kullanımı, sitrik asit açısından düşünüldüğünde krom indirgemesini normalde etkilemezken beraber kullanımları indirgeme süresini düşürmesi dikkat çekici olmuştur. Tek başlarına kullanıldıklarında P22 suşu için krom indirgeme sürecinde etkili olmayan sitrik asit ve aljinik asit açısından olaya bakıldığında galakturonik ve glukuronik asitli ortamlarla beraber kullanımları krom indirgemesini pozitif yönde etkilemiştir (Tablo 3.14; Şekil 3.19; bkz s: 73). Gerçi bu pozitif etkiler kendilerinden kaynaklı mı yoksa galakturonik ve glukuronik asitin etkilerinden dolayı mı bu ayrı bir tartışma konusudur. Fakat asıl dikkatleri çeken başka bir nokta var ki, bu iki organik asit beraber kullanıldıklarında krom indirgemesine P22 suşu için olumsuz bir etki göstererek indirgeme süresini

uzatmışlardır. Tek başlarına kullanıldıklarında 36 saat süren indirgeme süresi, beraber kullanıldıklarında 54 saate çıkmıştır. Bu durum sitrik asit kaynaklı mı yoksa aljinik asit kaynaklı mı bu soru işareti olarak kalmasına rağmen, aljinik asitin diğer organik asitleri ile münasebeti de düşünülecek olursa, sürenin uzaması daha çok aljinik asite bağlanabilir. İşin bu boyutu düşünüldüğünde aljinik ve sitrik asitin beraber kullanıldıklarında krom indirgemesi üzerinde antagonistik bir etkiye sahip olmaları yapılan çalışma için ilgi çekici bir sonuç doğurmuştur (Tablo 3.14; Şekil 3.19; bkz s: 73).

Ayrıca 25 ppm kromun önemli bir miktarı krom ortamlara eklendiği andan itibaren organik asitler tarafından tutularak bağlanmaktadır. Bu miktarlar galakturonik+glukuronik asitli ortamda yaklaşık 11 ppm, galakturonik+aljinik asitli ortamda yaklaşık 8 ppm, galakturonik+sitrik asitli ortamda yaklaşık 9 ppm, glukuronik+aljinik asitli ortamda yaklaşık 8 ppm, glukuronik+sitrik asitli ortamda yaklaşık 10 ppm ve aljinik+sitrik asitli ortamda 6 ppm'dir. Bu miktarlar bakterilerin krom indirgeme sürecini önemli ölçüde kolaylaştırmıştır (Tablo 3.14; Şekil 3.19; bkz s: 73)..

4.5. Biyosorpsiyon

Literatür bilgileri ışığında çeşitli parametrelerin biyosorpsiyon proseslerine etkisi aşağıdaki gibi özetlenebilir (Şencan 2006):

- Biyosorpsiyon temelde metal iyonları içeren atıksuları arıtmak için önerilen bir prosestir.
- 20-35 °C aralığında biyosorpsiyon performansı olumsuz yönde etkilenmez.
- Biyosorpsiyon prosesinde pH önemli bir etkiye sahiptir: pH metallerin çözünmesini, biyomas üzerindeki fonksiyonel grupların aktivitesini ve metalik iyonların rekabetini etkiler.
- Çözeltideki ağır metal konsantrasyonu biyosorpsiyon kapasitesini olumlu etkiler.
- Bazı durumlarda biyosorpsiyon seçici davranır. Bir metalin biyosorpsiyonla giderimine bir başka metalin mevcudiyeti etki edebilir.

- Organik maddelerin mevcudiyeti ve konsantrasyonu biyosorpsiyon prosesini etkileyebilir.

Literatür çalışmaları dikkate alındığında biyomasın ve kimyasal özellikleri birbirlerinden farklı olan metallerin biyosorpsiyon için farklı optimum pH değerlerine gereksinimleri olduğu görülmüştür. Genel olarak pH 3'ün altında tutunma bölgeleri ile H⁺ iyonları rekabet ederler. Diğer bir deyişle düşük pH'larda H⁺ iyonlarının yüksek konsantrasyonundan dolayı bağlanma bölgeleri protonlanır. Böylelikle H⁺ iyonları bağlanma bölgelerinden ayrılmaz. Bunun sonucunda bağlanma bölgelerinde negatif yük yoğunluğu azalır. Pozitif yüklü metal iyonlarının bu bölgelere bağlanma imkanı kalmaz. Çoğu mikrobiyal yüzeyler fonksiyonel grupların iyonlaşmasından dolayı negatif yüke sahip iken çok az fonksiyonel grup iyonlaşma neticesinde pozitif yüke sahiptir. Pozitif yüke sahip fonksiyonel gruplar, pozitif yüke sahip metaller ile etkileşmezler. pH, hücre duvarı ve çözelti kimyasını etkilediğinden biyosorpsiyonda önemli bir parametredir. Aktif çamur ile yapılan krom(VI) biyosorpsiyonunda pH değerinin 3'ten küçük olduğu durumlarda, aktif çamur biyomas yüzeyinin pozitif yüke sahip olduğunu belirtilmiştir. Sunulan bu çalışmada da Cr (VI) ağır metal olmasına rağmen sıvı besi yerinde Cr₂O₇⁻² iyonu şeklinde bulunmakta olup negatif yüke sahiptir. Bu yüzden düşük pH değerlerinde biyosorpsiyon kapasitesinin yüksek olması gerekir (Şencan 2006). Fakat çalışmada elde edilen sonuçlara bakılacak olursa daha önce P18 ve P22 suşları için optimum pH değerleri sırası ile 7.0 ve 6.0 olarak bulunmuştu. Nötür ve nötre yakın bu değerlerden dolayı, bakterilerin her ikisi de biyosorpsiyonda verim sağlamamışlardır. Öyle ki, P18 suşunun kurutulan ölü hücreleri ilk 12 saatlik inkübasyon periyodunda 110 ppm krom konsantrasyonunda % 9.06, 80 ppm krom konsantrasyonunda % 8.19, 50 ppm krom konsantrasyonunda % 5.98, 30 ppm krom konsantrasyonunda ise % 2.27 oranında Cr (VI) biyosorplamışlardır (Tablo 3.25 ve Şekil 3.30; bkz s: 84). P22 suşunun kurutulan ölü hücreleri ise 60 saatlik inkübasyon periyodunda 25 ppm krom konsantrasyonunda % 1.33, 20 ppm krom konsantrasyonunda % 1.84, 15 ppm krom konsantrasyonunda % 4.82, 10 ppm krom konsantrasyonunda ise % 0.95 oranında Cr (VI) biyosorplamışlardır. Daha sonra krom miktarında herhangi bir azalma olmadığı ve biyosorpsiyonun durduğu gözlenmiştir (Tablo 3.26 ve Şekil 3.31; bkz s: 85). Bir mantar türü olan *A. oryzae* ile Cd biyosorpsiyonunun % 90'ının 10 dakika içinde

gerçekleştiğini ve 1 saatte dengeye ulaşıldığı gözlemlenmiştir. Aktif çamur ile Zn biyosorpsiyonunda, biyosorpsiyon olayının 90 dakikada dengeye ulaştığı belirtilmiştir (Şencan 2006). Sunulan bu çalışmada da ilerleyen saatlerde krom miktarında herhangi bir azalma olmadığı ve biyosorpsiyonun durduğu gözlenmiştir. Ayrıca bakteri yüzeyinde bulunan ekstrasellüler polimerik yapılar yani EPS molekülleri ile kromun etkileşim içinde olduğu bilinmekte olup hem P18 hem de P22 süşunun yüzeyinde tutulan krom miktarının önemli düzeyde az olduğu görülmektedir. Bu da bakterilerin biyosorpsiyon yapmadığının, aksine bakterinin kromu indirgediğinin bir kanıtıdır (Tablo 3.25,3.26; Şekil 3.30,3.31; bkz s: 84,85).

4.6. Krom Varlığında Kromat Redüktazın İndüklenmesi

Bakteriler kroma maruz kaldıklarında sahip oldukları genleri aktifleştirerek kroma karşı kromat redüktaz enzimlerini salgırlar. Bu redüktazlar sitoplazmada çözüner halde ya da membrana bağılı olabilirler. Her iki yapıdaki redüktazlar kromun toksik etkisine karşı, karşılaştıkları krom konsantrasyonlarına bağılı olarak elimine edebilecekleri maksimum Cr (VI) dozajını daha az toksik ve hücre içerisinde en azından stabil konuma geçebilecek Cr (III) formuna dönüştürürler. Birçok araştırmacı SDS-PAGE, NMR, MS gibi çeşitli yöntemlerle kromat redüktazların krom ile indüklendiğini göstermek için araştırmalar yapmışlardır ve yapmaya devam etmektedirler. Örneğin, Park ve diğ., 2000 yılında yapmış oldukları çalışmada *Pseudomonas putida* MK1'den saflaştırdıkları kromat redüktazın moleküler ağırlığının yaklaşık 20 kDa olduğunu belirlemişlerdir. Bir başka çalışmada *P. ambigua*'dan saflaştırılan kromat redüktazın moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 25 kDa ve Native-PAGE ile 65 kDa civarında tespit edilmiştir (Suzuki ve diğ., 1992). Aynı zamanda *P. aeruginosa* (Ganguli ve Tripathi, 2001) ve *Ochrobactrum* sp. (Thacker ve Madamwar, 2005)'de bu protein yaklaşık 30 kDa ağırlığındadır. 100 µg/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 (Zahoor 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.

Sunulan bu çalışmada ise SDS-PAGE protein profil bantlarına göre kromat redüktaz enzimi indüklenip indüklenmediğini göstermek için bakteriler kromlu ve kromsuz ortamda geliştirilmiştir. P18 suşu 30, 50, 80 ve 110 ppm krom konsantrasyonları ile muamele edilirken, P22 suşu sadece 10 ve 15 ppm krom konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. Krom konsantrasyonu yükseltildikçe bandın boyutu da giderek artmaktadır. Yani krom konsantrasyonuna bağlı olarak bakteriler kromat redüktazları aktifleştirmektedir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.32 (bkz s: 86)'de verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi *P. mendocina* DS0601-FX-P22 suşunda 31 kDa civarında bir protein bandı indüklenirken *P. mendocina* PASS3-P18 de (Şekil 3.32; bkz s: 86) 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 bantları konu ile ilgili yapılan diğer çalışmaları destekler niteliktedir. Ayrıca bakterilerin aynı tür olup sadece farklı suşlar olmaları ve 16S rRNA analizlerine göre de benzer gen bölgelerine (771 bp) sahip olmaları bu sonucu destekler niteliktedir. Ancak *P. mendocina* PASS3-P18 suşunda 52 kDa büyüklüğüne sahip ikinci bir proteinin varlığı bize mikrobiyal krom indirgemenin çok daha detaylı araştırılması gerektiğini göstermektedir.

4.7. Scanning Elektron Mikroskop (SEM) Analizi

Mercan Doğan ve diğ. (2011) 1 g/L glukuronik asit içeren 0.337 mM Cr (VI) ve kromsuz TSB besiyerinde geliştirdikleri *Pseudomonas putida* P18 suşuna ait TEM analiz görüntülerini çalışmalarında rapor etmişlerdir. 0.337 mM krom kullanarak geliştirdikleri bakteri hücrelerinin TEM sonuçlarına göre, bakteri hücrelerinin kromun toksik etkisinden dolayı büzüştüğünü, parçalanıp ipliksi uzun yapılar aldığını kanıtlamışlardır. Diğer taraftan krom kullanmadan geliştirdikleri kontrol grubu bakteri hücrelerinin değişmediğini, normal basil yapılarını koruduklarını ve düzgün yapıda olduklarını göstermişlerdir. Bu bağlamda sunulan bu çalışmada sadece P18 suşu için 110 ppm krom içeren ve krom içermeyen TSB besi ortamında geliştirilerek bakteri hücrelerinin SEM analizleri yapılmıştır. Sonuçlar Şekil 3.33'de gösterilmektedir.

SEM analizi (Şekil 3.33; bkz s: 87) sonuçları 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. Ayrıca kromun toksik etkisinin, TEM analizi sonunda hücre şekil kaybı Zakaria ve diğ. (2007) tarafından da rapor edilmiştir. Ackerley ve diğ. (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. Bu çalışmada da elde edilen sonuçlar literatür bilgilerini destekler niteliktedir. Diğer yandan yine bu araştırmacılar 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 diğ., 2006). Bu çalışmada da dikkat edilecek olursa 110 ppm krom ortamında gelişen hücreler SEM analiz sonuçlarında düzgün ve toparlanmış yapıdaki bakteri hücreleri görülebilir.

5. SONUÇ

Sunulan çalışmada *P. mendocina* PASS3-P18 ve *P. mendocina* DS0601-FX-P22 suşlarının krom indirgemesinde kromun yüksek toksik etkisinden dolayı çok fazla etkili olmamalarına rağmen, kromu indirdikleri kanıtlanmıştır. Kullanılan organik asitlerden galakturonik asit ve glukuronik asit her iki bakteride de etkili olarak krom indirgemesini olumlu yönde desteklemiştir. Sitrik asit ise krom konsantrasyonuna bağlı olarak sadece *P. mendocina* PASS3-P18 suşunda etkili olurken, *P. mendocina* DS0601-FX-P22 suşunda etki göstermemiştir. Aljinik asit her iki bakteri için de etkisiz eleman rolü oynamıştır. Organik asitlerin ikili kombinasyonları krom indirgemesini önemli ölçüde etkilemiştir. Galakturonik ve glukuronik asitlerin birbirleri ve diğer organik asitlerle yaptıkları kombinasyonlar krom indirgemesini her iki bakteride de olumlu yönde etkilerken, aljinik ve sitrik asit kombinasyonları *P. mendocina* PASS3-P18 suşunda etkili olmazken, *P. mendocina* DS0601-FX-P22 suşunda kromsuz yönde etkileyerek daha uzun süreler gerektirmişlerdir. Ayrıca çalışmada yapılan scanning elektron mikroskobu görüntülemesinde kromlu ve kromsuz ortamdaki hücreler karşılaştırıldığında kromun toksik ve mutajenik etkilerinden dolayı kromlu ortamdaki hücrelerin dejenere olmuş yapıları bariz bir biçimde ortaya çıkmıştır..

P. mendocina PASS3-P18 suşu ve *P. mendocina* DS0601-FX-P22 suşlarının her ikisi için de yapılan biyosorbsiyon deneylerinde bakterin hücre yüzeyinde kromu tutmadığı görülmüştür. Bu sonuç çalışmamızda kullanılan bakterilerin kromu gerçekten indirgediğine bir kanıttır.

Çalışmada yapılan SDS-PAGE analizi sonuçlarında *P. mendocina* DS0601-FX-P22 suşunda 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

- Aas, W., Moukhamet-Galeev, A., and Grenthe, I.** 1998: Complex formation in the ternary U(VI)-F-L system (L=carbonate, oxalate and picolinate), *Radiochim. Acta.*, **82**, 77-82.
- Abskharon, R.N.N., Gad El-Rab, S.M.F., Hassan, S.H.A., and Shoreit, A.A.M.** 2009: Reduction of toxic hexavalent chromium by *E.coli*, *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*, **4(2)**, 98-103.
- Ackerley, D.F., Barak, Y., Lynch, S.V., Curtin, J. and Matin, A.** 2006: Effect of chromate stress on *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, **188**, 3371-338.
- 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.
- Adriano, D.C.** 1986: Trace elements in the environment. Chapter 5, Chromium, *Springer-Verlag*, New York.
- Aksu, Z., Gönen, F., and 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.
- Alcedo, J., and 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.
- APHA**, 1995: Standard methods for the examinations of water and wastewater, **19th** ed., *American Public Health Association*, Washington, DC
- Aravindhana, R., Sreeram K.J., Rao J.R., and Nair, B.U.** 2006: Biological removal of carcinogenic chromium (VI) using mixed *Pseudomonas* strains. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **53**, 71–79.
- Arnold, R., T. DiChristina, and M. R. Hoffman.** 1988: Reductive dissolution of Fe (III) oxides by *Pseudomonas sp* 200. *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 1081–1096.
- Ashwini C., Poopal R., and Seeta L.** 2008: Hexavalent chromate reduction by immobilized *Streptomyces griseus*. *Biotechnol. Lett.*, **30**, 1005–1010

- Asthana, S., Rusin, P., and 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.
- Aquino, S.F., and Stuckey, D.C.** 2004: Soluble microbial products formation in anaerobic chemostats in the presence of toxic compounds. *Water Res.*, **38**, 255-266.
- Badar, U., Ahmed, N., Beswick, A.J., Pattanapitpaisal, P., and Macaskie, L.E.** 2000: Reduction of chromate by microorganisms isolated from metal contaminated sites of Karachi, Pakistan. *Biotechnol. Lett.*, **22**, 829–836.
- Bae, W., Kang, T., Jung, J., Park, C., Choi, S., and Jeong, B.** 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., Vaughan, A.M. and Olson, G.J.** 1990: Chromium(VI)-resistant yeast isolated from a sewage-treatment plant receiving tannery wastes. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 913–918.
- Bartlett, R., and Kimble, J.M.** 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 aerobic marine eubacteria. *J. Bacteriol.*, 110(1): 402-429.
- Beveridge, T.J., and Mclean J.** 2000: Chromate reduction by a *Pseudomonad* isolated from a site contaminated with chromated copper arsenate, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. **67(3)**.
- Bianchi, V., and Levis, A.G.** 1984: Mechanisms of chromium genotoxicity. *Toxicological and Environmental Chemistry*, **9**, 1–25.
- Bianchi, V., Zantedeschi, A., Montaldi, A., and Majone, F.** 1984: Trivalent chromium is neither cyto-toxic nor mutagenic in permeabilized hamster fibroblasts. *Toxicol Lett.*, **23**, 51–59.
- Boily, J.F. and Fein, J.B.** 1996: Experimental study of cadmium-citrate co-adsorption onto α -Al₂O₃. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **60(16)**, 2929-2938.
- Bondarenko, B.M., and Ctardoobova, A.T.** 1981: Morphological and cultural changes in bacteria under the effect of chromium salts. *J. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. USSR.*, **4**, 99–100.
- Bopp, L.H., Chakrabarty, A.M. and Ehrlich, H.** 1983: Chromate resistance Plasmid in *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 155: 1105–1109.
- Brady, D., Stoll, A., and Duncan, J.R.** 1994: Biosorption of heavy metals cations by non-viable yeast biomass. *Environmental Technology*, **15**, 429–438.
- Bridgewater, L. C., Manning, F. C., Woo, E. S., Patiorne, S. R.** 1994: DNA polymerase arrest by adsorbed trivalent chromium. *Mol. Carcinog.*, **9**, 22- 133.

- Brochiero, E., Bonaly, J., and 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., and 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, 2nd Edition, 2nd Press, Butterworths, London, UK.
- Bux, F., and Kasan, H.C.** 1994: Comparison of selected methods for relative assessment of surface charge on waste biomass. *Water Science And Technology*, **20**, 73-76.
- Cabanes, F.J., Alonso, J.M., Castella, G., Alegre, F., Domingo, M. and 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, F.A.O, Okeke B.C., Bento F.M., Frankenberger W.T.** 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. and 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., and 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., and Moreno-Sanchez, R.,** 2001: Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Rewiew*, **25(3)**, 335–47.
- Cheng, G., and Li, X.** 2009: Bioreduction of chromium (VI) by *Bacillus* sp. isolated from soils of iron mineral area. *European Journal of Soil Biology*, **45**, 483–487.
- Cheng, Y., Xie Y., Zheng J., Wu Z., Chen Z., Ma X., Li B., and Lin Z.** 2009: Identification and charecterization of the chromium(VI) responding

protein from a newly isolated *Ochrabactrum anthropi* CTS-325. *Journal of environmental sciences* ISSN **1001-742** CN **11-2629/X**.

- Cheung, K.H., and Gu, J.D.** 2007: Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **59**, 8–15. Elsevier.
- Cheung, K.H, Lai, H.Y., and 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., and 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., and 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 and 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., and 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.
- Costerton, J.W., Geesey, G.G., and Cheng, K.J.** 1978: How bacteria stick. *Sci. Am.*, **238**, 86-95.
- Cowan, S.T., Holt, J.G., Liston, J., Murray, R.G.E., Niven, C.F., Ravin, A.W. and 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**, 217-243.
- Cupo, D.Y., and Wetterhahn, K.E.** 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. Master thesis. Department of Chemical Engineering, National Institute of Technology, Rourkela-769008, Orissa, India
- Davies, D.G.** 1999: Regulation of matrix polymer in biofilm formation and dispersion. In: Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.C. (ed). Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure and function. Berlin, Springer
- Davis, C. M., and Vincent, B. J.** 1997: Isolation and characterization of a biologically active chromium oligopeptide from bovine liver. Archives of biochemistry and biophysics, **339(2)**, pp. 335–343, Article No. BB979878.
- 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. and Pallaghy, C.K.** 1994 : Heavy metals: sources and biological effects. Advances in limnology series: Algae and water pollution. (Rai, L.C., Gaur, J.P. and Soeder, C. J.) 31-77 E. Schweizerbart'sche Press, Stuttgart.
- De Flora, 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.
- Dirilgen, N., and Doğan, F.** 2002: Speciation of chromium in the presence of copper and zinc and their combined toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **53**, 397- 403.
- Dodge, C.J., and Francis, A.J.** 1997: Biotransformation of binary and ternary citric acid complexes of iron and uranium. *Environ. Sci. Technol.*, **31**, 3062-3067.
- Donati, E., QuiIntana, M., and Curutchet, G.** 2001: Factors affecting chromium (VI) reduction by *Thiobacillus ferrooxidans*, *Biochemical Engineering Journal*, **9**, 11–15.
- Dubbin, W.E.** 2004: Influence of organic ligands on Cr desorption from hydroxy-Cr intercalated montmorillonite. *Chemosphere*, **54**, 1071–1077.
- Efstathiou, J. D., and McKay, L.L.** 1977: Inorganic salts resistance associated with a lactose-fermenting plasmid in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **130**, 257–265.
- Essar, D.W., Eberly, L., Hadero, A., and 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.
- Eweis, J.B., Ergas, S.J., Chang, D., and Schroeder, E.D.** 1998: Bioremediation principles, WCB, McGraw-Hill, Boston, 305.

- Fasulo, M. P., Bassi, M., and 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**, 59404.
- Flemming, C.A., Ferris, F.G., Beveridge, T.J., and 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 and Sons, New York.
- Francis, C.A., Obraztsova, A.Y., and Tebo, B.M.** 2000: Dissimilatory metal reduction by the facultative anaerobe *Pantoea agglomerans* SP1. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 543–548.
- Fourest, E., Canal, C., Roux, J.C.** 1994: Improvement of heavy metal biosorption by mycelial dead biomass (*Rhizopus arrhizus*, *Mucor miehei* and *Penicillium chrysogenum*), Control and cation activation. FEMS Microbiology review., **14**, 325-332.
- Fujie, K., Toda, K., and Ohtake, H.** 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., and 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.
- Gadd, G. M.** 1990 Biosorption. *Journal of Chemistry and Industry*, 421–426.
- Gadd, G.M., and Griffiths, A.J.** 1978: Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microb. Ecol.*, **4**, 303–317.
- 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.
- Ganguli, A., and Tripathi, A.K.** 2001: Inducible periplasmic chromate reducing activity in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a leather tannery effluent. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **11**, 355–361.
- Garbisu C, Alkorta I, Llama M.J., and Serra J.L.** 1998: Aerobic chromate reduction by *Bacillus subtilis*. *Biodegradation*, **9**, 133–41.
- Glaus, M.A., Hummel, W.H. and Loon, L.R.V.** 1995: Stability of mixed-ligand complexes of metal ions with humic substances and low molecular weight ligands. *Environ. Sci. Technol.*, **29**, 2159-2153.
- Gray, S.J., and K. Sterling.** 1950: The tagging of red cells and plasma proteins with radioactive chromium. *J. Clin. Invest.*, **29**, 1604–1613.

- 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.
- Guiball, E., Roulph, C., and 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.
- Guibaud, G., Tixier, N., Bouju, A., and Baudu, M.** 2004: Use of a polarographic method to determine copper, nickel and zinc constant of complexation by extracellular polymers extracted from activated sludge, *Process Biochem.*, **39**, 833–839.
- Guha, H, Jayachandran. K, and Maurrassé. F.** 2001: Kinetics of chromium (VI) reduction by a type strain *Shewanella alga* under different growth conditions. *Environmental Pollution*, **115**, 209–218.
- Gupta, V.K., Shrivastava, A.K. and Jain,N.** 2001: Biosorption of chromium (VI) from aqueous solutions by green algae *Spirogyra* species, *Water Research*, **35(17)**, 4079-4085.
- Hartford, W.H.** 1979: Chromium compounds, p. 82-120. *In encyclopedia of chemical technology.* John Wiley and Sons, New York
- He F., Hu W., and Li, V.** 2004: Biodegradation mechanisms and kinetics of azo dye 4BS by a microbial consortium, *Chemosphere*, **57**, 293–301.
- 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.
- Hirano, S.S. and 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.
- Horitsu, H., Futo, S., Miyazawa, Y., Ogai, S., and Kawai, K.** 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., and Andersen, G.L.** 2005: Whole-genome transcriptional analysis of heavy metal stresses in *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*, **187**, 8437–8449.
- Hung C.C., Santschi P.H., and Gillow J.B.** 2005: Isolation and characterization of extracellular polysaccharides produced by *Pseudomonas fluorescens* Biovar II. *Carbohydrate Polymers*, **61**, 141–147.
- Isa, M.H., Ibrahim,N., Aziz, H.A., Adlan, M.N., Sabiani, N.H., Zinatizadeh, A.A., and 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., and 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.
- Johnson, C., Hellerich, L.A., Nikolaidis, N.P., and Gschwend, P.** 2001: Ground water, **39(6)**, 895–903.
- Kantar Ç., Çetin Z. and Demiray H.** 2008: In situ stabilization of Cr (VI) in polluted soils using organic ligands: The role of galactronic, glucuronic and alginic acids. *Journal of Hazardous Materials*, **159**, 287-293.
- Kantar, C., Honeyman, B.D.** 2006 Citric Acid Enhanced Remediation of Soils Contaminated with Uranium by Soil Flushing and Soil Washing, *Journal of Environmental Engineering*, **132**, 247 .
- Kantar, C., and Honeyman B.D.** 2005a: Plutonium (IV) complexation with citric and alginic acids *Radiochimica Acta* , in press.
- Kantar, C., and Honeyman, B.D.** 2005b: Approaches to reactive transport modeling of metals in the presence of organic ligands. *Environmental Modeling and Software* (Manuscript in consideration).
- Kantar, C., Jeff G., Ruth H.A., Honeyman, B.D., and Arokiasamy J.F.** 2005: Determination of stability constants of U(VI)-Fe(III)-Citrate complexes. *Environmental Science and Technology*, **39**, 2161-2168.
- Kantar, C.** 2001: The role of citric acid in the transport of uranium (VI) through saturated porous media: The application of surface chemical models to transport simulations of bench-scale experiments, Ph.D. dissertation, *Environmental Science and Engineering*, Colorado School of Mines, Golden, CO, USA.
- Kapoor A., and 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., and Salem, H.** 1993: The toxicology of chromium with respect to its chemicals peciation: A review. *J. Appl. Toxicol.*, **13**, 217- 224.
- Kaufman, D.B.** 1970: Acute potassium dichromate poisoning in man. *Am. J. Diseases Children* **119**, 374–379.
- Kaufman, F., and Lovley, D.R.** 2001: Isolation and characterization of a soluble NADPH-dependent Fe(III) reductase from *Geobacter sulfurreducens*. *J. Bacteriol.* **183**, 4468–4476.
- Kawanishi, S., Inoue, S., and Sano, S.,** 1986: Mechanism of DNA Cleavage Induced by Sodium Chromate (VI) in the Presence of Hydrogen Peroxide. *J. Biol. Chem.*, **261**, 5952- 5958.
- Kent, B.D., Davis, J.A., Anderson, L.C.D., Rea, B.A. and Waite, T.D.**1994: Transport of chromium and selenium in the suboxic zone of a shallow

- aquifer: influence of redox and adsorption reactions. *Water. Resour. Res.* **31**, 1041-1050.
- Keyhan, M., Ackerley, D.F. and Matin, A.** 2003: Targets of improvement in bacterial chromate bioremediation. Remediation of contaminated sediments-2003. Proceedings of the Second International Conference on Remediation of Contaminated Sediments (Venice, Italy), M. Pellei and A. Porta (Eds.), Battelle Press, Columbus, OH, E-06.
- Kharab, P., and 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, ve S. Platin,** 1996: Atık sulardaki krom iyonlarının giderilmesinde *Bacillus subtilis*'in Kullanılması. *Ekoloji, Çevre Dergisi*, Sayı. **20**, 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.
- Komori, K., Rivas, Toda, A.K. and Ohtake, H.** 1989: Biological removal of toxic chromium using an *Enterobacter cloacae* strain that reduces chromate under anaerobic conditions. *Biotechnol. Bioeng.* **35**, 951–954.
- Kotas, J., and Stasicka, Z.** 2000: Commentary chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environ Pollut.*, **107**, 263-283.
- Kraemer, S.M., Xu, J., Raymond, K.N., and 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. and Philip, L.** 2005: Bioremediation of Cr (VI) in contaminated soils. *J Hazard Mater* **121**, 109–117.
- Köleli, N.,** 2004: Speciation of chromium in 12 agricultural soils from Turkey, *Chemosphere*, **57**, 1473-1478.
- Kwak, Y.H., Lee, D.S., and Kim, H.B.** 2003: *Vibrio harveyi* nitroreductase is also a chromate reductase. *Applied And Environmental Microbiology*. Vol. **69(8)**, 4390–4395.
- Laemmli, U.K.** 1970: Cleavage of structural proteins during the assambly 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.
- Laspidou, C.S. and Rittmann, B.E.** 2002: A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products and active and inert biomass". *Water Res*, **36**, 2711-2720.

- Laxman, R.S. and More, S.** 2002: Reduction of hexavalent chromium by *Streptomyces griseus*. *Minerals Engineering*, **15**, 831–837.
- Lenhart, J.J., and Honeyman, B.D.** 1999: Uranium(VI) sorption to hematite in the presence of humic acid. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **63**, 2891-2901.
- Levis, A.G., and 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., Bianchi, V., Tamino, G., and Pegoraro, B.** 1978: Cytotoxic effects of hexavalent and trivalent chromium on mammalian-cells invitro. *Brit. J. Cancer* **37**, 386–396.
- Li, F., and Tan, T.C.** 1994: Effect of heavy metal ions on the efficacy of a mixed Bacilli Bod Sensor. *Bio Sens. Bioelectron* **9**, 315–324.
- Liu, Y.G., Xu, W.H., Zeng, G.M., Li, X., and Gao, H.** 2006: Cr(VI) reduction by *Bacillus* sp. isolated from chromium landfill. *Elsevier. Process Biochemistry* **41**, 1981–1986
- Liu, Y.G., Xu, W.H., Zeng, G.M., Tang, C.F., and Li, C.F.** 2004: Experimental study on reduction by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Environ Sci*, **16(5)**, 797–801.
- Llagostera , M., Gariddo, S., Guerrero, R., and 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., and Congregado, F.**1993: Chromate reduction by resting cells of *Agrobacterium radiobacter* EPS-916. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 3516-3518.
- Logue, B.A., Smith, R.W., and Westall, J.C.** 2004: Role of surface alteration in determining the mobility of U(VI) in the presence of citrate: Implications for extraction of U(VI) from soils. *Environ. Sci. Technol.*, **38**, 3752-3759.
- Losi, M. E. and Frankenberger, W.T.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., and Frankenberger, W.T.Jr.** 1994: Factors affecting chemical and biological reduction of hexavalent chromium in soil. *Environ. Toxic. Chem.*, **13**, 1727–1735.
- Lovely, D.R.** 1996: Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature*, **382**, 445–448.
- Lovley. D.R.** 1994: Microbial reduction of iron, manganese, and other metals. *Advances in Agronomy*, **54**, 175–231.
- Lovley, D.R., and Phillips, E.J.P.** 1994: Reduction of chromate by *Desulfovibrio vulgaris* and its c3 cytochrome. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 726–728.
- Luo, H., Lu, Y., Shi, X., Mao, Y., and 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.

- Mabbett, A.N., Lloyd, J.R., and Macaskie, L.E.** 2002: Effect of complexing agents on reduction of Cr (VI) by *Desulfovibrio vulgaris* ATCC 29579. *Biotechnol. Bioeng.*, **79**(4), 389–397.
- Mandelbaum, R.T., Allan, D.L., and 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., and 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.
- Mayes, M.A., Jardine, P.M., Larsen, I.L., Brooks, S.C., and 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. and 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., and 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. and 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.
- Mercan Dogan, N., Kantar, C., Gulcan, S., Dodge, C.J., Coskun Yilmaz, B., and Mazmanci, M.A.,** 2011: Chromium(VI) bioremoval by *Pseudomonas* bacteria: Role of microbial exudates for natural attenuation and biotreatment of Cr (VI) contamination. *Environ. Sci. Technol.*, **45**, 2278–2285.
- 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.
- Mertz, W.** 1993: Chromium in human nutrition: a review. *J Nutr.*, **123**, 626–633.
- Miranda, A.T., Gonzales, M.V., Gonzales, G., Vargas, E., Campos-Garcia, J. and Cervantes, C.,** 2005: Involvement of DNA helicases in chromate resistance by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mutation Research*, **578**, 202–209.
- Mohan, D., and Pittman-Jr., C.U.** 2006: Activated carbons and low cost adsorbents for remediation of tri- and hexavalent chromium from water. *Journal of Hazardous Materials*, **B137**, 762–811.

- Molakwane, P.E.** 2010: Simulation of in situ bioremediation of Cr (VI) in groundwater aquifer environments using a microbial culture barrier. Doctoral thesis. University of Pretoria, Chemical Engineering,.
- Muraleedharan, T.R., and Venkobachar, L.I.** 1994: Further insight into the mechanism of biosorption of heavy metals by *Genoderma lucidum*. *Environmental Technology*, **15**, 1015–1027.
- Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., and Tenover, R.H.** 1995: Manual of clinical microbiology, **6th** Edition, *ASM Pres.*, Woods, G. L. and Washington, D. C, 1327-1341.
- Myers, C.R., Carstens, B.P., Antholine, W.E., and 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 algerle biyosorpsiyonu. Süleyman Demirel Üniversitesi, *Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **10(2)**, 284–291.
- NAS**, 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.
- Nies, D.H., and Silver, S.** 1989: Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.*, **171**, 896–900.
- Nishioka, H.** 1975: Mutagenic activities of metal-compounds in bacteria. *Mut. Res.* **31**, 185–189.
- Nishio, A., and 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. and 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., and Choi, S.C.** 1997: Reduction of hexavalent chromium by *Pseudomonas aeruginosa* HP014. *J. Microbiol.* **35**, 25–29.
- Ohtake, H., Cervantes, C., and Silver, S.** 1987: Decreased chromate by *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. *J. Bacteriol.*, **169**, 3853–3856.

- Ohtake, H., Fujii, E., and 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.
- Özdiş, Ö.** 2005: Krom (VI) birikiminin *Chlorella vulgaris*'te hücre sayısı, klorofil, büyüme hızı, protein ve şeker miktarlarına etkileri. Yüksek lisans tezi. Çukurova Üniversitesi, FBE-Biyoloji Anabilim Dalı.
- Pal, A., ve Paul, A.K.** 2004: Aerobic chromate reduction by chromium-resistant bacteria isolated from serpentine soil. *Microbiological Research*, **159**, 347–354. Elsevier.
- Palmer, C.D. and 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, D., Yun, Y.S., and Park, Y.M.** 2004: Reduction of hexavalent chromium with the Brown seaweed *Ecklonia* Biomass. *Environ. Sci. Technol.*, **38**, 4860–4864.
- Park, C.H., Gonzalez, C.F. Ackerley, D.F. Keyhan, M., and Matin, A.** 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, C.H., Keyhan, M., Wielinga, B., Fendorf, S., and Matin, A.** (2000). Purification to homogeneity and characterization of a novel *Pseudomonas putida* chromate reductase. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1788–1795.
- Peterson, R.L., Banker, K. J., Garcia, T. Y., Carmen F.** 2008: Works isolation of a novel chromium (III) binding protein from bovine liver tissue after chromium (VI) exposure. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **102**, 833–841.
- Petrilli, F.L., and De Flora, S.** 1978: Metabolic deactivation of hexavalent chromium mutagenicity. *Mutat. Res.*, **54**, 139–147.
- Petrilli, F.L., and De Flora, S.** 1977: Toxicity and mutagenicity of hexavalent chromium on *Salmonella-typhimurium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 805–809
- Philip, L., Iyengar, L. and C. Venkobachar.** 1998: Cr (VI) reduction by *Bacillus coagulans* isolated from contaminated soils. *J. Environ. Eng.-ASCE* **124**, 1165–1170.
- Poole, K. and Hancock Robert, E.W.** 1984: Phosphate transport in *Pseudomonas aeruginosa*, *Eur. J. Biochem.*, **144**, 607-612

- Powell, R.M., Puls, R.W., Hightower, S.K. and Sabatini, D.A.** 1995: Coupled iron corrosion and chromate reduction: Mechanisms for subsurface remediation, *Environ. Sci. Technol.* **29**, 1913-1922.
- Priester, J.H., Olson, S.G., Webb, S.M., Neu, M.P., Hersman, L.E. and Holden P.A.** 2006: Enhanced Exopolymer Production and Chromium stabilization in *Pseudomonas putida* unsaturated biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988–1996.
- Puzon, G.J., Roberts, A.G., Kramer, D.M., and 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.
- Rahman, M. U., Gul, S., HAQ, M. Z. U.** 2007: Reduction of chromium (VI) by locally isolated *Pseudomonas* sp.C-171. *Turk J. Biol.*, **31**, 161-166
- Rai, D., Sass, B.M., and 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., and 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. and Nielsen, M.H.** 1998: Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Mutat. Res.* **418**, 113-119.
- Rao Rathinam A.J.R. , Sreeram K.J., and Nair B.U.** 2007: Biological removal of carcinogenic chromium (VI) using mixed *Pseudomonas* strains, *J. Gen. Appl. Microbiol*, 532: 71-91 Redman, A.D., Macalady, D.L. and Ahmann, D., Natural organic matter affects arsenic speciation and sorption onto hematite, *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 2889-2896.
- Redman, A.D., Macalady, D.L. and Ahmann, D.** 2002: Natural organic matter affects arsenic speciation and sorption onto hematite. *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 2889-2896.
- 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., and 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.

- Ross, D. S., R. E. Sjogren, and R. J. Bartlett.** 1981: Behavior of chromium in soils. 4. Toxicity to microorganisms. *J. Environ. Qual.* **10**, 145–148.
- Sabra, W., Zeng, A.P., and Deckwar, W.D.** 2001: Bacterial alginate: physiology, product quality, and process aspects. *App. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 315-325.
- Sadhukhan, P.C., Ghosh, S., Chaudhuri, J., Ghosh, D.K. and 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.
- Salehizadeh, H., and Shojaosadati, S.A.** 2003: Removal of metal ions from aqueous solution by polysaccharide produced from *Bacillus firmus*, *Water Res.* **37**, 4231–4235.
- 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 A.R, Makhdoom M., Haq R.U.** 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.. Doctoral thesis. University of Florida, Soil and Water Science.
- Shen, H. and 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.
- Shen, H., and 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., and Wang, Y.T.** 1993: Characterization of enzymatic reduction of hexavalent chromium by *Escherichia coli* ATCC 33456. *Applied Environmental Microbiology*, **59(11)**, 3771-3777.
- Shi, X., and 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.
- Siegel , S. M., Galun, M., and Siegel , B. Z.** 1990: Filamentous fungi as biosorbent: A review. *Water air And Soil Pollution.* **53**, 335–344.

- 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., and 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., and Garg S.K.** 2002: Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. *Chemosphere* **48**, 427–435.
- Srivastava, S., Prakash, S., and 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.
- Sutherland, I.W.** 1984: Microbial exopolymers-their role in microbial adhesion in aqueous systems *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, **10**, pp. 173–201
- Suzuki, Y., and Fukuda, K.** 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., and 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. and Obraztsova, A.Y.** 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., and 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.
- Theodotou, A., Stretton, R.J. Norbury, A.H. and Massey, A.G.** 1976: Morphological effects of chromium and cobalt complexes on bacteria. *Bioinorg. Chem.* **5**, 235–239.
- Thompson, D.K., Chourey, K., Wickham, G. S., Thieman, S. B., VerBerkmoes, N.C., Zhang, B.A., McCarthy, T., Rudisill, M.A., Shah M. and**

- Hettich R.L.** 2010: Proteomics reveals a core molecular response of *Pseudomonas putida* F1 to acute chromate challenge. *BMC Genomics*, **11**,311 <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/311>.
- Thompson, M.R., Verberkmoes, N.C., Chourey, K., Shah, M., Thompson, D.K., and Hettich, R.L.** 2007: Dosage-dependent proteome response of *Shewanella oneidensis* MR-1 to acute chromate challenge. *Journal of Proteome Research*, **6**, 1745–1757.
- Tobin, J.M., Cooper, D.G., and Neufeld, R.J.**, 1984: Uptake of metal ions by *Rhizopus arrhizus* biomass. *Applied Environmental Microbiology*, **47**, 821–824
- Tobin, J.M., and 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., and Lanzirotti, 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.
- Travieso, L., Canzarez, R.O., Borja, R., Benitez, F., Dominguez, Z.A.R., Dupeyron, R., and Valiente, V.** 1999: Heavy metal removal by microalgae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **62**, 144- 151.
- Tsapakos, M.J., Hampton, T.H. and Wetterhahn, K.E.** 1983: Chromium(VI)-induced DNA lesions and chromium distribution in rat-kidney, liver, and lung. *Cancer Research* **43**, 5662–5667.
- Tsapakos, M. J., and Wetterhahn, K.E.** 1983: The interaction of chromium with nucleic-acids. *Chem-Biol. Interact.* **46**, 265–277.
- Tsuda, H., and Kato, K.** 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., and Carmiol, N.S.**, 1996: Isolation of hexavalent chromium-reducing anaerobes from hexavalent chromium-contaminated and noncontaminated environments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **44**, 683–688.
- Uyguner, C.S. and Bekbolet, M.** 2003: Evaluation of humic acid, chromium (VI) and TiO₂ ternary system in relation to adsorptive interactions”, *Applied Catalysis B: Environmental*, **49**, 267-275.
- 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., and 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., and Levy, L.S.** 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., **2**, Wiley, New York.
- Wang B.J., and Yang H.F., Li W.Z.** 1998: Studies on reduction of hexavalent chromium by fungi. *Acta Microbiol Sinica*, **38(2)**, 108–13.
- Wang, Y.T., and 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 cacteria, *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., Mori, T., Komori, K., Sasatsu, M., Toda, K., and Ohtake, H.** 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., Mori, T., Toda, K., and Ohtake, H.** 1989b: Membrane-associated chromate reductase activity from *Enterobacter cloacae*. *J. Bacteriol.* **172**, 1670–1672.
- Wingender, J., Neu, T.R., and Flemming, H.C.** 1999: What are bacterial extracellular polymeric substances? In: Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.C. (eds). *Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure and function*. Berlin, Springer.
- Wittbrodt, P.R., and 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.
- Wittbrodt, P.R., and Palmer, C.D.** 1995: Reduction of Cr (VI) in the presence of excess soil fulvic acid. *Environ. Sci. Technol.*, **29**, 255-263.
- Wong, P.T.S., and 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.
- 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, and H. Ohtake.** 1993: Kinetics and modeling of hexavalent chromium reduction in *Enterobacter cloacae*. *Biotechnol. Bioeng.* **41**, 129–133.

- Yang, J., Tang, T., Li, F., Zhou, W., Liu, J., Tan, Z., Zheng, W., yang, Y., Zhou, X. and Hu, J.** 2009: Experimental study of the effects of marrow mesenchymal stem cells transfected with hypoxia-inducible factor-1 α gene. *J. Biomed Biotechnol.*,doi: 10.1155/2009/128627 PMID: PMC2705776
- Yassi, A., and 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.
- Zahoor A., and 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*, **21**,814–820
- Zakaria Z.A., Zakaria Z. , Surif S., and 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.
- Zhang, L., Zhao, L., Yu, Y.T., and 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., and Zhao K.** 2008: Anaerobic reduction of hexavalent chromium by bacterial cells of *Achromobacter* sp. Strain Ch1 *Microbiological Research*, **163**, 616-623.

www.fenokulu.com

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Göksel DOĞAN

Doğum Tarihi : 17051985

Yazışma Adresi : Pamukkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Bölümü

20070 Denizli, Türkiye

Tel : 05434499813

Email : gksldogan@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Yüksek Lisans (2009-2012) : Pamukkale Üniversitesi

Biyoloji Bölümü

Moleküler Ana Bilim Dalı

Erasmus Programı (2011-2012) : Nicolaus Copernicus Üniversitesi

Biyoloji ve Yerbilimleri Fakültesi

Mikrobiyoloji Bölümü

Lisans (2004-2008) : Pamukkale Üniversitesi

Biyoloji Bölümü



Lisans Bitirme Tezi ve Tez Danışmanı: “Termofilik Bacillus (*Bacillus stearothermophilus* ve *B. Licheniformis*) türlerinin Cr (VI) indirgemesi ve eksopolisakkarit(EPS) üretimi” Doç. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN, PAÜ, Denizli, 2008

Yüksek Lisans Tez Başlığı ve Tez Danışmanı: “*Pseudomonas* cinsi bakterilerde hegzavalent krom indirgemeye organik moleküllerin etkisi” Doç. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN, PAÜ, Denizli, 2012.