

Termofilik *Exiguobacterium profundum* 'un Uranyum(VI)'a Karşı Direnci ve Uranyum(VI) Biyoakümüülasyonunun UV-vis Spektrofotometrik Tayini

Ersin Kılınç

Mardin Artuklu Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri MYO, Tıbbi Lab. Tek. Prog. 47000 Mardin
e-mail: kilincersin@gmail.com

Özet: Bu çalışmada termofilik *Exiguobacterium profundum*'un uranyum(VI) dirençliliği ve biyoakümüülasyonu çalışılmıştır. Sıvı ve katı besiyerleri için minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerleri katı besiyeri için 82mg/L ve sıvı besiyeri için 15mg/L olarak bulunmuştur. Ayrıca farklı U(VI) konsantrasyonlarının *E. profundum*'un üremesi ve biyoakümüülasyon kapasitesi sıvı fermentasyon ortamında incelenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla bakteri sayısında test edilen U(VI) konsantrasyonlarının tamamında önemli bir değişim tespit edilmemiştir. En yüksek biyoakümüülasyon kapasitesi 50,32mg U(VI)/g kuru bakteri olarak belirlenmiştir. Farklı U(VI) konsantrasyonlarının α -amilaz üretimi üzerine etkisi çalışılmıştır. Bunlara ilaveten bakteri hücre membranının uranyum kapasitesi 1, 2,5 ve 5 mg/L U(VI) konsantrasyonlarında sırasıyla, 32,28, 108,71 ve 254,18mg U(VI)/g yaş hücre membranı olarak tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Exiguobacterium profundum*, Termofilik bakteri, Uranyum(VI), Dirençlilik, Biyoakümüülasyon, UV-vis spektrofotometre, Hücre membranı

Uranium(VI) Resistance and Bioaccumulation by Using Thermophilic *Exiguobacterium profundum* and its UV-vis Spectrophotometric Determination

Abstract: In this study, resistance and bioaccumulation of uranium(VI) by thermophilic *Exiguobacterium profundum* were studied. The minimum inhibition concentration (MIC) of values of U(VI) were found to be 85mg/L for solid media and 15mg/L for brothmedia. Furthermore, the effect of various U(VI) concentrations on the growth of *E. profundum* and bioaccumulation capacity were investigated in liquid fermentation state. The bacterial growth was not importantly affected at all U(VI) concentrations when compared with control. The highest bioaccumulation capacity was determined as 50.32mg U(VI)/g dried bacteria at 5mg/L U(VI) concentration. The effect of various U(VI) concentrations on α -amylase production was also experimented. In addition to these, uranium bioaccumulation capacities of the bacterial cell membranewere determined as 32.28, 108.71 and 254.18mg U(VI)/g wet cell membranefor 1, 2.5 and 5mg/L U(VI) concentration , respectively.

Keywords: *Exiguobacterium profundum*, Thermophilic bacteria, Uranium(VI), Resistance, Bioaccumulation, UV-vis spectrophotometer, Cell membrane

Giriş

Çevre biyoteknolojisi, çevre kalitesini iyileştirmek için biyolojik organizmaların kullanıldığı bir tekniktir (Das ve ark., 2008). Biyoremediasyon, toksik atıkların neden olduğu çevresel zararları azaltmak ya da tamamen ortadan kaldırmak için organizmaların kullanılmasıdır (Dixit ve ark., 2015). Bu teknoloji, inorganik ve organik kimyasalların yıkımı, dönüşümü veya uzaklaştırılmaları için doğal ya da genetik mühendisliği yöntemleriyle

oluşturulan modifiye edilmiş mikroorganizmaları kullanma temelleri üzerine kurulmuştur (Ahluwalia ve Goyal 2007). Son yıllarda biyolojik yöntemler, kimyasal ve fiziksel yöntemlere alternatif olarak ön plana çıkmaktadır. (Gazso, 2001).

Sucul ekosistemlerdeki metal/radyoaktif kirliliği son yıllarda ciddi bir tehdit oluşturmaktadır (Gupta ve ark., 2000). Literatürde, mikroorganizmaların çevreyi kirleten metal/radyoaktif bileşiklerin

temizlenmesinde önemli bir rol oynayabileceği saptanmıştır (Costa ve Duta, 2001; Boyanov ve ark., 2003; Spain,2003). Bu nedenle son zamanlarda toksik metal ve radyoaktif bileşikler içeren atık suların temizlenmesinde biyolojik metotlar, pratik, ekonomik ve etkili olmalarından dolayı, tercih edilmekte ve bilimsel çalışmalar bu yönde hız kazanmaktadır. Biyolojik metotlarla arıtım, özellikle mikroorganizmalar ile yapılan metal biyosorbsiyonu alternatif ve etkili bir teknoloji oluşturacak güçtedir (Gupta ve ark., 2000). Biyoakümülyasyon; canlı organizmalar tarafından toksik bileşiklerin birikimi olarak tanımlanabilir. Toksik bileşikler hücre içerisine taşınabilir ve hücre içerisinde biriktirilebilirler veya hücrenin metabolik döngüsüne katılabilirler (Vijayaraghavan ve Yun, 2008). Son incelemeler canlı hücrelerin hücre içi detoksifikasyon mekanizmaları ile metalleri ortadan kaldırdığını kanıtlamıştır. Bu sonuçlar, canlı hücrelerin biyoremediasyon uygulanması sırasında tespit edilmiştir. (Malik, 2004). Biyoakümülyasyonda genellikle hücre çeperine metal bağlanması hızlı ve yüksek verimlilik gösterirken hücrenin sitosolünde oldukça yavaş ve düşük verimliliktedir (Sağlam ve Cihangir, 1995).

Literatürde, termofilik bakteriler ile ilgili radyoaktif elementlerin dirençliliği, üremesi ve biyoakümülyasyonu üzerine yeterli çalışma bulunmamaktadır. Radyoaktif elementler arasında Uranyum (U) anormal ve yavaş embriyonik gelişmeye yol açan, biyolojik fertilitiyi azaltan ve ekolojik bir risk oluşturan radyoaktif bir kirleticidir (Li ve Zhang 2012). Bu amaçla bu çalışmada termofilik *Exiguobacterium profundum*'un uranyum dirençliliği ve biyoakümülyasyonu test edilmiştir. U(VI)'nın belirlenmesi için

daha ucuz ve hızlı bir yöntemle UV-VIS (Ultraviolet visible spectrophotometry) ile tespit edilmiştir. Aynı zamanda uranyumun *E. profundum*'un gelişimi üzerine etkisi, farklı U(VI) konsantrasyonlarında çalışılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Bakteri Üretimi

Bu çalışmada Şırnak-Beytüşşebap kaplıcası çamur örneğinden izole edilip tanımlanan termotolerant *E.profundum* kullanılmıştır. *E. profundum* sıvı Nutrient Broth (NB) besiyerinde 45°C'de orbital çalkalayıcı da (120 rpm'de) ve Nutrient agar (NA) besiyerinde 45°C'de çoğaltılmıştır.

Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Değerlerinin Belirlenmesi

U(VI)'nın *E. profundum* üzerindeki toksik etkisini belirlemek için farklı konsantrasyonlarda U(VI) içeren sıvı ve katı besiyerleri hazırlanmıştır. Daha sonra bu besiyerlerine $3,6 \times 10^7$ CFU/mL'lik taze bakteri kültüründen ekim yapılmıştır. 96 saat inkübasyon süresi sonrasında bakterilerin üremediği en düşük U(VI) konsantrasyonu minimum inhibisyon konsantrasyonu değeri olarak belirlenmiştir (Özdemir ve ark., 2013, Hu ve ark., 2007).

E. profundum NB besiyerinde belli bir ön inkübasyondan (24 saat) sonra değişik konsantrasyonlarda (0, 1, 2,5 ve 5mg/L) U(VI) içeren sıvı besiyerlerine ekim yapılarak uygun inkübasyon koşullarında 12., 24., 36., 48., 72. ve 96. saatlerde 540nm'de absorbans değerleri ölçülerek zamana karşı OD değerleri kullanılarak büyüme eğrileri oluşturulmuştur.

U(VI) Biyoakümülyasyonunun Tespit Edilmesi

E. profundum farklı konsantrasyonlarda U(VI) içeren sıvı besiyerlerine ekim yapılarak uygun inkübasyon koşullarında 96. saate kadar inkübe edilmiştir. 12., 24., 36., 48., 72. ve 96. Saatlerde kültürden örnek alınıp 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj (Eppendorf, model 5430) edilmiştir. Üst sıvıdan örnek alınarak örneklerdeki uranyum konsantrasyonları UV-spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Pelet % 0,9'luk NaCl ile 2 kez yıkanmıştır. Daha sonra 10.000rpm'de 10 dakika santrifüj edilip pelet 80 °C'de bir gece kurumaya bırakılmıştır. Kuru ağırlık tespit edildikten sonra pelet 600 °C'de 4 saat kül fırınında kavrulmuştur. Sonra 0.5 mL konsantre nitrik asit (14,4M) ilave edilerek 30 dakika bekletilmiştir. Son hacim saf su ile 5 mL'ye tamamlanmış ve 1 saat ısıtılarak uranyum çözünürleştirilmiştir. Daha sonra hacim saf su ile 3 mL'ye tamamlanıp U(VI) biyoakümülyasyonu belirlenmiştir (Yılmaz, 2003).

E. profundum'un Hücre Membranındaki U(VI) Biyoakümülyasyonunun Belirlenmesi

E. profundum, 1, 2,5 ve 5mg/L U(VI) içeren 100 mL besiyerinde, 120 rpm'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyondan sonra besiyerleri 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Hücreler iki kez %0,9'luk NaCl ile yıkanarak tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra hücreler tartılarak yaş ağırlıkları saptanmıştır. Daha sonra hücreler 10 Ml lizozim tamponunda (50Mm Tris-HCl pH:7,0, 100mM NaCl ve 1 mg/mL lizozim) 90 dakika bekletilmiştir. Sonra hücreler 1'er dakikalık aralıklarla toplam 10 dakika sonikatörde sonifiye edilmiştir. Lizat 4 °C'de 10.000rpm'de

10 dakika santrifüj yapılmıştır. Üst sıvı 4 °C'de 30.000rpm'de 30 dakika santrifüj yapılmıştır. Pelet tartılarak yaş ağırlık tespit edilmiştir. Daha sonra pelet üzerine 1mL derişik HNO₃ ilave edilerek 30 dakika bekletilmiştir. Sonra 15 dakika ısıtılarak asit uçurulmuştur. Son hacim saf su ile 1 mL'ye tamamlanarak ICP-OES (Inductively coupled plasma optical emission spectrometry)'de ölçüm alınmıştır (Hsieh ve ark., 2007).

UV-Spektrofotometrik Olarak Uranyum Aktivitesinin Tespiti

1 mL U(VI) çözeltisine 1mL 2M HCl çözeltisi eklenmiştir. Karışımın üzerine 250 µL Arsenozo III (%0,1' lik) eklenmiştir. Daha sonra herbir tüpe 2.75 mL distile su ilave edilip 10 dakika oda sıcaklığında beklenmiştir. Süre sonunda U(VI) miktarı UV-spektrofotometrik olarak 651nm'de ölçülerek tespit edilmiştir (Ozdemir ve Kilinc, 2012).

Farklı U(VI) Konsantrasyonlarının α-Amilaz Enzim Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması:

E. profundum sıvı besiyerinde belli bir ön inkübasyondan sonra farklı konsantrasyonlarda U(VI) tuzlarını içeren besiyerine aktarılarak uygun inkübasyon koşullarında 96. saate kadar üretilmiştir. 0, 12., 24., 36., 48., 72.ve 96. Saatlerde kültürden örnekler alınıp 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Üst sıvı, α-amilaz aktivite tayininde kullanılmıştır.

Enzim aktivitesi Bernfeld metoduna göre belirlenmiştir (Bernfeld, 1955). Bu metoda göre 100 µL enzim çözeltisi (üst sıvı) ve 200µL % 0.5'lik çözünür nişasta çözeltisi 75 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.30 dakika sonra reaksiyonu durdurmak için, 400µL 3,5 dinitro salisilik asit (3,5 DNS) ilave edilerek 5 dakika sıcak su banyosunda 100°C'de bekletilmiştir. 3,5 DNS, sıcakta şekerlerin indirgen uçlarıyla

reaksiyona girerek reaksiyonun durmasını sağladığı gibi aynı zamanda renk oluşumunu da sağlamaktadır. Daha sonra 3mL distile su ile seyreltme yapılarak 489nm’de spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. α -amilaz için 1 Ünite Enzim: 1 μ mol nişastayı 30 dakikada maltoz birimlerine parçalayan α -amilaz enzim miktarıdır (U/mg).

Tartışma ve Sonuç

E. profundum’un U(VI) için Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları (MİK) Değerleri

Çizelge 1’de U(VI)’nın *E. profundum* için katı besiyerindeki minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) çalışması sonuçları görülmektedir. Bu sonuçlara göre katı besiyerindeki U(VI) için MİK değeri 85mg/L olarak tespit edilmiştir. *E. profundum* için sıvı besiyerindeki MİK değeri ise 15mg/L olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre *E. profundum*’un sıvı kültür ortamında katı kültür ortamına göre daha duyarlı olduğu görülmektedir. Hassen ve ark., (1998b) ve Yılmaz (2003), bakterilerin sıvı besiyerlerinde katı besiyerlerine göre metallere karşı daha duyarlı olduklarını rapor etmişlerdir. Elde ettiğimiz sonuçlar bu çalışmalarla uyum göstermektedir. Bu durumu, metallerin diffüzyon ile kompleksasyonlarının sıvı ve katı besiyerlerinde farklılık göstermesi (Ozdemir ve ark. 2012) veya sıvı besiyerlerinde bu bakterilerin metal iyonları ile katı besiyerlerine oranla daha fazla etkileşime girebileceğinden kaynaklandığını düşünebiliriz.

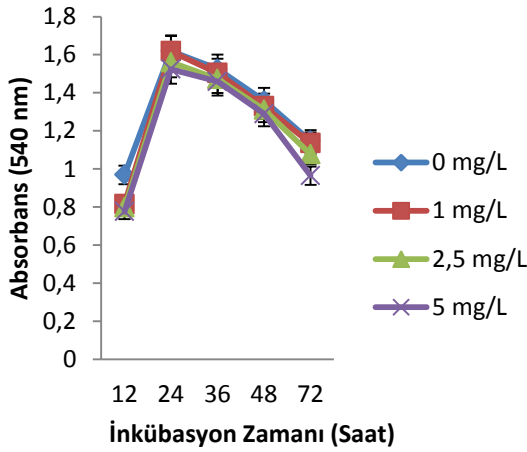
Çizelge 1. *E. Profundum*’un U(VI) için katı besiyerindeki MİK değerleri

Konsantrasyon (mg/L)	Zaman (Saat)			
	24	48	72	96
1	+	+	+	+
2.5	+	+	+	+
5	+	+	+	+
7.5	+	+	+	+
10	+	+	+	+
15	+	+	+	+
20	+	+	+	+
25	+	+	+	+
30	+	+	+	+
35	+	+	+	+
40	+	+	+	+
45	+	+	+	+
50	+	+	+	+
55	+	+	+	+
60	+	+	+	+
65	+	+	+	+
70	+	+	+	+
75	+	+	+	+
80	-	+	+	+
82.5	-	+	+	+
85	-	-	-	-
90	-	-	-	-

Farklı U(VI) Konsantrasyonlarının *E. profundum*’un Üremesi Üzerine Etkisi

Farklı U(VI) konsantrasyonlarının *E. profundum*’un üremesi üzerine etkisi Şekil 1’de görülmektedir. Kontrol ile karşılaştırıldığında test edilen tüm konsantrasyonlarda *E. profundum*’un üremesinin önemli oranda etkilenmediği saptanmıştır. 1mg/L U(VI) varlığında üremenin kontrole göre 24., 36. ve 72. saatlerde sırasıyla %99.8, %98.6 ve %97.8 oranında olduğu belirlenmiştir. 5 mg/L U(VI) varlığında ise üremenin kontrol ile karşılaştırıldığında 12., 24., 36., 48. ve 72. saatlerde %19.9, %5.9, %4.3, %5.08 ve %15.8 oranlarında azaldığı tespit edilmiştir. Ozdemir ve ark., (2017) uranyumun *B. mojavensis*’in üremesi üzerine olan etkilerini çalışmışlardır. Elde ettiğimiz veriler bu

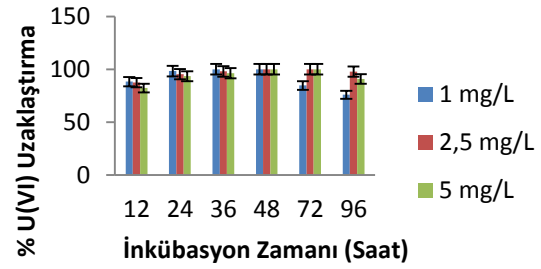
sonuçlar ile benzerlik göstermektedir. Bu sonuçlara göre atık sularında uranyum içeren nükleer tesislerde bu bakterinin üretilebileceği açıkça görülmektedir.



Şekil 1. Farklı U(VI) Konsantrasyonlarının *E. profundum*'un Üremesi Üzerine Etkisi

Farklı U(VI) konsantrasyonlarının *E. profundum* kullanarak Uzaklaştırılması Üzerine Etkisi

E. profundum'un U(VI) uzaklaştırmasının test edilen tüm konsantrasyonlarda oldukça yüksek olduğu Şekil 2'de görülmektedir. 12. ve 24. saatler 1, 2,5 ve 5mg/L U(VI) varlığında U(VI) uzaklaştırma oranları sırasıyla %88,36, %87,42% ve %82,32 ve %98,23, %95,41 ve %93,43 olarak tespit edilmiştir. 48. saatte çalışılan tüm U(VI) konsantrasyonlarında %100 uzaklaştırmanın olduğu tespit edilmiştir. İnkübasyon süresi arttığında ise uzaklaştırma oranlarının düştüğü belirlenmiştir. 96 saatlik inkübasyon sürecinde, *E. profundum* tarafından U(VI) uzaklaştırılmasında farklılıklar göstermiştir. Bu durumu hücrelerin canlı ve aktif bir metabolizmaya sahip oldukları için U(VI) uzaklaştırılmasında, dirençlilik ve uzaklaştırma mekanizmalarının birlikte rol aldığı düşünmekteyiz.

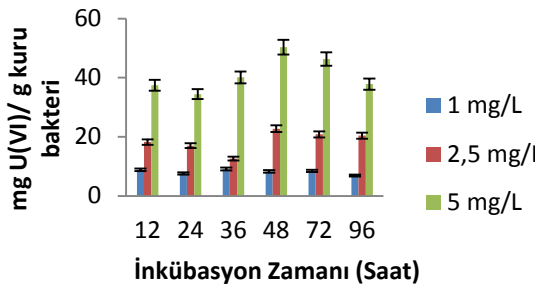


Şekil 2. Değişik İnkübasyon Zamanlarında Farklı U(VI) Konsantrasyonlarının *E. profundum* tarafından Uzaklaştırılması

Farklı U(VI) Konsantrasyonlarının *E. profundum* Kullanarak Biyoakümülyasyonu Üzerine Etkisi

Canlı mikroorganizmalar ile yapılan ağır metal biyoakümülyasyon çalışmalarında, hücre zarından karşılıklı taşınım, hücre çeperinde ve hücre dışında oluşturulan kapsüllerle biyosorpsiyon, kompleks oluşumu, çökeltme ve indirgenme-yükseltgenme gibi daha birçok mekanizmalar birlikte görev alabilmektedir (Dönmez ve Aksu 2001). Şekil 3'e baktığımızda değişik inkübasyon zamanlarında farklı U(VI) konsantrasyonlarının *E. profundum* tarafından uzaklaştırılması görülmektedir. 1, 2,5 ve 5mg/L U(VI) varlığında en yüksek biyoakümülyasyon kapasitesi sırasıyla 9,09, 22,72 ve 50,32mg U(VI)/ g kuru bakteri olarak belirlenmiştir. Test edilen tüm uranyum konsantrasyonlarında biyoakümülyasyon kapasitelerinin üreme fazlarının farklı dönemlerinde azalma ve eksilmeler şeklinde değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Canlı bakteriler ile yapılan ağır metal biyoakümülyasyon çalışmalarındaki diğer bir mekanizma ise bakteri içerisine biyoakümüle olmuş ağır metal iyonlarının ATP-bağımlı efluks mekanizmaları ile hücre dışına tekrar pompalanmasıdır. Theodorakopoulos ve ark. (2015), *Microbacterium* sp. A9 kullanarak U(VI) biyoakümülyasyonu çalışmışlar ve onlar

da üreme dönemlerinin farklı fazlarında uranyum biyoakümülyasyon kapasitelerinin değişkenlik gösterdiğini rapor etmişler ve bunu aktif uranyum efluks mekanizması ile açıklamışlardır. Benzer U(VI) aktif efluks mekanizmasının *E. profundum*'da da rol aldığını düşünmekteyiz. Bu değişkenliği de ATP-bağımlı efluks mekanizması ile açıklayabiliriz.

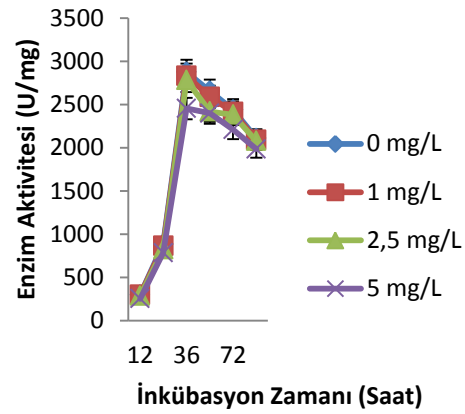


Şekil 3. Değişik İnkübasyon Zamanlarında Farklı U(VI) Konsantrasyonlarının *E. profundum* tarafından Biyoakümülyasyonu

Farklı U(VI) Konsantrasyonlarının *E. profundum*'un α -amilaz Üretimine Etkisi

Biyoteknolojide yaygın kullanılan enzimlerden birisi de α -amilazlardır. α -amilazlar dünya enzim piyasasının %25-33'lük bir kısmını oluşturmaktadır. Bu enzim nişasta moleküllerindeki α -1-4 glikozit bağını hidroliz etmektedir (Ozdemir ve ark. 2011). Şekil 4'de 1, 2.5 ve 5mg/L konsantrasyonlarındaki U(VI)'nın *E. profundum*'un α -amilaz üretimi üzerine olan etkisi görülmektedir. Çalışılan tüm konsantrasyonlarda α -amilaz üretiminin 36.saate kadar arttığı ve 36. saatten 96. saate kadar ise azaldığı belirlenmiştir. 1 mg/L U(VI) varlığında 12.-96. saatler arasında α -amilaz üretiminin kontrol ile hemen hemen aynı aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. 2.5 ve 5mg/L U(VI) varlığında 48.ve 72. saatlerde enzim üretimi kontrole kıyasla sırasıyla %8.85 ve %9.64 ve %2.33ve %9.41 oranlarında düştüğü saptanmıştır. 0, 1,

2.5 ve 5mg/L konsantrasyonlarındaki U(VI) varlığında *E. profundum* tarafından en yüksek α -amilaz üretimi sırasıyla 2874.38, 2830.28, 2781.46 ve 2453.18U/mg olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre atık sularında uranyum içeren nükleer endüstri alanlarında *E. profundum* kullanarak hem uranyum giderimi çalışılırken aynı zamanda biyoteknolojik öneme sahip α -amilazın üretimin de yapılabileceği açıkça görülmektedir.



Şekil 4. Farklı U(VI) Konsantrasyonlarının *E. profundum*'un α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisi

Farklı U(VI) Konsantrasyonlarına Maruz Kalan Canlı *E. profundum*'un Hücre Membranındaki U(VI) Biyoakümülyasyonu

Biyoakümülyasyonda, metal alınımının ilk basamağı oldukça hızlı şekilde meydana gelmekte ve metal iyonları hücre ile temas eder etmez hemen yüzey biyosorbsiyonu ile mikroorganizmaların hücre yüzeyindeki fonksiyonel gruplara bağlandığını göstermektedir (Ozdemir ve ark., 2013). Bu çalışmada da farklı U(VI) konsantrasyonlarına maruz kalan canlı *E. profundum*'un hücre membranındaki biyoakümülyasyonu tespit edilmiştir. Bu amaçla 1, 2.5 ve 5mg/L U(VI) içeren kültür ortamında *E. profundum*'un 24

saat inkübe edildikten sonra hücre membranı izole edilmiştir.1, 2,5 ve 5mg/L U(VI) varlığında biyoakümülyasyon kapasitesi sırasıyla 32.28, 108.71 ve 254.18mg U(VI)/g yaş hücre membranı olarak tespit edilmiştir. El-Helow ve ark. (2000) ve Satchanska ve ark. (2005) bakteriler ile yaptıkları çalışmada metal iyonlarının bağlanması için bakteri hücrelerinin dış yüzeyinin metal bağlanması açısından oldukça önemli olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlarda El-Helow ve ark. (2000) ve Satchanska ve ark. (2005)'nin elde etmiş oldukları sonuçları destekler niteliktedir.

Sonuç

Bu çalışmada *E. profundum*'un sıvı besiyerinde katı besiyerine göre yaklaşık 5 kat daha duyarlı olduğu bulunmuştur. *E. profundum*'un 1, 2.5 ve 5mg/L U(VI) varlığında üremesinin çok fazla etkilenmediği tespit edilmiştir... Farklı U(VI) konsantrasyonlarının *E. profundum* kullanarak biyoakümülyasyonu üzerine etkisi incelenmiş ve 48. saatte test edilen tüm konsantrasyonlarda ortamdaki tüm U(VI)'nin uzaklaştırıldığı saptanmıştır. Çalışmalar sonucunda *E. profundum*'un U(VI) biyoakümülyasyonunda etkili olması açısından çevre biyoteknolojisinde kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. Bunlara ilaveten, değişik uranyum konsantrasyonlarının nişasta endüstrisinde en yaygın kullanılan α -amilaz üretimi üzerine etkileri incelenmiş ve enzim üretiminin biyoakümülyasyon süreciyle eş zamanlı olarak yapılabileceği açıkça ortaya konmuştur.

Kaynaklar

Ahluwalia, S.S.; Goyal, D. 2007. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy

metals from wastewater. *Bioresour. Technol.*, 98, 2243–2257.

- Bernfeld, P., 1955, Enzymes carbohydrate metabolism, In *Methods In Enzymology* Academic Press, vol.17 p.149-158
- Boyanov, M.I., Kelly, S.D., Kemner, K.M., Bunker, B.A., Fein, J.B., Fowle, D.A., 2003. Adsorption of cadmium to *Bacillus subtilis* bacterial cell walls: A pH-dependent X-ray absorption fine structure spectroscopy study. *Geochi. et Cosmochi. Acta.* 67, 3299-3311.
- Costa, A.C.A., Duta F.P., 2001. Bioaccumulation of copper, zinc, cadmium, and lead by *Bacillus* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, and *Bacillus subtilis*. *Braz.J. Microbiol.* 32, 876-887.
- Das, N., Vimala, R., Karthika, P. 2008. Biosorption of heavy metals—An overview. *Indian J. Biotechnol.*, 7, 159–169.
- Dixit, R., Wasiullah, Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh U.B., Sahu, A., Shukla R., Singh B.P., Rai, J.P., Sharma P.K., Lade, H., Paul, D., 2015. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability*, 7, 2189-2212
- Donmez, G., Aksu, Z., 2001. Bioaccumulation of copper (II) and nickel (II) by the non-adapted and adapted growing *Candida* spp. *Water Res.* 35, 135-142.
- El-Helow, E.R., Sabry, S.A., Amer, R.M. 2000. Cadmium biosorption by a cadmium resistant strain of *Bacillus thuringiensis*: regulation and optimization of cell surface affinity for metal cations. *Biometals*, 13, 273–280.

- Gazso, L.G., 2001. The Key microbial processes in the removal of toxic metals and radionuclides from the environment. *Cejoem*, 7, 178-185.
- Gupta, R., Ahuja, P., Khan, S., Saxena, R.K., Mohapatra, H., 2000. Microbial biosorbents: Meeting challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Current Science*, 78:967-973.
- Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M., Boudabous, A., 1998, Effects of heavy metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis*. *Bioresource Technology*, 65, 73-82.
- Hsieh, J.L., Chen, C.Y., Chang, J.S., Endo, G., Huang, C.C., 2007. Overexpression of a Single Membran Component from the *Bacillus mer* Operon Enhanced Mercury Resistance in an *Escherichia coli* Host. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71,1494-1499.
- Hu, Q., Qi, H., Bai, Z., Dou, M., Zeng, J., Zhang, F., Zhang, H., 2007, Biosorption of cadmium by a Cd²⁺ hyperresistant *Bacillus cereus* strain HQ-1 newly isolated from a lead and zinc mine. *World J. Microbiol Biotechnol.*, 23, 971-976.
- Malik, A., 2004. Metal bioremediation through growing cells. *Environment International*, 30, 261-278.
- Ozdemir, S., Matpan, F., Guven, K., Baysal, Z. 2011, Production and characterization of partially purified extracellular thermostable α -amylase by *Bacillus subtilis* in Submerged fermentation (SmF)", *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 41, 365-381.
- Ozdemir, S., Kilinc, E., Poli, A., Nicolaus, B., Guven, K., 2012, Cd, Cu, Ni, Mn and Zn resistance and bioaccumulation by thermophilic bacteria. *Geobacillus toebii* subsp. *decanicus* and *Geobacillus thermoleovorans* subsp. *stromboliensis*", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 155-163.
- Ozdemir, S., Kilinc, E., 2012, *Geobacillus thermoleovorans* immobilized on Amberlite XAD-4 resin as a sorbent for solid phase extraction of uranium(VI) prior to its spectrophotometric determination, *Microchimica Acta*, 178, 389-397.
- Ozdemir, S., Kilinc, E., Poli, A., Nicolaus, B., 2013, Resistance and Bioaccumulation of Cd²⁺, Cu²⁺, Co²⁺ and Mn²⁺ by thermophilic bacteria, *Geobacillus thermantarticus* and *Anoxybacillus amylolyticus*, *Annals of Microbiology*, 63, 1379-1385.
- Saglam N., Cihangir N., 1995. Ağır Metallerin Biyolojik Süreçlerle Biyosorpsiyonu Çalışmaları. *Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi* 11: 157-161.
- Satchanska, G., Pentcheva, E.N., Atanasova, R., Groudeva, V., Trifonova, R., Golovinsky, E. 2005, Microbial diversity in heavy-metal polluted waters. *Environ Biotechnol*, 19,61-67.
- Spain, A., 2003. Implication of Microbial heavy metal tolerance in the environment. *Reviews in Undergra. Res.*, 2, 1-6.
- Theodorakopoulos, N., Chapon, V., Coppin, F., Floriani, M., Vercouter, T., Sergeant, C., Camilleri, V., Berthomieu, C., Février, L., 2015, Use of combined microscopic and spectroscopic techniques to reveal interactions between uranium and *Microbacterium* sp. A9, a strain isolated from the Chernobyl

- exclusion zone. J Hazard Mater.285, 285-293.
- Vijayaraghavan, K., Yun, Y.S., 2008. Bacterial biosorbents and biosorption. Biotechnology Advances. 26, 266–291.
- Yılmaz, I.E., 2003, Metal tolerance and biosorption capacity of *Bacillus circulans* strain EB1. Research in Microbiol., 154, 409–413.
- Li, J., Zhang, Y., 2012. Remediation technology for the uranium contaminated environment: a review, Procedia Environmental Sciences, 13, 1609 – 1615