



Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi

dergi web sayfası: <http://dergipark.gov.tr/nevbiltek>

Makale Doi: **10.17100/nevbiltek.402196**

Geliş tarihi: 06.03.2018 Kabul tarihi: 31.12.2018



Atık Sulardan İzole Edilen *Pseudomonas* spp.'lerin Ekzopolisakkarit Üretimine Bazı Ağır Metallerin Etkisi

Süleyman Yalçın¹, Şahlan Öztürk², Berrin Keloğlu³

¹Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı, Ankara

ORCID ID: 0000-0003-1434-2717

²Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Nevşehir

ORCID ID: 0000-0000-0000-0000

³Nevşehir Halk Sağlığı Laboratuvarı, Nevşehir

ORCID ID: 0000-0003-4514-4457

Öz

Bu çalışmada atık su arıtma havuzlarından alınan örneklerden 50 *Pseudomonas* spp. izole edilmiştir. Koloni morfolojisi, Gram boyama ve VITEK 2 Compact 30 (biomerieux) tür tanımlama çalışmaları sonucunda, izolatların *Pseudomonas aeruginosa* (27) ve *P. stutzeri* (23) türleri olduğu belirlenmiştir. Tanımlanan suşlar 10 ppm Cr(VI), Cd(II), Cu(II) ve Mn(II) konsantrasyonlarına maruz bırakılarak bu metallerle karşı canlılıkları tespit edilmiş ve her metal için canlılığını en çok koruyan suşlar seçilmiştir. Canlılık değerlerine göre seçilen izolatlar uygulanacak metallerin 4 farklı derişimi belirlenmiştir. Belirlenen metal konsantrasyonları seçilen suşlara uygulanarak elde edilen sonuçlara göre yüzde ölüm değerleri ve metallerin öldürücü dozu (lethal concentration, LC50) hesaplanmıştır. Her metal için seçilen suşlar, belirlenen konsantrasyonlarda metale maruz bırakılarak EPS (ekzopolisakkarit) izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Cr(VI) konsantrasyonunda en yüksek EPS üretiminin *P. stutzeri* S46 suşunda (74,68 mg/L), en düşük ise *P. stutzeri* S18 (39,37 mg/L) suşunda olduğu; Cd(II) konsantrasyonunda en yüksek EPS üretiminin *P. stutzeri* S23 suşunda (60,93 mg/L), en düşük ise *P. aeruginosa* S10 suşunda olduğu (40,93 mg/L) belirlenmiştir. Cu(II) konsantrasyonunda en yüksek EPS üretiminin *P. stutzeri* S45 suşunda (74,06 mg/L), en düşük EPS üretiminin ise *P. aeruginosa* S8 suşunda olduğu (28,28 mg/L) görülmüştür. Mn(II) konsantrasyonunda en yüksek EPS üretiminin *P. stutzeri* S44 suşunda (46,40 mg/L), en düşük EPS üretiminin ise *P. stutzeri* S50 suşunda olduğu (26,56 mg/L) tespit edilmiştir. Sonuç olarak artan metal dozlarına maruz kalan *Pseudomonas* spp. suşlarının ürettikleri EPS miktarlarında da artış olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma ile atık sulardan izole edilen *Pseudomonas* spp. suşlarının bazı ağır metallerin EPS üretimine etkisi biyoteknolojik açıdan vurgulanmıştır.

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

Circular Environmental Policies in The Industrial Production

Abstract

In this study, 50 *Pseudomonas* spp. have been isolated from the instances of waste water purification pool. 27 *Pseudomonas aeruginosa* and 23 *Pseudomonas stutzeri* strains were detected according to colony morphologies, Gram staining and type definitions that have been made in the vitek 2 compact 30 (biomerieux) device. Identified strains were exposed by 10 ppm Cr(VI), Cd(II), Cu(II) and Mn(II) concentrations and detected their viabilities against these metals and by this way determined the most resistant strains for each metal. Also, four different concentrations of these metals were determined according to viability of strains. % death values of strains were determined by treated with metal concentrations and LC₅₀ values of metals were calculated. Strains selected for each metal by exposing them to the specified concentrations, EPS isolation has been carried out. In Cr(VI) concentration it has been found that the *Pseudomonas stutzeri* of the highest EPS production is S46 strains (74.68 mg/L) while the lowest *Pseudomonas stutzeri* is S18 (39.37 mg/L). In Cd(II) concentration; the *Pseudomonas stutzeri* of the highest EPS production is S23 (60.93 mg/L), while the lowest EPS production is *Pseudomonas aeruginosa* S10 strains (40.93 mg/L). In Cu(II) concentration, the *Pseudomonas stutzeri* of the highest EPS production is S45 strains (76.06 mg/L) while the lowest EPS production is *Pseudomonas aeruginosa* S8 strains (28.28 mg/L). In Mn (II) concentration, the *Pseudomonas stutzeri* of the highest EPS production is S44 strains (46.40 mg/L), while the *Pseudomonas stutzeri* of the lowest EPS production is S50 strains (26.56 mg/L). As a result, exposed to increasing metal dose of *Pseudomonas* spp., the amount of EPS produced by the

strains has been found to be increased. By this study it has been expressed the effect of some heavy metals of *Pseudomonas* spp strains, which have been isolated from wastewater, to the EPS production in terms of biotechnology.

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

1. Giriş

Su kirliliği su ortamının doğal dengesinin bozulması olarak tanımlanan, çevre kirliliğinin önemli bir kısmını oluşturan ve insan, hayvan, bitki hayatını tehdit eden etmenlerden biri olarak görülmektedir. Atık su ise; endüstride, tarımda ve kentlerde kullanıldıktan sonra akarsu, deniz ve göllere atılan sulara denilmektedir [1 ve 2].

Yoğunlukları 5 g/cm^3 ' den büyük olan ağır metaller teknolojik öneme sahip oldukları için çeşitli endüstrilerde yaygın olarak kullanılmaktadırlar [3]. Atık sulara mevcut ağır metal iyonları [krom(Cr), bakır (Cu), mangan (Mn), kadmiyum (Cd) vs.] suda yaşayan canlılarda biyobirikime sebep olarak toksik etkiyle ekosistemi kirletmekte ve insan sağlığını da ileri derecede tehlikeye sokmaktadır.

Cr, sanayide sıkça kullanılır, toprak ve suya karıştığı zaman çevre açısından çok zararlı bir hal almaktadır [4]. EPA, WHO ve Avrupa standartları doğal sulara maksimum $50 \text{ } \mu\text{g/L}$ Cr(VI)'ya izin vermektedirler [5]. Cd (II) genellikle çinko ile kombine haldedir ve yeryüzünün hemen her yerinde bulunmaktadır, ayrıca gübre ve pestisitte bol miktarda bulunduğu için en çok toprağa karışmaktadır [5]. Sulara meydana gelen Cr kirliliği ise sanayi atıklarından kaynaklanmaktadır [6]. Cu, doğal suların pH değerine bağlı olarak çözünürlük sınırındaki azalma sonucu suların dibinde çökelmekte ve doğal yeraltı tatlı suların çökeleklerinde ve deniz dibinde yaklaşık 2-740 mg/kg (kuru ağırlık) bulunmaktadır [7 ve 8]. Mn yer kabuğunda bol miktarda bulunmaktadır. Doğal sulara II ve IV değerlikli oksidasyon kademelerinde bulunan Mn içme suyu içerisinde estetik problemlere neden olabilmektedir [9 ve 10].

Doğada kendi kendini temizleme olarak bilinen süreç, sanayileşme ve kentleşmenin büyümesi ile birlikte atık suların yeniden kendini temizlemesini sağlamada yetersiz kalmakta ve dolayısı ile artımda yeni teknolojilerin oluşturulması ve geliştirilmesiyle ilgili çalışmalar giderek önem kazanmaktadır. Son yıllarda biyoteknoloji alanındaki araştırmalar mikroorganizmalar yardımı ile sulardaki atık maddelerin parçalaması ve yeni ürünlerin elde edilmesi esasına dayanmaktadır [11 ve 12]. Mikroorganizmalar metali tamamen parçalayamamakta, ancak başka bir forma dönüştürerek toksik etkilerini azaltmakta veya ortadan kaldırmaktadırlar.

Atık suların ağır metallerden arıtımında kullanılan klasik yöntemler (ozonlama, kimyasal çöktürme, adsorpsiyon, iyon değişimi, koagülasyon-flokülasyon vb.) yatırım ve işletme maliyetlerinin yüksekliği, arıtma sonrasında yeni kirlenmelerin oluşması gibi nedenlerden dolayı pratik ve ekonomik değildir. Biyolojik olarak mikroorganizmalar ile ağır metal giderimi; metal iyonlarının hücre içine alınması (biyobirikim), ağır metalin mikroorganizmanın yüzeyine tutunması (biyosorpsiyon, adsorpsiyon) ve metallerin mikroorganizma tarafından salgılanan biyolojik ajanlarla kimyasal dönüşümü şeklinde tanımlanmaktadır [13]. Mikroorganizmalar, inorganik iyonları biriktirme ve ayırmada yüksek bir potansiyele sahip olma özellikleriyle, atık sulardaki ağır metal iyonlarının ekonomik olarak giderimi ve kazanımında kullanılabilirler [14].

Ekzopolisakkaritler (EPS), bakteri olumsuz çevre şartlarına maruz kaldığında ürettiği metabolik ürünlerdendir [15 ve 16]. EPS bazı metalleri indirgeyebilmektedir, metal ve iyonları şelatlama gücüne sahiptir, bu sebeple ağır metallerin gideriminde önemli ve etkilidir [17]. Yapılan birçok araştırmada ağır metale maruz kalan hücrelerin ekzopolisakkarit miktarlarının arttığı gözlemlenmiştir [18 ve 19]. Mikrobiyal EPS simbiyoz ve biyofilm oluşturma ve fagositozdan korunma gibi görevlerin yanı sıra stres şartlarına dirençlilik sağlamaktadır [20]. EPS, jelleştirici, stabilize edici, emülsifiye edici ve antioksidan özelliklerinden dolayı çeşitli endüstrilerde uygulama için büyük ilgi görmektedir [21]. EPS' ler fiziki, kimyasal ve reolojik (maddenin sıvı halindeki özellikleri) özellikleriyle yeni biyomateryaller gibi hareket ederler ve yapıştırıcı, deterjan, tekstil, mikrobiyal olarak zenginleştirilmiş petrol iyileştirmeleri (NEOR), dere yatağı temizlemeleri, atık su iyileştirmeleri, mayalanma, kozmetik, eczacılık ve gıda katkı maddesi olarak oldukça geniş kullanım alanlarına sahiptir [22 ve 23]. EPS'ler ile ilgili yapılan yeni mühendislik çalışmalarıyla bu maddelerin çalışma prensipleri, yeni oligosakkaritlerin, enzimlerin üretilmesi ve bazı EPS'leri hedefleyen proteinlerin kodlarının çözülmesiyle ilgili gelecek vadede teknolojik çalışmalar yapılmaktadır [24]. Bu çalışmada, atık su örneklerinden izole edilen *Pseudomonas* spp. izolatları kullanılarak bu izolatların çeşitli çevrelerde diğer mikroorganizmalara nazaran canlı kalabilme şansını artıran ve onları üstün kılan ayrıca atık suların temizlenmesinde etkili olan ekzopolisakkarit metabolitlerini, atık sularda sıklıkla görülen ağır metallerin (krom, kadmiyum, bakır ve mangan) varlığında üretim yetenekleri araştırılmıştır.

2. Materyal ve Metot

Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar: Atık su tesisinde bulunan giriş havuzu, kum ve yağ tutucu havuz, havalandırma havuzu, çökeltim havuzu ve çıkış havuzu olmak üzere beş ayrı havuzdan farklı günlerde atık su örnekleri alınarak, Pseudomonas Agar F (base) (Merck KGaA) ekilerek, 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Pseudomonas Agar F üzerinde tek düşen kolonilerden pasaj yapılmıştır. 24 saatlik inkübasyondan sonra izolatlar koloni morfolojisi, Gram boyama ve VITEK 2 Compact 30 (biomerieux) sonuçlarına göre tiplendirilmiştir.

Çalışmada kullanılan metaller: Atık suların alınan numuneler ICP-MS ile analiz edilerek Cr(VI), Cd(II), Cu(II) ve Mn(II) değerleri tespit edilmiştir.

Çalışmada Cr(VI), Cd(II), Cu(II) ve Mn(II) olmak üzere 4 farklı metalin sırasıyla; 2000 ppm, 4000 ppm, 2000 ppm, 2000 ppm oranında hazırlanmış ana stoklarından (Mn hariç) Cu için 500 ppm’ lik, Cr ve Cd için 100 ppm’ lik ara çözelti stokları kullanılmıştır.

[1] Bakterilerin metal toleranslarının tespiti: Bakteriler 1 Mc Farland bulanıklığa ayarlanarak Nutrient Broth (NB) besiyerinde (Merck KGaA) 10 ppm’ lik metal derişimleriyle 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından mikropate okuyucu (Ivymen-2100-C) ile 630 nm’ de okunarak bakteri yoğunlukları belirlenmiştir.

Seçilen suşların belirlenen metal derişimlerinde büyüme eğrileri: Cr(VI) metali için S9, S17, S18, S24 ve S46 suşlarına 5, 7,5, 10 ve 15 ppm’ lik derişimler verilmiştir. Cd(II) metali için S10, S23, S32, S44 ve S50 suşlarına 10, 20, 30 ve 40 ppm’ lik derişimler verilmiştir. Cu(II) metali için S7, S8, S25, S32 ve S45 suşlarına 10, 20, 40 ve 80 ppm’ lik derişimler verilmiştir. Mn(II) metali için S10, S29, S32, S44 ve S50 suşlarına 100, 200, 300 ve 400 ppm’ lik derişimler verilmiştir. Bakteri – metal karışımı besiyerine inoküle edilerek 37°C’ de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun belirli peryotlarında (1., 4., 8., 12., 16. ve 24. saatlerde) mikropate okuyucu (ivymen-2100-C) ile 630 nm’ de bakteri yoğunlukları ölçülmüştür.

LC50 tayin metodu: LC50 tayin metodu ile 24 saatlik sürede, farklı konsantrasyonlarda metal içeren ortamda bulunan bakterilerin %50’sini öldüren miktar hesaplanmıştır LC50 değerleri, 24. saate ait metale maruz kalan hücrelerin biyokütlelerinin kontrol hücrelerin biyokütlelerinden çıkarılarak hesaplanmıştır. Canlı hücrelerin % 50’sini öldüren metal dozları (LC50), % 95 güven sınırlarında probit analizleri ile tespit edilmiştir [25 ve 26].

EPS izolasyon metodu: Bakteriler NB besiyerinde 3 kez aktifleştirilmiştir, 3. aktifleştirmenin 24 saatlik inkübasyonundan sonra EPS üretimleri belirlenmiştir. EPS izolasyonu Li ve ark. 2016 ve Kson Zekova ve ark. 2016’ ya göre yapılmıştır. Elde edilen EPS 1 mL saf suda çözülerek -40°C’de muhafaza edilmiştir. EPS miktarının tespiti Dubois, 1956’ ya göre yapılmıştır. EPS üretim miktarlarını belirlemek için 5- 100 mg/L arasında değişen oranlarda D-glukoz kullanılarak standart bir eğri çıkarılmıştır. Bu standarda göre örneklerin EPS miktarları mg/l olarak belirlenmiştir [27 ve 28].

Kontrol ve karşılaştırma için, metal içermeyen NB besiyerinde geliştirilen 50 bakterinin EPS üretimleri belirlenmiş, metaller için seçilen suşlara 4 farklı derişimde ve LC50 derişiminde metal verilerek EPS izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

3. İstatistiksel Veri

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

4. Bulgular

Çalışmada kullanılan bakterilerin kodları, türleri, izolasyon kaynakları ve Gram boyama sonuçları Tablo 1’ de verilmiştir.

Tablo 1. Bakterilerin kodları, tür adları, kaynağı ve Gram boyama sonuçları

İZ OLAT NO	TÜR ADI	KAYNAK	GRAM BOYAMA
S1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Giriş Havuzu	(-) Gram
S2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Giriş Havuzu	(-) Gram
S3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kum ve Yağ Tutucu Havuz	(-) Gram
S4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kum ve Yağ Tutucu Havuz	(-) Gram
S5	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Havalandırma Havuzu	(-) Gram
S6	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Havalandırma Havuzu	(-) Gram
S7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Çökeltim Havuzu	(-) Gram
S8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Çökeltim Havuzu	(-) Gram
S9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Çıkış Havuzu	(-) Gram
S1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Çıkış Havuzu	(-) Gram
0	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Giriş Havuzu	(-) Gram
1	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Giriş Havuzu	(-) Gram
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kum ve Yağ Tutucu Havuz	(-) Gram
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kum ve Yağ Tutucu Havuz	(-) Gram
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Havalandırma Havuzu	(-) Gram
5	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Havalandırma Havuzu	(-) Gram
6	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Çökeltim Havuzu	(-) Gram
7	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Çökeltim Havuzu	(-) Gram
8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Çıkış Havuzu	(-) Gram
9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Çıkış Havuzu	(-) Gram
0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Giriş Havuzu	(-) Gram
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Giriş Havuzu	(-) Gram
2	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Kum ve Yağ Tutucu Havuz	(-) Gram
3	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Kum ve Yağ Tutucu Havuz	(-) Gram
4	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Havalandırma Havuzu	(-) Gram
5	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Havalandırma Havuzu	(-) Gram

6				(-)	
	S2	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Çökeltim Havuzu		Gram
7				(-)	
	S2	<i>Pseudomonas</i>	Çökeltim Havuzu		Gram
8		<i>aeruginosa</i>		(-)	
	S2	<i>Pseudomonas</i>	Çıkış Havuzu		Gram
9		<i>aeruginosa</i>		(-)	
	S3	<i>Pseudomonas</i>	Çıkış Havuzu		Gram
0		<i>aeruginosa</i>		(-)	
	S3	<i>Pseudomonas</i>	Giriş Havuzu		Gram
1		<i>aeruginosa</i>		(-)	
	S3	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Giriş Havuzu		Gram
2				(-)	
	S3	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Kum ve Yağ Tutucu Havuz		Gram
3				(-)	
	S3	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Kum ve Yağ Tutucu Havuz		Gram
4				(-)	
	S3	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Havalandırma Havuzu		Gram
5				(-)	
	S3	<i>Pseudomonas</i>	Havalandırma Havuzu		Gram
6		<i>aeruginosa</i>		(-)	
	S3	<i>Pseudomonas</i>	Çökeltim Havuzu		Gram
7		<i>aeruginosa</i>		(-)	
	S3	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Çökeltim Havuzu		Gram
8				(-)	
	S3	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Çıkış Havuzu		Gram
9				(-)	
	S4	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Çıkış Havuzu		Gram
0				(-)	
	S4	<i>Pseudomonas</i>	Giriş Havuzu		Gram
1		<i>aeruginosa</i>		(-)	
	S4	<i>Pseudomonas</i>	Giriş Havuzu		Gram
2		<i>aeruginosa</i>		(-)	
	S4	<i>Pseudomonas</i>	Kum ve Yağ Tutucu Havuz		Gram
3		<i>aeruginosa</i>		(-)	
	S4	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Kum ve Yağ Tutucu Havuz		Gram
4				(-)	
	S4	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Havalandırma Havuzu		Gram
5				(-)	
	S4	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Havalandırma Havuzu		Gram
6				(-)	
	S4	<i>Pseudomonas</i>	Çökeltim Havuzu		Gram
7		<i>aeruginosa</i>		(-)	
	S4	<i>Pseudomonas</i>	Çökeltim Havuzu		Gram
8		<i>aeruginosa</i>		(-)	
	S4	<i>Pseudomonas</i>	Çıkış Havuzu		Gram
9		<i>aeruginosa</i>		(-)	
	S5	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Çıkış Havuzu		Gram
0				(-)	

Atık su numuneleri ICP-MS ile analiz edilerek Cr(VI) 6,86 ppm, Cd(II) 7,18 ppm, Cu(II) 16,2 ppm ve Mn(II) 14,92 ppm olarak tespit edilmiştir.

Bakterilerin metal toleranslarının tespiti: Bakterilerin 4 farklı metalde yüzde ölüm değerleri Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Bakterilerin 10 ppm'lik 4 farklı metalde % ölüm değerleri

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

6	S2	97,93±3,	100±4,0	28,13±1,2	3,23±0,0
7	S2	63,32±2,	51,96±2,2	45,83±2,1	12,46±0,
8	S2	91,95±3,	66,40±2,8	40,84±2,0	15,55±0,
9	S2	88,51±3,	68,15±2,8	12,43±0,5	0
0	S3	70,96±3,	40,97±2,0	48,32±2,1	6,05±0,0
1	S3	89,62±3,	100±4,0	27,48±1,2	7,21±0,0
2	S3	73,15±3,	14,11±0,6	0	0
3	S3	88,54±3,	104,00±4,0	16,86±0,6	14,18±0,
4	S3	62,03±2,	65,15±2,8	10,35±0,5	19,27±0,
5	S3	58,66±2,	100±4,0	22,27±0,9	18,61±0,
6	S3	61,95±2,	23,74±0,9	18,55±0,9	9,94±0,0
7	S3	82,14±3,	58,97±2,5	21,55±0,9	11,25±0,
8	S3	87,95±3,	64,87±2,7	40,82±2,0	24,13±0,
9	S3	87,84±3,	65,45±2,7	17,91±0,7	14,33±0,
0	S4	92,57±3,	64,91±2,7	9,29±0,05	9,12±0,0
1	S4	85,47±3,	100±4,0	46,39±2,1	31,97±1,
2	S4	85,83±3,	47,25±2,1	9,68±0,05	7,20±0,0
3	S4	59,53±2,	70,89±3,0	45,24±2,1	9,17±0,0
4	S4	40,12±2,	0	36,87±1,3	0
5	S4	92,66±3,	54,66±2,4	0	21,25±0,
6	S4	29,08±1,	76,58±3,1	41,10±2,0	10,87±0,
7	S4	44,36±2,	73,40±3,1	13,79±0,6	7,81±0,1
8	S4	84,37±3,	74,86±3,1	38,70±2,0	5,11±0,1
9	S4	91,48±3,	46,43±2,1	19,43±0,7	18,23±0,
0	S5	93,66±3,	10,79±0,5	6,45±0,05	0

Her metal için en çok direnç sağlayan beşer suş seçilmiştir ve seçilen suşlara hangi derişimlerde metal verileceği saptanmıştır.

Tablo 3. Metallere direnç gösteren bakteriler

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

Tablo 4. Bakterilere uygulanacak metal derişimleri

Metaller	Derişimleri (ppm)			
Krom(VI)	5 ppm	7,5 ppm	10 ppm	15 ppm
Kadmiyum(II)	10 ppm	20 ppm	30 ppm	40 ppm
Bakır(II)	10 ppm	20 ppm	40 ppm	80 ppm
Mangan(II)	100 ppm	200 ppm	300 ppm	400 ppm

Dirençli bakterilerin belirli konsantrasyonlardaki metallerde % ölüm ve LC50 değerleri: Seçilen bakterilerin belirli konsantrasyonlardaki metal ile olan OD değerlerine göre tüm bakterilerde metal derişimi arttıkça ölüm oranının arttığı görülmüştür. Metallere göre seçilen bakterilerin LC50 değerleri Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5. Metallere göre seçilen bakterilerin LC₅₀ değerleri

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

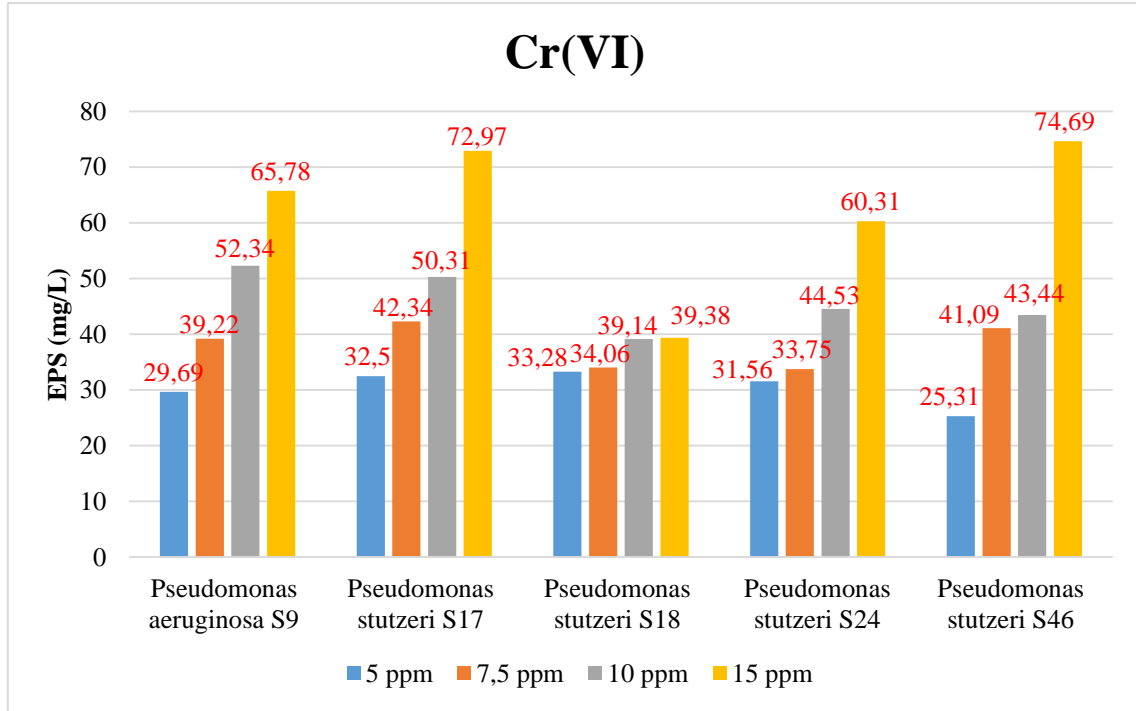
LC50 değerlerine bakıldığında Cr metalinde en dirençli bakterinin S24 olduğu gözlemlenmiştir. Aynı şekilde Cd metaline S32, Cu metaline S8 ve Mn metalinde S37 bakterilerinin 24 saatin sonunda seçilen diğer bakterilere nazaran % ölüm değerleri daha düşük olup metallere karşı dirençlerinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Bakterilerin metalli ve metallsiz ortamlarda EPS miktarları: Metallsiz ortamda 50 suşun EPS miktarları tespit edilmiştir. Suşların EPS miktarları mg/l cinsinden Tablo 6' da verilmiştir. Metallsiz ortamda 50 suş içerisinde en yüksek EPS miktarı *P.aeruginosa* S20 (52,03 mg/L) ve *P.stutzeri* S39 (52,03 mg/L) bakterilerinde olduğu tespit edilmiştir. En düşük EPS miktarı ise *P.stutzeri* S25 (17,81 mg/L) ve *P.stutzeri* S45(17,18 mg/L) suşlarında tespit edilmiştir.

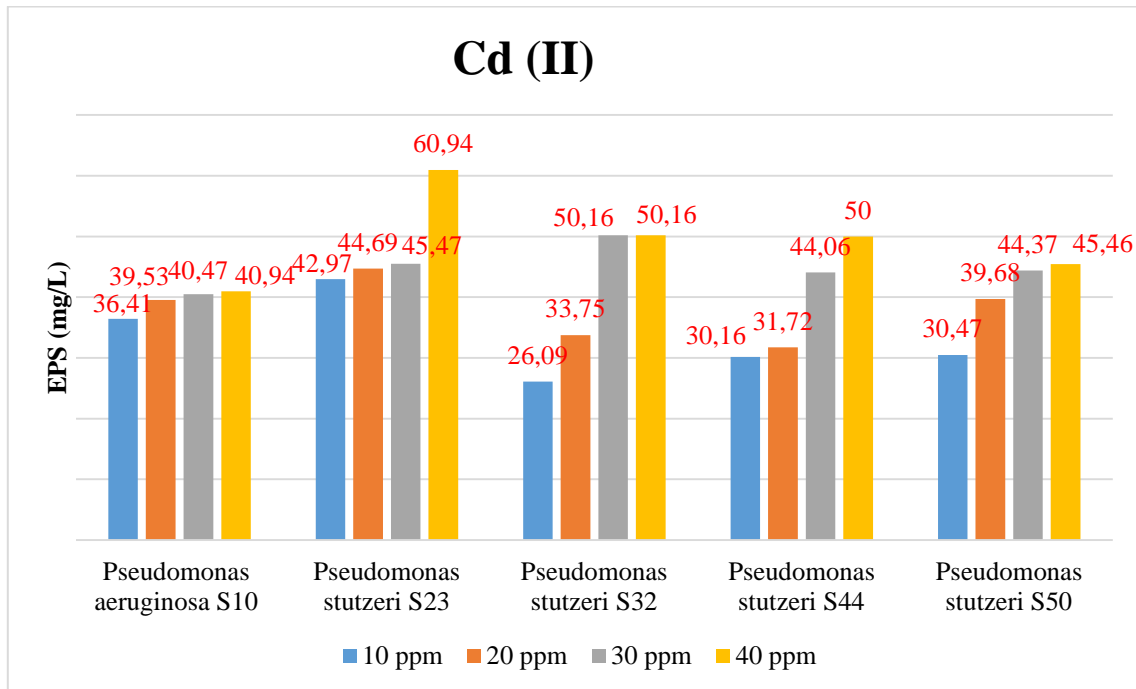
Tablo 6. Bakterilerin EPS miktarları

Suşlar	EPS (mg/mL)	Suşlar	EPS (mg/mL)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S1	24,53±1,2	<i>Pseudomonas stutzeri</i> S26	39,53±1,9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S2	23,43±1,2	<i>Pseudomonas stutzeri</i> S27	23,90±1,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S3	26,71±1,3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S28	45,78±2,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S4	34,37±1,6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S29	24,06±1,2
<i>Pseudomonas stutzeri</i> S5	38,43±1,7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S30	35,46±1,6
<i>Pseudomonas stutzeri</i> S6	42,03±1,9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S31	18,28±1,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S7	20,78±1,1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> S32	20,15±1,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S8	18,28±1,1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> S33	35,31±1,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S9	26,56±1,3	<i>Pseudomonas stutzeri</i> S34	36,56±1,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S10	18,59±1,1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> S35	45,93±2,0
<i>Pseudomonas stutzeri</i> S11	48,28±2,1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S36	34,68±1,6
<i>Pseudomonas stutzeri</i> S12	38,43±1,8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S37	25,15±1,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S13	34,21±1,6	<i>Pseudomonas stutzeri</i> S38	30,4±1,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S14	49,84±2,1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> S39	52,03±2,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S15	49,06±2,1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> S40	36,40±1,6
<i>Pseudomonas stutzeri</i> S16	48,59±2,1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S41	37,81±1,6
<i>Pseudomonas stutzeri</i> S17	30,46±1,5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S42	42,65±1,9
<i>Pseudomonas stutzeri</i> S18	32,65±1,5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S43	48,43±2,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S19	50,46±2,3	<i>Pseudomonas stutzeri</i> S44	18,28±1,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S20	52,03±2,4	<i>Pseudomonas stutzeri</i> S45	17,18±1,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S21	42,18±1,9	<i>Pseudomonas stutzeri</i> S46	41,56±1,9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S22	35,46±1,6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S47	47,81±2,1
<i>Pseudomonas stutzeri</i> S23	41,09±1,9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S48	40,62±1,9
<i>Pseudomonas stutzeri</i> S24	30,46±1,5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S49	48,12±2,1
<i>Pseudomonas stutzeri</i> S25	17,81±1,0	<i>Pseudomonas stutzeri</i> S50	19,06±1,2

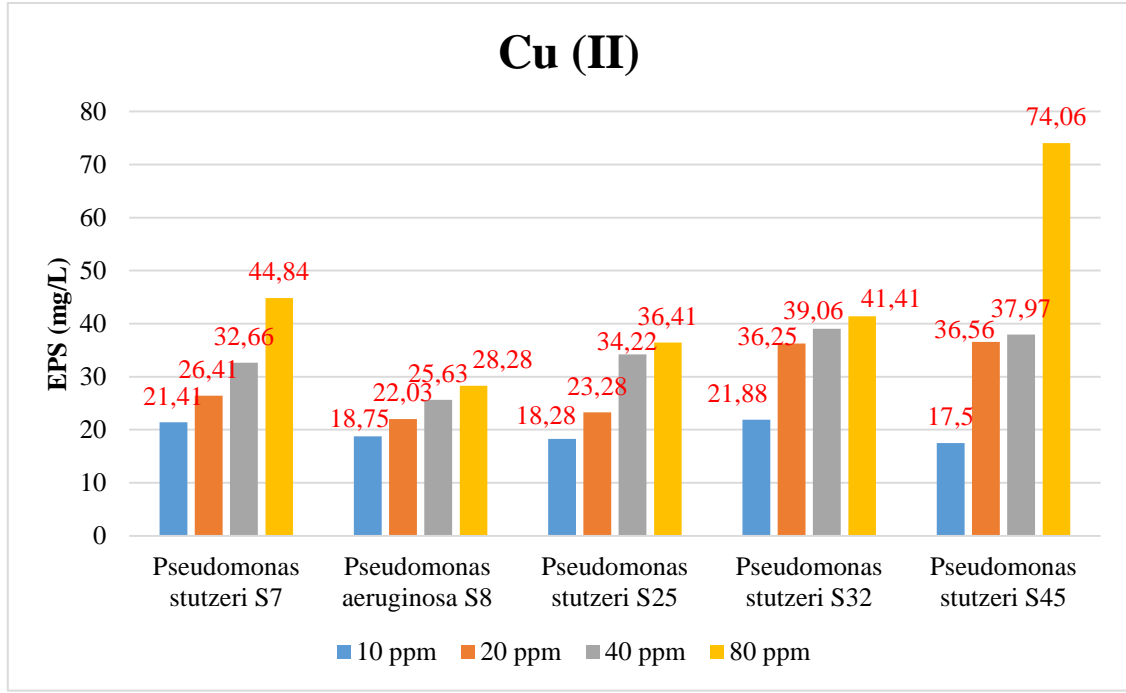
Metale maruz kalan bakterilerde genel olarak metal derişimi arttıkça EPS miktarının da arttığı gözlemlenmiştir. Metallerin belirlenen derişimlerine maruz bırakılan seçili suşların EPS miktarları Şekil 1., 2., 3.ve 4.'te gösterilmiştir. Cr(VI) metaline maruz bırakılan bakterilerden *P.stutzeri* S46 suşunun 15 ppm' lik derişiminde en yüksek EPS değeri (74,68 mg/L), *P.stutzeri* S46 suşunun 5 ppm'lik derişiminde en düşük EPS değeri (25,31 mg/L) tespit edilmiştir. Cd(II) metaline maruz kalan bakterilerden *P.stutzeri* S23 suşunun 40 ppm'lik derişimde en yüksek EPS değeri (60,93 mg/L), *P.stutzeri* S32 suşunun 10 ppm'lik derişiminde en düşük EPS değeri (26,09 mg/L) gözlemlenmiştir. Aynı şekilde Cu(II) metaline maruz kalan bakterilerde 80 ppm'de *P.stutzeri* S45 suşunda en yüksek EPS (74,06 mg/L), 10 ppm' de *P.stutzeri* S45 suşunda en düşük EPS değeri (17,5 mg/L) tespit edilmiştir. Mn(II) metaline maruz kalan bakterilerde 400 ppm'de *P.stutzeri* S44 suşunda en yüksek EPS (46,40 mg/L), 100 ppm'de *P.stutzeri* S44 suşunda en düşük EPS miktarı (18,75 mg/L) tespit edilmiştir.



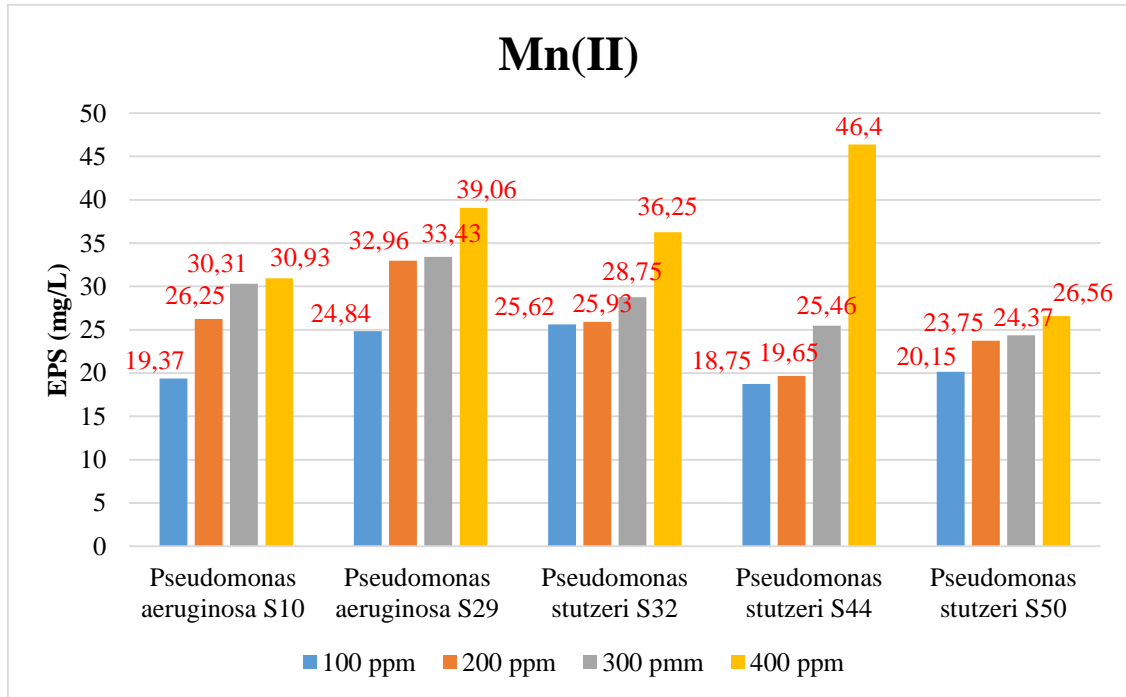
Şekil 1. Krom(VI) metalinin belirlenen konsantrasyonlarına maruz bırakılan seçili suşların EPS miktarları



Şekil 2. Kadmiyum(II) metalinin belirlenen konsantrasyonlarına maruz bırakılan seçili suşların EPS miktarları



Şekil 3. Bakır(II) metalinin belirlenen konsantrasyonlarına maruz bırakılan seçili suşların EPS miktarları



Şekil 4. Manganez(II) metalinin belirlenen konsantrasyonlarına maruz bırakılan seçili suşların EPS miktarları

5. Tartışma

Pseudomonas cinsi bakteriler; su, toprak, kanalizasyon ve bazı bitkiler gibi çok geniş bir yayılım alanına sahip olan ve farklı ortamlardan kolayca izole edilebilen mikroorganizmalardandır [29 ve 30]. Özellikle çevre kirliliği bakımından ciddi risk oluşturan kirletici faktörleri önemli oranda degradasyon kabiliyeti göstererek, suların doğal yolla temizlenmesinde rol oynaması sebebiyle çevre biyoteknolojisine yönelik çalışmalarda tercih edilmektedir. Doğada birçok mikroorganizma, özellikle *Pseudomonas* spp. üyeleri, üreme ve çoğalmak için farklı karbon kaynakları kullanarak sekonder metabolitler (EPS, piyosiyenin ve ramnolipid) sentezlemektedirler [31 ve 32]. Bu bakterilerin kirli alanlarda canlı kalabilme şansının tamamen ürettikleri ikincil metabolitlere bağlı olduğu bilinmektedir [33 ve 34].

Biyoteknolojik uygulamalarda son yıllarda mikrobiyal ekzopolisakkaritler gıda ve ilaç endüstrisi gibi birçok alanda kullanılmaktadır [35].

Sanayinin gelişmesi ile birlikte son yıllarda çevreye bırakılan atıklar, gün geçtikçe artmakta ve bu atıklar arasında çevreye ve canlılara yüksek oranda zarar veren ağır metaller bulunmaktadır. Atık suların ağır metallerin giderilebilmesi için birçok farklı yöntem kullanılmaktadır. Bu alanda en çok kimyasal çöktürme, iyon değişimi, kimyasal oksidasyon ve indirgeme, elektrokimyasal uygulama, filtrasyon ve ters ozmoz uygulanmaktadır. Bu klasik yöntemlerin kullanımı aktif çamurlarda yoğun toksik bileşikler meydana getirerek arıtımı daha da zor hale getirmekte ve maliyeti artırmaktadır [36]. Ayrıca bu yöntemler fazla maliyetli olmasından dolayı yüksek metal konsantrasyonlarının gideriminde kullanılırken, düşük konsantrasyonlu (1-100 ppm) metal kirliliğinde kullanılmamaktadır [37].

Günümüzde, klasik yöntemlere alternatif olarak daha ekonomik ve pratik, canlı (biyobirikim) ve ölü (biyosorpsiyon) mikrobiyal biyokütle ile ağır metallerin giderimi önem kazanmıştır. Metal iyonları, hücre duvarındaki proteinlerin fonksiyonel grupları ve peptid bağları ile kompleks yaparak adsorbe edilebildikleri gibi bazı mikroorganizmalar ekzopolisakkarit yapıda polimerler sentezleyerek çözeltideki metal iyonlarını bağladığı bildirilmektedir [37].

Atık su örneklerinden toplam 50 *Pseudomonas* spp. izole edilmiş, izolatların VITEK 2 Compact 30 (biomerieux) ile tür tanımlamalarına göre 27'sinin *P.aeruginosa* ve 23'ünün *P.stutzeri* olduğu tespit edilmiştir. Yapılan ön çalışmalar neticesinde atık suların alınan numuneler analiz edilerek Cr(VI), Cd(II), Cu(II) ve Mn(II) metallerinin yüksek miktarda olduğu belirlenmiştir. Atık su standartlarına göre Cr(VI) metalinin mevzuat limiti 5 ppm iken bu çalışmada kullanılan atık su numunesinde 6,86 ppm tespit edilmiştir. Cd(II) metalinde mevzuat limiti 2 ppm iken çalışmada kullanılan atık su numunesinde 7,18 ppm olarak tespit edilmiştir. Cu(II) metalinde mevzuat limiti 2 ppm iken bu çalışmada kullanılan atık su numunesinde 16,2 ppm olarak tespit edilmiştir. Mn(II) metalinin atık su standartlarında üst limiti bulunmamaktadır ancak bu çalışmada 14,92 ppm olarak tespit edilmiştir. Atık sularda *Pseudomonas* cinsi bakterilerin fazla bulunması, bakterilerin bu sulardaki ekstrem şartlara karşı dayanıklılığını sağlayan ürettikleri EPS, piyosiyanın ve ramnolipid gibi sekonder metabolitlerden kaynaklanmaktadır [38]. Metal bağlayabilme yeteneğine sahip olan ekzopolisakkaritler, bakteri hücrelerini jelatinimsi bir madde ile kaplayarak, hücreyi kuruma ve toksik maddelerden koruduğu düşünülmektedir [39]. Birçok izolat, izolata özgü tek bir EPS' den ziyade yaşamları boyunca kompozisyonlarında değişimlere uğrayabilen farklı EPS' ler de üretebilmektedir [40].

İzole edilen 50 *Pseudomonas* spp. izolatının ön metal toleransları tespit edilmiştir. Bunun için izolatlar Cr(VI), Cd(II), Cu(II) ve Mn(II) metallerinin 10 ppm' lik derişimlere maruz bırakılmış ve 24 saatlik inkübasyon sonunda % ölüm değerleri hesaplanmıştır. Yapılan metal toleransı çalışmasında *P.stutzeri* türlerinin *P.aeruginosa*' ya nazaran daha dirençli olduğu görülmüştür. *P.stutzeri* suşlarının hücre duvarı yapısının metal dirençliliğine daha uygun olduğu düşünülmektedir.

Uygulanan metaller arasında Cr(VI) ve Cd(II), Cu(II) ve Mn(II)' a nazaran daha toksik etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. Cr(VI) metalinde en dirençli suş S46 olup Cd(II) metalinde en dirençli suş S44' tür. Cu(II) metalinde en dirençli suşlar S7, S8, S25, S32, S45 olup, Mn(II) metaline en dirençli suşlar S10, S29, S32, S44, S50 olduğu tespit edilmiştir.

Cr(VI)'nın çok az miktarı dahi sudaki ekolojik dengeyi bozmaktadır. Cd(II) ise mikroorganizmalar açısından yüksek oranda toksik olup, bazı mikroorganizmaların demir metabolizmasında görev aldığı bilinmektedir. Bununla birlikte, her iki metal miktarı belirli düzeyi aştığında mikroorganizmalar üzerinde toksik etki göstererek, bir süre sonra ölümlere yol açmaktadır [41]. Yamini ve ark. 2004 yılında Cr(VI)'nın, Simonet ve ark. 1984 yılında Cd(II)'nin patojen bakterilerin patojenitesini azalttığını rapor etmişlerdir [42 ve 43]. Mn(II) ve Cu(II)' da ise durum daha farklıdır. Bu iki metalin eser miktarları metabolik faaliyetlerde görev almaktadır. Cu(II) yaşamın aerobik formlarında, elektron transport zincirinde ve redoks aktif enzimlerde elektron alıcısı olarak görev alan önemli bir metaldir [44]. Bununla birlikte bakırın yüksek dozları prokaryot ve ökaryotlar için toksik etki göstermektedir [45 ve 46]. Mn(II) ise canlı hücrelerde süperoksit dismutaz ve fotosistem II için gerekli olan enzimler için elzem olan önemli bir eser elementtir [47]. Bu nedenle Cu(II) ve Mn(II) diğerlerine nazaran kullanılan bakterilere daha az toksik etki göstermiştir.

Bu çalışmada, 50 *Pseudomonas* spp. izolatının optimum gelişme koşullarında ürettikleri EPS miktarları belirlenmiştir. Bakteriler arasında *P. aeruginosa* S20 ve *P. stutzeri* S39' un 52,03 mg/L ile en yüksek EPS üretici olduğu, *P. stutzeri* S25' in 17,81 mg/L ve *P. stutzeri* S45' in 17,18 mg/L ile en düşük EPS üretici suş olduğu görülmüştür. Fett ve ark. (1995) *P. fluorescens* ve *P. putida* suşlarında EPS üretimini sırasıyla 30-79 mg/L ve 25-58 mg/L olarak bildirmişlerdir[48]. Bu çalışmada kullanılan *P.aeruginosa* suşlarının EPS üretimlerinin 18-52 mg/L, *P.stutzeri* suşlarının ise EPS üretimlerinin 17-48 mg/L aralığında olduğu belirlenmiştir. Burada görülmektedir ki EPS' si yüksek olan suşlar metale dirençlilik bakımından paralellik göstermemektedir. Bu çalışmada metal direnci ve EPS üretimi arasında bir korelasyon bulunmamaktadır. Panwichian ve ark 2011 yılında *Rhodobium marinum* NW16 ve

Rhodobacter sphaeroides KMS24 ile yaptıkları çalışmada Cd, Cu, Pb, Zn'ya dirençli olan suşların EPS miktarının düşük olduğunu rapor etmişlerdir [49]. Bu da bu çalışmayı doğrulamaktadır. Birçok çalışmada belirtildiği üzere EPS miktarından ziyade EPS kompozisyonu metal gideriminde ön plana çıkmaktadır. Hatta metale maruz kalan bazı mikroorganizmaların EPS kompozisyonunda da metale bağlı değişiklikler olduğu bildirilmiştir. Priester ve ark. 2006' da yaptıkları çalışmada Cr(VI)' ya maruz kalan *P.putida*'dan elde edilen EPS' nin monosakkarit kompozisyonunda farklılıklar olduğunu tespit etmişlerdir [50].

Öztürk ve ark. 2008'de siyanobakteriler ile yaptıkları çalışmada Cr(VI)' ya maruz bırakılan suşların EPS kompozisyonunda farklılıklar olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada da dirençliliğin EPS kompozisyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir. Yine Öztürk ve ark. 2009' da yaptıkları bir çalışmada Cr(VI)'a direnci olmayan *Synechocystis* spp. BASO672 suşunun direnci olan *Synechocystis* spp. BASO670 suşuna nazaran daha yüksek metal giderdiğini tespit etmişlerdir. Yine aynı çalışmada EPS üretimi ve Cr(VI) giderimi arasında negatif korelasyon olduğu belirtilmiş ve metal gideriminin EPS'deki şeker kompozisyonuna bağlı olduğu rapor edilmiştir [51]. Bu çalışmada % ölüm sonuçlarına göre dirençli olarak seçilen suşlara 5, 7,5, 10 ve 15 ppm Cr(VI), 10, 20, 30 ve 40 ppm Cd(II), 10, 20, 40 ve 80 ppm Cu(II), 100, 200, 300 ve 400 ppm Mn(II) uygulanmış ve EPS miktarları ölçülmüştür. EPS miktarları ölçülmeden hemen önce tüm suşların biyokütleleri eşitlenmiştir.

Cr(VI) konsantrasyonlarına maruz kalan bakterilerde *P. stutzeri* S46 suşunun 15 ppm' lik derişiminde en yüksek EPS değeri 74,68 mg/L, *P. stutzeri* S46 suşunun 5 ppm' lik derişiminde en düşük EPS değeri 25,31 mg/L olarak tespit edilmiştir. Cd(II) metaline maruz bırakılan bakterilerde *P. stutzeri* S23 suşunun 40 ppm' lik derişimde en yüksek EPS değeri 60,93 mg/L, *P. stutzeri* S32 suşunun 10 ppm'lik derişiminde en düşük EPS değeri 26,09 mg/L olarak tespit edilmiştir. Cu(II) metalinde 80ppm' de *P. stutzeri* S45 suşunda en yüksek EPS 74,06 mg/L, 10 ppm'de *P. stutzeri* S45 suşunda en düşük EPS değeri 17,5 mg/L olarak belirlenmiştir. Mg(II) metalinde 400 ppm'de *P. stutzeri* S44 suşunda en yüksek EPS 46,40 mg/L, 100 ppm' de *P. stutzeri* S44 suşunda en düşük EPS miktarı 18,75 mg/L olarak tespit edilmiştir. Metale maruz bırakılan suşlarda genel olarak metal derişimi arttıkça EPS miktarının da arttığı gözlemlenmiştir ($P \cong 0,01$).

Metal toleranslarına göre seçilen bakterilerin değişik konsantrasyonlardaki EPS üretim kapasiteleri belirlenmiştir. En fazla EPS üretiminin 15 ppm Cr(VI)' da *P. stutzeri* S46 suşunda olduğu (74,68 mg/L), en az EPS üretiminin ise 10 ppm Cu(II)' de *P. stutzeri* S45 suşunda olduğu (17,5 mg/L) görülmüştür. Farklı ağır metal konsantrasyonlarına bağlı olarak EPS üretiminin arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur [50 ve 51]. *P.aeruginosa* ile yapılan çalışmada ise ortamdaki Cu^{+2} iyonlarının EPS üretimini 4 kat arttırdığı tespit edilmiştir [51]. Sharma ve ark. 2008' de yaptığı çalışmada, *Gleocapsa* spp. ve *Nostoc* spp.' nin artan Cr konsantrasyonlarına bağlı EPS üretimleri incelenmiş, 5 ppm ve 20 ppm aralığında uygulanan Cr^{+6} konsantrasyonlarında, 5 ppm' den sonra EPS üretiminin düştüğü gözlenmiştir [54]. Bu çalışmada ise *Pseudomonas* spp. suşlarına 5 ppm ve 15 ppm aralığında uygulanan Cr^{+6} konsantrasyonlarındaki artış ile EPS üretiminin de arttığı gözlemlenmiştir. Sentezlenen EPS bakteriyi ağır metaller gibi olumsuz çevre şartlarından korurken, ortamda bulunan ağır metalleride tuttuğu bilinmektedir. Bu özellik bakterinin cinsine ve ağır metalin çeşidine göre değişmektedir [55].

6. Sonuç

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

Pseudomonas spp.'nin Cr(VI), Cd(II), Cu(II) ve Mn(II) metallerinin EPS üretimine etkisi ile ilgili çalışma henüz ülkemizde bulunmamakla birlikte çalışmamız ilk olması özelliğiyle bu alana ışık tutacağını düşünmekteyiz. Bu alanda yapılan çalışmalar artırılarak ekonomik öneme sahip EPS' nin daha ucuza üretilmesi mümkün olacaktır. EPS miktarları yüksek olan suşlar çeşitli sanayilerde kimyasal ürünlere alternatif doğal ürünlerin üretilmesinde kullanılabilirler. Bu çalışma sonucunda EPS' nin metal direncine etkisi ve endüstriyel açıdan bu metabolitin biyoteknolojik olarak üretiminin artırılması ile ülke ekonomisine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Kaynaklar

- [2] Patterson, J. W., "Waste water treatment", *Science Publishers Inc.*, U.S.A., 43-55, 59-67, 69-81, 1977.
- [3] Viel, P., Palacin, S., Descours, F., Bureau, C., Le Derf, F., Lyskawa, J., Salle, M., "Electropolymerized poly-4-vinylpyridine for removal of copper from wastewater", *Appl. Surf. Sci.*, 212-213: 792-796, 2003.
- [4] Gramion, F., "Analyses of microbial community structures and functions in heavy metal-contaminated soils using molecular methods", Ph.D. thesis, *Swiss Federal Institute of Technology of Lausanne*, Switzerland, 1-107, 2003.
- [5] Young, R. V., "World of Chemistry", *Gale Group*, Michigan 48-77, 2000.
- [6] Zouboulis, A. I., Loukidou, M. X., Matis, K. A., "Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils", *Process Biochem.*, 39: 909-916, 2004.
- [7] Förstner, U., Wittman, G. T. W., "Metal Pollution in the aquatic environment", *Springer*, Berlin 197-230, 1983.
- [8] Kartal, G., Guven, A., Kahvecioğlu, O., Timur, S., "Metallerin Çevresel Etkileri-II, www.metalurji.org.tr/dergi/dergi137/d137_4651 pdf, Mart 2009
- [9] Gokağaçlı, N, G., "Microcystis sp. ile Demir, Bakır ve Çinko Metallerinin Giderimi", *Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, SF. 1-17, İstanbul, 2007
- [10] Environmental and Workplace Health. Manganese, 1987
- [11] Morgan J.J., "Chemical Equilibria and Kinetic Properties of Manganese in Natural Waters", S.D. Faust and J.V. Hunter, editors, *Principles and Applications of Water Chemistry*, Wiley and Sons Inc, Newyork, 1967
- [12] Tefloncu A., "Biyoteknoloji", *Ege Üniversitesi Yayınlar.*, Bornova, İzmir, 1995.
- [13] Sutherland, I.W., "Polysaccharases for microbial exopolysaccharides", *Carbohydrate Polymers*, 38, 319-328, 1999.
- [14] Rangsayatorn, N., Upatham, E. S., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Lanza, G. R., "Phytoremediation potential of *Spirulina* (Arthrospira) *platensis*: biosorption and toxicity studies of cadmium", *Environ. Pollut.*, 119: 45-53, 2002.
- [15] İleri, R., *Çevre Biyoteknolojisi*, 501-503, 2000.
- [16] Liu, Y., Lam, M. C., Fang, H. H. P., "Adsorption of heavy metals by EPS of activated sludge", *Water Sci. Technol.*, 43: 59-66, 2001.
- [17] Wang, J. L., Chen, C., "Biosorption of heavy metal by *Saccharomyces cerevisiae*: areview", *Biotechnol. Adv.*, 24 (5): 427-451, 2006.
- [18] Donot, F. Fontana, A., Baccou, J.C., Galindo, S.S., "Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction", *Carbohydrate Polymers*, 87, 951- 962, 2012.
- [19] White, C., Gadd, G. M., "Accumulation and effects of cadmium on sulphatereducing bacterial biofilms", *Microbiology*, 144: 1407-1415, 1998.
- [20] Adarsh, V. K, Mishra, M., Chowdhury, S., Sudarshan, M., Thakur A. R., Chaudhuri, S. R., "Studies on metal microbe interaction of three bacterial isolates from east calcutta wetland", *J. Biol. Sci.*, 7: 80-88, 2007.
- [21] Vanhaverbeke, C., Heyraud, A., Mazeau, K., "Conformational analysis of the exopolysaccharide from *Burkholderia caribensis* strain MWAP71: Impact of the interaction with soils", *Biopolymers*, 69: 480-497, 2003.
- [22] Erdi ERGENE, Ayşe AVCI, "Effects of Cultural Conditions on Exopolysaccharide Production by Bacillus sp. ZBP4", *Journal of Agricultural Sciences*, 08 February 2017

- [23] Yalpani M., Sandford P. A., Commercial Polysaccharides: Recent Trends and Developments. In: Yalpani M., editor, Industrial Polysaccharides Genetic Engineering, Structure/Property Relations and Applications. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 311-35, 1987.
- [24] Becker A., F. Katzen A., Pühler and L., Ielpie. "Xanthan Gum Biosynthesis and Application: a Biochemical/Genetic Perspective", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 145-152, 1998.
- [25] Jochen Schmid, "Recent insights in microbial exopolysaccharide biosynthesis and engineering strategies", *Current opinion in biotechnology*, Vol 53, Oct. 2018, Pp 130-136, 2018
- [26] OECD (Organization for the Economic Cooperation and Development), 'OECD Guideline for testing of chemical: Alga, growth inhibition test', 1984.
- [27] APHA, AWWA, WPCF, "Standart Methods for the examination of water and wastewater", Washington, 1971.
- [28] Dan Li, Jiayi Li, Feng Zhao, Guohong Wang, Qianqian Qin, Yanling Hao. "The influence of fermentation condition on production and molecular mass of EPS produced by *Streptococcus thermophilus* 05-34 in milk-based medium", *Food Chemistry*, 197:367-372, 2016.
- [29] Petra Kson zekova, Peter Bystricky, Silvia Vlckova, Vladimir Patoprsty, Lucia Pulzova, Dagmar Mudronova, Terezia Kuboskova, Tomas Csank, Ludmila Tkacikova, "Exopolysaccharides of *Lactobacillus reuteri*: Their influence on adherence of E. Coli to epithelial cells and inflammatory response", *Carbohydrate Polymers*, 141:10-19, 2016.
- [30] Sneath, P. H. A., "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Edited by P. H. A. Sneath, N. S., Mair, M. E., Sharpe, J. G. Holt, *Williams and Wilkins*, 1 Baltimore, 2: 141-199, 1986.
- [31] Collier, L., Balow, A., Sussman, M., "Topley & Wilson's Microbiology and Microbiol Infections", *Systematic Bacteriology*, 9th edition, 2: 1091-1118, 1998.
- [32] Sutherland, I.W., "Polysaccharases for microbial exopolysaccharides", *Carbonhydrate Polymers*, 38, 319-328, 1999.
- [33] Steinberger, R. E. and Holden P. A., "Macromolecular composition of unsaturated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with time and carbon source", *Biofilms*, 1: 37-47, 2004.
- [34] Asthana, S., Rusin, P., and Gerba, C. P., "Influence of hydrocarbons on the virulence and antibiotic sensitivity associated with *Pseudomonas aeruginosa*", *Int. J. Environ. Health Research*, 7: 277-287, 1997.
- [35] King, E. O., Ward, M. K., and Raney, D. E. "Two Simple Media for The Demonstration of Pyocyanin and Fluorescin", *J. Lab. Clin. Med.*, 44: 301-307, 1954.
- [36] Onbaşı, D., "Çevredeki organik kirleticilerden biyoteknolojik olarak bazı ikincil metabolitlerin üretimi" *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Doktora Tezi, Ankara, 2006.
- [37] Xia, Y., Liyuan, C., "Study of gelatinous supports for immobilizing inactivated cells of *Rhizopus oligosporus* to prepare biosorbent for lead ions", *The Int. J. Environ. Stud.*, 5: 1-6, 2002.
- [38] Cossich, E. S., Tavares, C. R. G., Ravagnani, T. M. K., "Biosorption of chromium(III) by *Sargassum* sp. biomass", *Electron. J. Biotechn.*, 5(2): 133-140, 2002.
- [39] Liu, Y., Lam, M. C., Fang, H. H. P., "Adsorption of heavy metals by EPS of activated sludge", *Water Sci. Technol.*, 43: 59-66, 2001.
- [40] Yılmaz, E., "Siyanobakterlerle ağır metal giderimi ve bunu etkileyen faktörlerin araştırılması", *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Doktora Tezi, Ankara. 2009.
- [41] Philippis, R.D., Sili, C., Paperi, R., Vincenzini, M., "EPS-producing cyanobacteria and their possible exploitation: A review", *J. of App. Phycology*, 13, 293 299, 2001.
- [42] Kalantari, N., "Evaluation of toxicity of iron, chromium and cadmium on *Bacillus cereus* growth", *Iranian J. Basic Med. Sci.*, 10 (4): 222-228, 2008.

- [43] Yamini, H., Shrivastava, S., Devaraj, N., Balachandran, U. N., “A schiff base complex of chromium(III): an efficient inhibitor for the pathogenic and invasive potential of *Shigella dysenteriae*”, *J. Inorg. Biochem.*, 98: 387-392, 2004.
- [44] Simonet, M., Berche, P., Fauchere, J. L., Veron, M., “Impaired resistance to *Listeria monocytogenes* in mice chronically exposed to cadmium”, *Immunology*, 53: 155-163, 1984.
- [45] Solioz, M., Nakamura, R., Pan-Hou, H., Sato, M. H., Itoh, T., Kiyono, M., “Response of Gram-positive bacteria to copper stress”, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 15, 3-14, 2010.
- [46] Gaetke, L. M., Chow, C. K., “Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients”, *Toxicology*, 189, 147-163, 2003.
- [47] German, N., Doyscher, D., Rensing, C., “Bacterial killing in macrophages and amoeba: do they all use a brass dagger?”, *Future Microbial*, 8, 1257-1264, 2013.
- [48] Brouwers, G. J., E., Vijgenboom, P. L. A. M., Corstjens, J. P. M., de Vrind, and E. W. de Vrind-de Jong, “Bacterial Mn²⁺ oxidizing systems and multicopper oxidases: an overview of mechanisms and functions”, *Geomicrobiology*, 17:1-24, 2000.
- [49] Fett, W.F. Wells, J.M. Cescutti, P. and Wijey, C. “Identification of Exopolysaccharides Produced by Fluorescent Pseudomonads Associated with Commercial Mushroom (*Agaricus bisporus*) Production”, *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 513-517, 1995.
- [50] Panwichian S. , Kantachote D. , Wittayaweerarak B. , Mallavarapu M., 2011, “Removal of heavy metals by exopolymeric substances produced by resistant purple nonsulfur bacteria isolated from contaminated shrimp ponds” , *Environmental Biotechnology*, Vol. 14 No. 4 , s.1-8, 2011.
- [51] Priester J. H. , Olson S. G., Webb S. M., Neu M., P., Hersman L., E., Holden P., A., “Enhanced Exopolymer Production and Chromium Stabilization in *Pseudomonas putida* Unsaturated Biofilms”, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72, No. 3 P. 1988-1996, 2006.
- [52] Öztürk, S., Aslım, B., “Relationship between chromium(VI) resistance and extracellular polymeric substances (EPS) concentration by some cyanobacterial isolates”, *Environ. Mic.*, 15, 478-480, 2008
- [53] Ozturk S., Aslım B., Suludere Z., Tan S., “Metal removal of cyanobacterial exopolysaccharides by uronic acid content and monosaccharide composition”, *Carbohydrate Polymers* 101, 265-271, 2014.
- [54] Şahlan Öztürk, Belma Aslım, “Modification of exopolysaccharide (EPS) composition and production by three cyanobacterial isolates under salt stress”, *Environmental Science and Pollution Research* , Sayı:17, Sayfalar:595-602, 2010,
- [55] Sharma, M., Kaushik, A., Somvir, Bala., K., Karma, A., “Sequestration of chromium by exopolysaccharides of *Nostoc* and *Gleocapsa* from dilute aqueous solutions”, *J. of Hazard. Mat.*, 157, 315-318, 2008.
- [56] Öztürk Ş., “Çeşitli tatlı sulardan izole edilen bazı *Synechocystis* sp. izolatlarına Cr(VI) ve Cd(II) ağır metallerinin etkisi ve giderimi: Metal gideriminin protein ve tiyoller açısından değerlendirilmesi”, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Doktora Tezi, Ankara, 2008.

Extended Abstract

Introduction

Water pollution is one of the factor that threaten human, animal and plant life which constitute an important part of environmental pollution and defined as deterioration of the natural balance of the water. Water thrown into streams, seas and lakes, after use in industry, agriculture and cities, is called waste water.

The classical methods used in the treatment of wastewater from heavy metals are not practical and economical due to the high investment and operating costs and the formation of new pollutants after treatment. Biological removal of heavy metal with microorganisms is defined as; engulfing of metal ions into the cell, attachment of heavy metal to the surface of the microorganism and the chemical transformation of metals with biological agents secreted by the microorganism. Microorganisms can be used in the economic removal and recovery of heavy metal ions in waste waters, with a high potential for deposition and separation of inorganic ions.

Exopolysaccharides (EPS) are metabolic products produced when bacteria are exposed to adverse environmental conditions. EPS is able to reduce some metals, has the ability to chelate metal and ions, and is therefore important and effective in removing of the heavy metals. In this study, *Pseudomonas* spp. isolates which were isolate from waste water were used. The factors, increase their chances to survive in different environments compared to other microorganisms and the production capabilities of exopolysaccharide metabolites, which are effective in cleaning of the waste water, in the presence of heavy metals (chromium, cadmium, copper and manganese) which are frequently seen in wastewater have been investigated.

Method

Pseudomonas spp. samples were isolated from waste water pools. Cr (VI), Cd (II), Cu (II) and Mn (II) values of the samples taken from wastewater were determined. Determination of metal tolerances of bacteria, growth curves of selected strains at determined metal concentrations and isolation of EPS were done based on the literature review.

Results and Discussion

In this study, the amount of EPS produced by *Pseudomonas* spp. strain under optimum growth conditions was determined. EPS production capacities of the bacteria selected according to metal tolerances were determined. It was observed that the amount of EPS increased as the metal concentration increased in the metal exposed strains. The strains with high EPS have no parallelism with respect to metal. In this study, there is no correlation between metal resistance and EPS production.

Although the there is no study on the effect of Cr (VI), Cd (II), Cu (II) and Mn (II) metals on EPS production in our country, we think that this study will shed light on this area. It will be possible to produce EPS cheaper with increasing the studies in this field. The strains with high EPS amounts can be used in the production of natural products alternative to chemical products in various industries. As a result of this study, it is thought that the effect of EPS on metal resistance and biotechnological production of this metabolite will contribute to the national economy.