

Chlorella vulgaris'in biyoflokülanlarla sıvı ortamlardan ayrılması

Separation of *Chlorella vulgaris* from liquid phase using bioflocculants

Gizem GÜNAY¹, Aynur Gül KARAHAN¹, Mehmet Lütfü ÇAKMAKÇI²

ÖZET

Amaç: Büyük ölçekte üretilen *Chlorella vulgaris*'in sıvı ortamlardan ayrılması güç ve pahalı bir işlemdir. Bu çalışmada, çeşitli örneklerden izole edilen bakterilerin biyoflokülan aktivitesinin belirlenmesi, biyoflokülanın saflaştırılması ve biyoflokülan kullanılarak *C. vulgaris*'in besiyerinden ayrılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Farklı illerden toplanan toprak ve atık su örneklerinden elde edilen izolatların morfolojik özellikleri ve Gram tepkimesi incelenmiştir. Daha sonra izolatların küme oluşturma aktivitesi spektrofotometrik ölçümler ile belirlenerek en yüksek aktiviteye sahip olan beş suşun 16S rRNA dizi analizi ile moleküler tanısı yapılmıştır. *Bacillus amyloliquefaciens* AS21a'nın küme oluşturma aktivitesinin yüksek ve kararlı olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle biyoflokülanın üretimi ve saflaştırılması işlemlerine bu suşla devam edilmiştir. Saflaştırılan biyoflokülanın yapısal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla protein tayini, karbohidrat tayini ve Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (FTIR) analizi yapılmıştır. Elde edilen biyoflokülan ham ekstraktının ve saflaştırılmış biyoflokülanın *C. vulgaris*'i çöktürme etkinliği belirlenmiştir.

ABSTRACT

Objective: Separation of *Chlorella vulgaris* from liquid phase is a difficult and expensive process to apply on a large scale. The aim of this work is the determination of bioflocculant activity of some bacterial strains isolated from different resources, purification of bioflocculant and separation of *C. vulgaris* from liquid phase using bioflocculant.

Methods: Morphological properties and Gram reactions isolated from soil and waste water samples obtained from different cities were investigated. Then the flocculating activities of the cell free culture supernatants containing bioflocculant were analyzed by using spectrophotometric method. Five strains exhibited the highest flocculating activity were identified using 16S rRNA gene nucleotide sequence analysis. The flocculating activity of *Bacillus amyloliquefaciens* AS21a was found to be higher and more stable than the other strains. For this reason, this strain was used for production and purification of bioflocculant. The structural properties of the purified bioflocculant were determined by total protein and carbohydrate analysis, and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) spectroscopy analysis. The flocculation efficiency of crude supernatant and purified bioflocculant on *C. vulgaris* was determined.

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, ISPARTA

² Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, ANKARA



İletişim/Corresponding Author : Gizem Günay

Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, ISPARTA
Tel : +90 538 719 91 19 E-posta/ E-mail : gizem_gu@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 04.06.2014
Kabul Tarihi / Accepted : 01.09.2014

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2014.47568

Günay G, Karahan AG, Çakmakçı ML. *Chlorella vulgaris*'in biyoflokülanlarla sıvı ortamlardan ayrılması. Turk Hij Den Biyol Derg, 2014; 71(4): 187-200.

Bulgular: Toprak ve atık su örneklerinden 109 adet suş izole edilmiştir. Beş suş, %40 ve üzeri yüksek küme oluşturma aktivitesine sahiptir. En yüksek aktiviteye sahip olan izolat ise atık sudan izole edilen *B. amyloliquefaciens* AS21a suşu olarak tanımlanmıştır. *B. amyloliquefaciens* AS21a suşundan elde edilen ham ekstrakt, pH'sı 8,0 olan saf kaolin süspansiyonunda %90 düzeyinde küme oluşturma aktivitesi göstermiştir. Analizler, biyoflokülantın %86,44 protein ve %13,56 karbonhidrat içeren bir biyopolimer olduğunu göstermiştir. Biyoflokülantla *C. vulgaris*'in çökeltme etkinliğinin belirlendiği denemede %51,13 düzeyinde başarı elde edilmiştir.

Sonuç: Atık suyun biyoflokülant üreten bakterilerin elde edilmesi için iyi bir kaynak olabileceği sonucuna varılmıştır. Biyoflokülant üretimi ve saflaştırılması açısından optimum koşulların sağlanmasıyla aktivitenin arttırılabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, pH ve kaolin saflığı gibi faktörlerin küme oluşturma etkiliğini etkilediği görülmüştür. Bu nedenle sıcaklık, biyoflokülant miktarı, çalkalama süresi vb. diğer etkenlerin küme oluşturma üzerindeki etkisi incelenmelidir. FTIR analizi, karbonhidrat ve protein tayinleri sonucunda biyoflokülant bileşiminde karbonhidrat içeriğinin daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle daha önce yapılan çalışmalar ışığında biyoflokülantın büyük molekül ağırlığına sahip olduğu ve bu özelliğin küme oluşumunu olumlu yönde etkilediği düşünülmektedir. *C. vulgaris* ile yapılan çalışmada; algin sıvı ortamdan kısmen ayrılması mümkün olmuştur. Ancak çökme düzeyinin arttırılması amacıyla çalışmalar sürdürülecektir. Kaolinle yapılan denemelerde başarılı sonuç alınması, biyoflokülantın atık su arıtımında kullanılabilme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Bu nedenle biyoflokülantın atık su arıtımında sağlayacağı etkinin daha sonra yapılacak çalışmalarla incelenmesi de düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Biyoflokülant, *Chlorella vulgaris*, *Bacillus amyloliquefaciens*

Results: 109 strains were isolated from samples of soil and waste water. Five strains have 40% and more high flocculating efficiency. Strain that has the highest activity has been identified as *B. amyloliquefaciens* AS21a which wastewater was isolated. The raw extract obtained from this strain showed about 90% flocculating activity in pure kaolin suspension (pH 8.0). Analysis showed that the bioflocculant is a biopolymer containing 13.56% protein and 86.44% carbohydrate. Finally, the bioflocculant produced by AS21a showed 51.13% flocculating efficiency on freshwater green microalgae *C. vulgaris*.

Conclusion: This study has shown that waste water is a rich source for bioflocculant producing microorganisms. It is believed that flocculating activity will increase at the optimum experimental conditions. Besides that, efficiency of flocculating activity was affected by factors such as pH and purity of kaolin. For this reason, the effects of other factors such as temperature, amount of bioflocculant, agitation time and etc. on the flocculating activity must be examined. Further analysis such as FTIR, carbohydrate and protein analysis showed that the main compositions of the purified bioflocculants were carbohydrates containing some proteins. Therefore, it was concluded that it has a high molecular weight and this property has increased the flocculating activity. Experimental results showed that *C. vulgaris* was partially separated from the liquid phase. However, the experiments will continue for the purpose of increasing the flocculating activity. Getting successfully experimental results with kaolin showed that bioflocculant has a potential use in wastewater treatment. For this reason, it also is thought to analyze the effect of bioflocculant on the wastewater treatment with further studies.

Key Words: Bioflocculant, *Chlorella vulgaris*, *Bacillus amyloliquefaciens*

GİRİŞ

Chlorella vulgaris tek hücreli, fotosentez yapabilen bir tatlı su algidir (1). Günümüzde biyodizel üretimi başta olmak üzere balık yemi vb. birçok alanda kullanılan mikroalglerin elde edilmesi sırasında

yaşanan en önemli güçlüklerden biri uygun maliyette ve yüksek verimliliğe sahip bir hasat tekniğinin olmayışıdır (2, 3). Araştırmacılar, hasat işlemindeki zorlukları ortadan kaldırmak için arayışlara girmiştir.

Bu bağlamda, son yıllarda biyoflokülanlara olan ilgi giderek artmaktadır. Biyoflokülanlarla çöktürmenin maliyeti uygulamadaki diğer yöntemlerden çok daha ucuzdur. Lee ve ark.'nın (2) yaptığı çalışmada; santrifüjle alg hücrelerinin ayrımının maliyeti $0,86/m^3$ Avusturya doları (A\$), flokülantla çöktürmenin $0,61/m^3$ A\$ ve biyoflokülan kullanımının $0,31/m^3$ A\$ olarak belirlenmiştir.

Maliyet açısından üstünlüklerinin yanı sıra biyoflokülanlar; toksik nitelik taşımamaları, biyobozunabilir olmaları ve yüksek aktiviteleri ile atık su arıtımı açısından da büyük umut vaat etmektedir (4, 5). Yapılan çalışmalarda; biyoflokülanlar bakteri, maya, mantar, aktinomiset ve alglerden elde edilmektedir. Daha sonra kaolini çöktürme özellikleri açısından değerlendirilmekte ve biyoflokülanın bileşimi incelenmektedir. Protein, glikoprotein, polisakkarit, lipit ve glikolipitten oluşan biyoflokülanlar belirlenmiştir (6). Biyoflokülanların yapısal özellikleri su içindeki parçacıkların küme oluşturarak çöktürülmesi açısından büyük önem taşımaktadır. İnsanlarda çevre bilincinin artmasına bağlı olarak, çevre dostu teknolojilerin uygulamada kullanılması yönündeki toplumsal talep de artmaktadır.

Bu çalışmada; alg çöktürme ve atık su arıtımı açısından önem taşıyan biyoflokülan üretimi üzerinde durulmuştur. Farklı illerden toplanan atık su ve toprak örneklerinden bakteriler izole edilmiştir. Suşlar; küme oluşturma aktivitelerine göre taranmıştır. En yüksek aktiviteye sahip suşun biyoflokülanı saflaştırılarak bileşimi FTIR analizi ile incelenmiş, toplam karbonhidrat ve protein analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca en yüksek aktiviteye sahip beş suşun 16S rRNA dizi analizi ile tanısı yapılmıştır. *C. vulgaris* ve kaolin ile çalışarak biyoflokülanın çöktürücü etkisi araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

İzmir, Isparta, Antalya, Denizli, Balıkesir ve Bursa illerinden toplanan 19 adet toprak ve Ödemiş Belediyesi Peynir Fabrikaları Atık Su Toplama Merkezi'nden alınan bir adet atık su örneği olmak üzere toplam 20 adet örnek araştırma materyali olarak kullanılmıştır. Tablo 1'de toplanan toprak örneklerinin alındığı yerler verilmiştir. Ağustos ve Ekim 2012 tarihleri arasında toplanan örnekler, izolasyon işlemlerine kadar $+4$ °C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir. Çalışmada yararlanılan *C. vulgaris* suşu Süleyman Demirel Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'nden temin edilmiştir.

Tablo 1. Toprak örneklerinin alındığı yerler

Toprak Örneklerinin Alındığı Yerler	
İl	Mevki
İzmir	Ödemiş (tarla, ev bahçesi, yol kenarı, arazi)
	Bozdağ (ağaç altı, dere kenarı)
	Birgi (yol kenarı)
	Merkez (yol kenarı, park)
Isparta	Kampus (ağaç altı)
	Gelendost (okul bahçesi)
Antalya	Merkez (otel bahçesi, ev bahçesi)
Denizli	Merkez (otogar, ev bahçesi)
Balıkesir	Susurluk (yol kenarı)
Bursa	Mudanya (yol kenarı)

1. İzolasyon ve izolatların biyoflokülan aktivitelerinin belirlenmesi

Farklı noktalardan alınan toprak ve atık su örneklerinden 109 adet izolat elde edilmiştir. Elde edilen bu izolatlar, Nutrient Agar (Merck) besiyerinde 25 °C'de 48 sa. inkübe edilmiştir. İnkübasyonun tamamlanmasından sonra suşların koloni morfolojisi, mikroskopik görüntüsü ve Gram boyama sonuçları incelenmiştir (7).

Küme oluşturma aktivitesinin belirlenmesi için suşlar; 100 mL steril Nutrient Broth (Merck) besiyeri bulunan 250 mL'lik erlenlere aşılansak 29 °C'de 48 sa. çalkalamalı inkübatörde (150 d/d) bekletilmiştir. İnkübatör süresi tamamlandıktan sonra bakteri suşlarının besiyerinden ayrılması amacıyla 4 °C'de 10000 d/d 5 dak. santrifüj işlemi uygulanmıştır (8). Daha sonra üst kısmı biyoflokülant ham ekstraktı olarak kullanılmıştır.

Biyoflokülant aktivitesinin belirlenmesi amacıyla Xia ve ark.'nın önerdiği yöntemden yararlanılmıştır (9). Kaolin süspansiyonu (4 g/L) hazırlanarak 50'şer mL'lik kısımlara ayrılmıştır. Üzerine 1,5 mL %1'lik CaCl₂ (Merck) ve 1 mL biyoflokülant içerdiği düşünölen üst kısım aktarılmıştır. Hazırlanan karışımlar 15-20 s. hızlı bir şekilde karıştırıldıktan sonra 5 dak. sabit bir şekilde çökmeye bırakılmıştır. Örneklerin absorbanşı 550 nm'de spektrofotometrede (Shimadzu) belirlenmiştir. Aşağıdaki formülden yararlanılarak biyoflokülant aktivitesi hesaplanmıştır.

$$\text{Biyoflokülant aktivitesi (\%)} = \left[\frac{(B-A)}{B} \right] \times 100$$

A; biyoflokülant içeren örneğin absorbanşı,

B; kontrolün absorbanşı

2. İnkübasyon süresi, pH ve kaolin saflığının biyoflokülant aktivitesine etkisi

İzole edilen suşlardan %40 ve üzeri biyoflokülant aktivitesine sahip olan beş adedinin 8, 12, 16, 24 ve 48 sa. sonundaki biyoflokülant aktivitelere bakılmıştır (10). En aktif suşdan elde edilen biyoflokülantın pH 6,0, 7,0 ve 8,0'de kaolini çöktürme etkinliği incelenmiştir (10, 11). Ayrıca kaolin saflık düzeyinin biyoflokülant aktivitesine etkisi de belirlenmiştir.

3. Biyoflokülantın saflaştırılması

Biyoflokülant aktivitesi en yüksek olan suş, 25 °C'de 16 sa. çalkalamalı inkübatörde (150 d/d)

inkübe edilmiştir. Saflaştırma, Zheng ve ark.'nın önerdiği yöntemde küçük değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir (4). Bakterinin besiyerinden ayrılması amacıyla 4 °C'de 10000 d/d 5 dak. santrifüj işlemi uygulanmıştır. Uygulamadan sonra üst kısım ile saflaştırma işlemine devam edilmiştir. Soğutulan üst kısım 2:1 oranında +4 °C'deki saf %99,8'lik etil alkol (Sigma) ilave edildikten sonra üst kısım +4 °C'de 12 sa. buzdolabında bekletilmiştir. Örnek, +4 °C'de 19000 d/d 10 dak. santrifüj edilerek, biyoflokülant çöktürülmüştür. Elde edilen çökeltiler, +4 °C'deki fosfat tamponunda (0,01 M, pH 8,0) çözülmüştür. Bu işlemler üç kez tekrar edilmiş, en son elde edilen çökelti aynı tampon içinde çözündürülerek 24 sa. (+4 °C) diyaliz edilmiştir. Biyoflokülant çözeltisi, diyaliz işleminden sonra liyofilizatörde (VirTis) kurutulmuştur.

4. Saf biyoflokülantın küme oluşturma aktivitesi

4.1. Kaolini çöktürücü etki

Elde edilen kuru ve saflaştırma işlemi uygulanmış biyoflokülant fosfat tamponu (0,01 M, pH 8,0) içinde çözündürülmüştür. 50'şer mL kaolin süspansiyonuna 1,5 mL %1'lik CaCl₂ ve 1 mL saf biyoflokülant eklenmiştir. 15-20 s. karıştırılmış ve 5 dak. sabit bir şekilde bekletilmiştir. Süre sonunda 550 nm'de spektrofotometrik ölçümler yapılarak biyoflokülantın küme oluşturma aktivitesi hesaplanmıştır (9).

4.2. *C. vulgaris*'i çöktürücü etki

C. vulgaris'in üretimde kullanılan besi ortamı Bristol besiyeri (pH=7,5) olup, 121 °C'de 15 dak. otoklavda sterilize edilmiştir (12). Sıcaklığı 30 ± 2 °C olan üretim ortamına *C. vulgaris* aşılansak, floresan lamba ışığında 16 sa. aydınlık, 8 sa. karanlık olacak şekilde inkübe edilmiştir.

Üretilmiş kültürlerden 50 mL alınarak CaCl₂ ve biyoflokülant miktarlarının küme oluşturma aktivitesi üzerine etkileri biyoflokülant ham ekstraktı

kullanılarak incelenmiştir. İşlemler Oh ve ark.'na göre yapılmış, ancak ham ekstrakt ve CaCl₂ miktarlarında bazı değişiklikler uygulanmıştır (13). Denemede 2 mL ham ekstrakt ve 2 mL CaCl₂ kullanılarak 10, 20 ve 30. dak. küme oluşturma aktivitesine bakılmıştır. Ayrıca ham ekstrakt miktarı arttırılarak, alg örneğine (pH 10,0) 4 mL üst kısım ve 2 mL CaCl₂ ilave edilmiştir. 1 dak. karıştırıldıktan sonra 10, 20 ve 30. dak. bekletilerek, 680 nm'de ölçümleri yapılmış ve küme oluşturma aktivitesi hesaplanmıştır. Ham ekstrakt ile yapılan denemeler neticesinde en başarılı sonucun alındığı koşullar belirlenmiştir. Saf biyoflokülantın aktivitesine bu koşullarda bakılmıştır. 25'şer mL hazırlanan alg örneğine; 20, 50, 100 ve 200 µL saf biyoflokülant çözeltisi ve 1 mL CaCl₂ eklenerek 1 dak. karıştırılmış ve 10, 20 ve 30 dak. bekletilerek 680 nm'de ölçümleri yapılmıştır.

5. Saf biyoflokülantın bileşiminin belirlenmesi

Saf biyoflokülantın bileşiminin belirlenmesi için Bradford yöntemi ile protein tayini (14), fenol-sülfürik asit yöntemi ile karbonhidrat tayini yapılmıştır (15). Biyoflokülantın FTIR analizi ise 4000-400 cm⁻¹ orta infrared bölgesinde gerçekleştirilmiştir (16). FTIR spektroskopi analizi Süleyman Demirel Üniversitesi, Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yaptırılmıştır.

6. Polimeraz zincir reaksiyonu ile dizi analizi

En yüksek küme oluşturma aktivitesine sahip beş adet suşun tanısı 16S rRNA dizi analizi yönteminden yararlanılarak Refgen Gen Araştırmaları ve Biyoteknolojisi Merkezi'nde (Ankara) yaptırılmıştır. DNA izolasyonu Qiagen DNeasy Blood&Tissue Kiti ile gerçekleştirilmiştir. 1X Taq tampon çözeltisi, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,4 pmol/µL her bir primer, 1,25 U Taq polimeraz ve 100 ng/µL genomik DNA kalıbı ile son hacim 50 µL olacak şekilde reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Geni çoğaltmak için 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') ve 1492R

(5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3') primerleri kullanılmıştır. Program 94 °C'de 1 dak. sıcaklığı takiben 30 döngü olacak şekilde 94 °C'de 30 s., 55 °C'de 30 s. ve 72 °C'de 45 s. olarak ayarlanmıştır.

7. İstatistik analizi

Küme oluşturma aktivitesine etkili faktörleri kıyaslamak amacıyla, elde edilen verilere varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Veriler arasındaki farklılığın önem düzeyi Duncan çoklu kıyaslama testi ile değerlendirilmiştir (p<0,05). İstatistik analizler SPSS (versiyon 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL) kullanılarak yapılmıştır.

BULGULAR

1. Biyoflokülant üreten suşların belirlenmesi

Toprak ve atık su örneklerinden izole edilen suşların Gram boyama, koloni morfolojisi, ve mikroskopik görünüm sonuçları ve spor oluşturma özelliği incelenmiştir. Elde edilen 109 adet suştan sekiz adedinin Bacillus cinsine ait olduğu belirlenmiştir. Suşlardan 72'sinde küme oluşturma aktivitesi belirlenirken, 29 adet suş aktivite göstermemiştir. 52 adet suş küme oluşturma aktivitesi %1-20 ve 15 adet suşun %20-40 arasında değişmektedir. Beş adet suşun aktivitesi ise %40'ın üstündedir. Bu suşlar ise %62,45 ile AS21, %53,88 ile AS21a, %46,27 ile I51e, %45,65 ile K42b ve %41,52 ile A42a'dır. Suşların adlandırılmasında; örneğin alındığı kaynak ve iller esas alınarak harf seçimi yapılmış, rakamlar ise seyreltme düzeyine göre verilmiştir.

Dizi analizi sonuçlarına göre suşlardan AS21 ve AS21a Bacillus amyloliquefaciens, I51e Pseudomonas koreensis, K42b Microbacterium oleivorans ve A42a ise Chryseobacterium indologenes olarak adlandırılmıştır. Biyoflokülant aktivitesi yüksek beş suşun çeşitli özellikleri ve 16S rRNA dizi analizi ile tür düzeyinde yapılan tanısı Tablo 2'de gösterilmiştir.

2. İnkübasyon süresi, pH ve kaolin saflığının biyoflokülant aktivitesine etkisi

İnkübasyon süresi küme oluşturma aktivitesi üzerinde etkili olmuştur. Şekil 1’de suşların farklı inkübasyon sürelerindeki küme oluşturma aktiveleri verilmiştir.

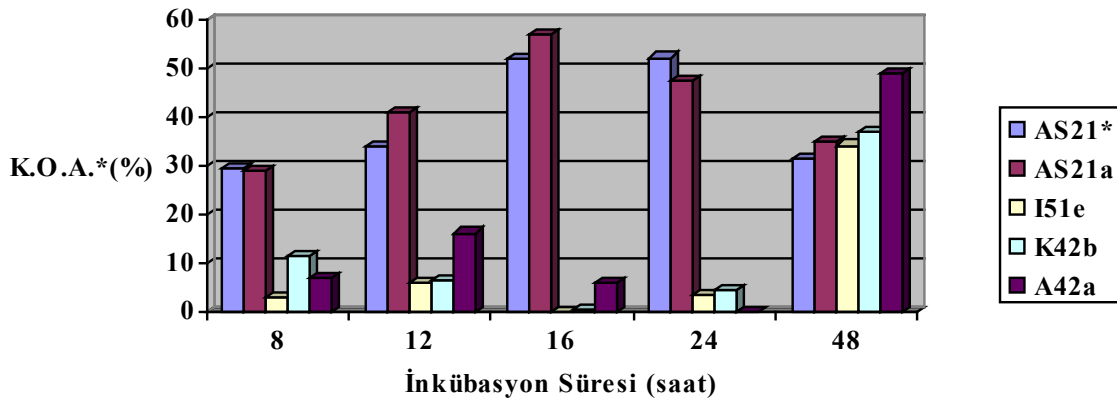
AS21 ve AS21a suşlarının sekiz sa. inkübasyon sonucunda elde edilen %29’luk küme oluşturma

aktivitesi ile sekiz sa. biyoflokülant üretmeye başladığı görülmüştür. Sekiz sa. sonra küme oluşturma aktivitesinin artarak, 16. sa. en yüksek düzeye ulaştığı ve daha sonra aktivitenin azaldığı belirlenmiştir. Diğer üç suşun 8, 12, 16 ve 24 sa. sonunda aktivite göstermediği veya aktivitenin çok düşük olduğu, 48 sa. sonunda ise aktivitenin yüksek bir seviyeye çıktığı görülmüştür.

Tablo 2. Biyoflokülant aktivitesi yüksek suşların bazı özellikleri ve tanı sonuçları

Suşların	Suşlar				
Tanı Sonuçları	AS21	AS21a*	I51e ¹	K42b ²	A42a ³
İzolasyon Kaynağı	Atık su	Atık su	Toprak	Toprak	Toprak
Morfolojik özellikleri	Krem-şeffaf renkte, bombeli, kenarlar girintili-çıkıntılı, yapışkan yapıda	Krem-şeffaf renkte, bombeli, kenarlar girintili-çıkıntılı, yapışkan yapıda	Krem renkte, parlak, kenarlar düz, hafif bombeli, yapışkan yapıda	Turuncu renkli, parlak, kenarlar düz, hafif bombeli, yapışkan yapıda	Koyu turuncu renkte, kenarlar düz, bombeli, yapışkan yapıda
Gram tepkimesi	+	+	-	+	-
Hücre şekli	Çubuk	Çubuk	Çubuk	Çubuk	Çubuk
Spor	+	+	-	-	-
K. O. A.* (%)	62,45	53,88	46,27	45,65	41,52

* *Bacillus amyloliquefaciens*, ¹*Pseudomonas koreensis*, ²*Microbacterium oleivorans*, ³*Chryseobacterium indologenes*, Küme oluşturma aktivitesi (K.O.A.)



Şekil 1. Suşların farklı inkübasyon süreleri sonunda % küme oluşturma aktiveleri (K.O.A.).

* AS21, AS21a; *Bacillus amyloliquefaciens*, I51e; *Pseudomonas koreensis*, K42b; *Microbacterium oleivorans*, A42a; *Chryseobacterium indologenes*, Küme oluşturma aktivitesi (K.O.A.)

İnkübasyon süresinin kısa olması ve tekrarlanan denemelerde küme oluşturma aktivitesini koruması nedeniyle biyoflokülant saflaştırma denemelerine *B. amyloliquefaciens* AS21a ile devam edilmiştir.

Biyoflokülant ham ekstraktının pH 6,0, 7,0 ve 8,0'de seramik yapımında kullanılan kaolini çöktürme düzeyi en yüksek pH 8,0'de belirlenirken, pH 7,0'de en düşük tespit edilmiştir. Bu nedenle bu iki pH değerinde çöktürme aktivitesine kaolin saflığının etkisi de incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 2'de sunulmuştur.

Saf kaolinle de benzer sonuçlar alınmış ve pH 8,0'de pH 7,0'ye kıyasla daha yüksek aktivite belirlenmiştir. Ancak bu aktivite farklılığı istatistiki olarak önemli bulunmamıştır ($p>0,05$). Kaolin saflığının artması ise küme oluşturma etkinliğini önemli ölçüde arttırmıştır ($p<0,05$). Saf olmayan kaolin süspansiyonunda pH 7,0'de %66 ve pH 8,0'de %78 olarak belirlenen aktivite, saf kaolin kullanıldığında pH 7,0'de %88, pH 8,0'de %90 düzeyine

yükselmiştir. İzolatların biyoflokülant aktivitelerinin belirlenmesinde saf olmayan kaolin kullanıldığı için aktivitenin %60 civarında kaldığı, ancak saf kaolin kullanıldığı takdirde bu oranın %90'a ulaştığı belirlenmiştir. Bu nedenle AS21a'nın biyoflokülant aktivitesinin saflaştırma denemeleri için yeterli olduğu sonucuna varılmıştır.

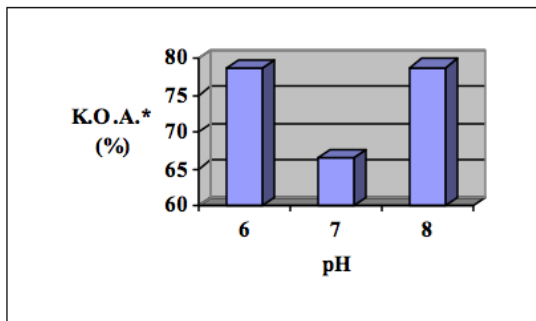
3. Saf biyoflokülantın küme oluşturma aktivitesi

3.1. Kaolinin çöktürülmesi

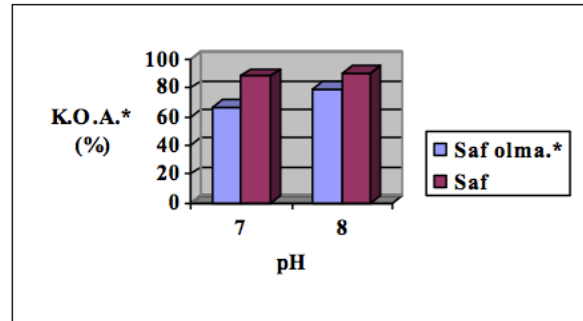
Aktivitesi en yüksek olan AS21a ile saflaştırma işlemine devam edilmiştir. Başlangıçta %60,55 olan aktivite diyaliz işleminden sonra %57,85 olarak tespit edilmiştir.

3.2. *C. vulgaris*'in çöktürülmesi

Alg çöktürülmesi ve pH 10,0'da kaolinle yapılan denemelerde benzer sonuçlar alınmıştır. pH 8,0 ve 10,0 arasında biyoflokülant aktivitesi açısından önemli bir fark görülmediği için denemeler alg kültürünün doğal ortam pH'sında (pH 10,0)



(a)



(b)

Şekil 2. (a). Farklı pH değerlerinin kaolin saflığının oluşturma aktivitesine etkisi (b). Bazı pH değerlerinin küme oluşturma aktivitesine etkisi.

* Saf olma.; Saf olmayan kaolin, Saf; Saf kaolin. Küme oluşturma aktivitesi (K.O.A.)

gerçekleştirilmiştir. Wan ve ark.'nın (17) çalışmasına göre, ham ekstrakt miktarını arttırmanın aktiviteyi olumlu yönde etkileyeceği düşünülerek, 2 mL süpernatant ve 2 mL CaCl_2 kullanılarak yapılan denemede 10, 20 ve 30 dak. bekletmenin küme oluşturma aktivitesine etkisi incelenmiştir (17). 10 dak. bekletilen örnekte aktivitenin %51,13 olduğu belirlenmiştir. Ancak daha uzun bekletme sürelerinin uygulanması aktivitenin azalması ile sonuçlanmıştır. Şekil 3'de deneme sonunda biyoflokülant uygulanmış alg kültürünün 20x büyütme ile belirlenen mikroskobik görüntüsü ve erlende küme oluşturmuş *C. vulgaris* kültürüne ait görüntüsü verilmiştir.

Yapılan diğer bir çalışmada; ham ekstrakt miktarı arttırılarak 4 mL kullanılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre, 10. dak. %39,50 ile bir önceki denemeden daha düşük küme oluşturma aktivitesi elde edilmiştir. Bunun yanı sıra diğer denemelerde olduğu gibi en yüksek aktivite 10. dakikada görülmüştür.

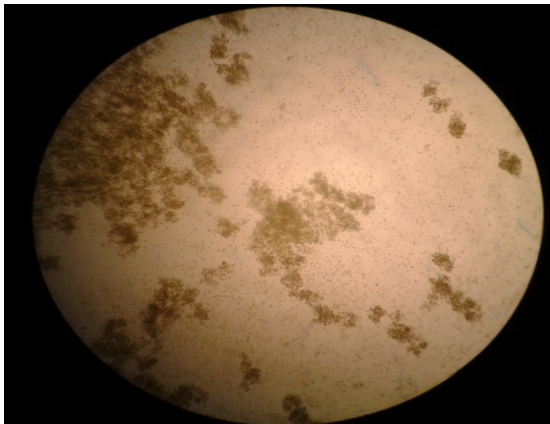
Saf biyoflokülant miktarı ve bekletme süresinin arttırılmasıyla yapılan denemelerde, 50 μL saf

biyoflokülant ilavesinde 10. ve 20. dakikada, 100 μL 'de ise 10. dakikada düşük de olsa aktivite belirlenmiştir. 20 ve 200 μL saf biyoflokülant ilave edilen örneklerde ise aktivite elde edilememiştir.

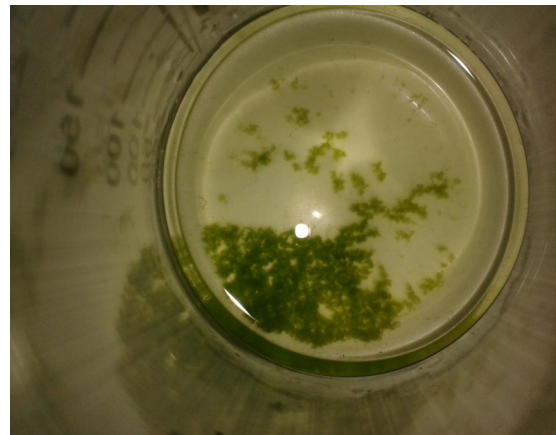
4. Biyoflokülantın bileşimi

Saflaştırılan biyoflokülantın karbonhidrat düzeyi %86,44, protein düzeyi ise %13,56'dır.

Kurutulmuş saf biyoflokülantın yapısal ve fonksiyonel özelliklerini belirlemek amacıyla FTIR analizi yapılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. 3257 cm^{-1} 'deki belirgin pik polimerik -OH gerilmesinden kaynaklanan hidroksil gruplarına özgüdür (11). Aynı bölge eter bileşiklerinin varlığına da işaret etmektedir. 1405-1384 cm^{-1} 'deki pikler ise biyoflokülantın fenol veya üçüncül alkol grupları içerdiğini göstermektedir. 1578 cm^{-1} 'deki pik amino bileşiklerin ve polisakkaritlerin pik oluşturduğu 1650-1550 cm^{-1} 'lik alanda yer almaktadır. Ayrıca karboksil grupları 1578-1384 cm^{-1} aralığındaki 6 piki oluşturmuştur (18). Biyoflokülantın -OH, -COOH ya da COO- grupları ve parçacıkların yüzeyindeki -H ve -OH grupları arasında

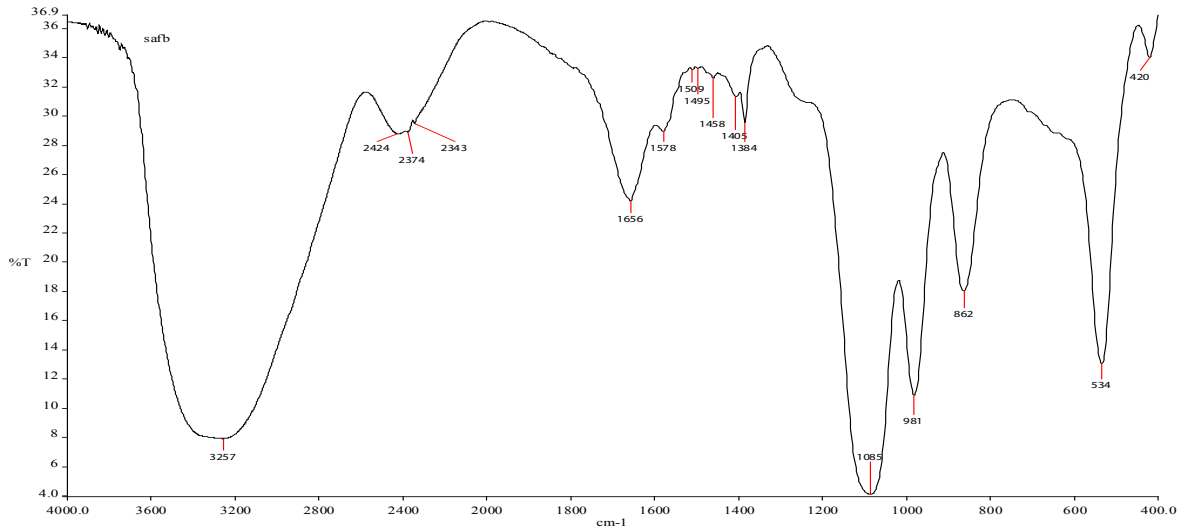


(a)



(b)

Şekil 3. (a). Alg kültürünün 20x büyütme ile mikroskobik görüntüsü (b). Küme oluşturmuş *C. vulgaris* kültürü



Şekil 4. Biyoflokülantın FTIR spektrumu

hidrojen bağı oluşabilmektedir (11). Biyoflokülantta metil grubu bulunmamaktadır. 1656 cm^{-1} 'deki pik, asitlerin ve amitlerin bileşimde yer aldığını göstermektedir. Diğer şeker türevleri 1085 cm^{-1} 'de pik vermiştir. Buna ilaveten bu bölgede, COOC ester bağlarının asimetrik gerilme salınımindan kaynaklanan pikler de oluşmaktadır (19). Ayrıca, biyoflokülantın bileşiminde aromatik halkalar ve çeşitli şeker bileşenleri de bulunmaktadır. Orta infraret bölgede yer alan gruplar ve özellikleri Şekil 4'de verilmiştir (14, 16, 20).

TARTIŞMA

1. Biyoflokülant üreten suşların belirlenmesi

Biyoflokülant çalışmalarında kullanılan suşların önemli bir bölümü *Bacillus* cinsinin çeşitli türlerindedir. *Bacillus* sp. (4, 10, 21, 22), *B. subtilis* (8, 23, 24), *B. mojavensis* (25), *B. licheniformis* (26) ve *B. mucilaginosus* (27, 28) bu türlere örnektir. Bu nedenle izolasyon

sonucu elde edilen *Bacillus* sp. olduğu belirlenen suşların biyoflokülant aktivitesi gösterebileceği düşünülmüştür.

Abd-El-Haleem ve ark.'nın (11) yaptığı çalışmaya göre, *Bacillus* suşlarından elde edilen üç farklı üst kısım küme oluşturma aktiviteleri %76, 79,8 ve 85,2 olarak belirtilmiştir (11). Bu çalışmada kullanılan suşların biyoflokülant aktiviteleri kısmen düşük olmakla birlikte, bu duruma denemelerde biyoflokülant ham ekstraktı kullanılmış olmasının ve kaolinin saflık düzeyinin etkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

2. İnkübasyon süresi, pH ve kaolin saflığının biyoflokülant aktivitesine etkisi

Farklı mikroorganizmaların biyoflokülant üretimi için gereksinim duyduğu inkübasyon süreleri farklılık göstermekte ve bu süre 24-60 sa. arasında değişmektedir. *Bacillus* cinsinden iki farklı türün (*B. mojavensis* 32A, *B. mucilaginosus* GY03) inkübasyon süreleri arasında bile büyük farklılık bulunmaktadır

(25, 28). Literatürlerde; *B. amyloliquefaciens* türüne ait biyoflokülant üreten bir suşa rastlanmamıştır. Bu açıdan elde edilen sonucun orijinal olduğu söylenebilir. Bunun yanı sıra AS21a, kısa sürede (16 sa.) biyoflokülant üretimiyle de üstünlük göstermektedir. İnkübasyon süresinin kısalması, zaman ve enerji tasarrufu açısından önemlidir. Büyük ölçekli üretimlerde kısa inkübasyon süresi, maliyeti düşüren unsurlar arasında yer almaktadır.

Farklı mikroorganizmalardan elde edilen biyoflokülantların en yüksek küme oluşturma aktivitesini gösterdikleri pH'larda farklı olabilmektedir. Örneğin; *Paceilomyces* sp. biyoflokülantı pH 4-7,5 aralığında en yüksek aktiviteyi göstermektedir. *Proteus mirabilis*'den elde edilen biyoflokülant ise, asit pH'larda düşük küme oluşturma aktivitesine sahipken, pH'nın 7,5'e yükselmesiyle aktivite artmakta ve pH 9,5'e kadar bu aktivite korunmaktadır (29, 30).

3. Saf biyoflokülantın küme oluşturma aktivitesi

3.1. Kaolinin çöktürülmesi

AS21a suşunun biyoflokülant saflaştırma işlemlerinin başlangıcında %60,55 olan aktivitesi diyaliz işleminden sonra %57,85 olarak tespit edilmiştir. Saflaştırma işlemleri sonucunda belirlenen aktivitenin farklılık göstermesi, uygulanan saflaştırma işlemlerinin aktivite üzerinde etkili olduğunu görülmüştür. Benzer şekilde Abd-El-Haleem ve ark.'nın (11) yaptığı çalışmada, *Bacillus* sp. QUST2, QUST6 ve QUST9 suşlarının ham ekstrakt aktiviteleri sırasıyla %79,8, %85,6 ve %76 olup saf biyoflokülant aktiviteleri ise sırasıyla %85, %81 ve %75 belirlenmiştir.

3.2. *C. vulgaris*'in çöktürülmesi

C. vulgaris bazik koşullarda gelişen bir algdir. Bu nedenle *C. vulgaris*'in geliştirildiği ve pH'sı 10,0 olan Bristol besiyerinde biyoflokülant etkisiyle algin çökeltmesi önem taşımaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalarda; küme oluşturma aktivitesinin bazik pH değerlerinde, asidik pH'ya göre daha yüksek olduğu ve biyoflokülant aktivitesi açısından bazik pH değerleri arasında büyük farklar olmadığı ileri sürülmüştür (13, 17, 31). Bu çalışmada da pH 8,0 ve 10,0 arasında biyoflokülant aktivitesi açısından önemli bir fark görülmediği için denemeler alg kültürünün doğal gelişme pH'sında (pH 10,0) gerçekleştirilmiştir. Böylece *C. vulgaris*'in besiyerinden ayrılması işlemleri sırasında pH ayarlaması gerekmeyeceği için maliyetin düşürülmesi de mümkün olabilecektir.

Ham ekstrakt ile yapılan denemelerde %51,13 düzeyinde küme oluşturma aktivitesi elde edilmiştir. Ancak saf biyoflokülantın miktarı ve bekletme süresinin arttırılmasıyla yapılan çalışmalarda; tüm çabalara rağmen ham ekstrakt ve saf kaolinle elde edilen sonuçlara ulaşamamıştır. Saflaştırılmış biyoflokülantın elde edilmesinde optimum koşulların sağlanması ve algin çöktürülmesinde şartların iyileştirilmesi ile aktivitenin arttırılabileceği düşünülmektedir.

4. Biyoflokülantın bileşimi

4.1. Biyoflokülantın toplam karbonhidrat ve protein miktarı

Farklı mikroorganizmalar tarafından üretilen biyoflokülantların bileşenleri ve bu bileşenlerin miktarları farklılık göstermektedir. İncelenen biyoflokülantların yapısında karbonhidratlar, proteinler, lipitler ve organik asitler yer alabilmektedir. Suh ve ark.'nın (32) yaptığı çalışmada; *Bacillus*

sp. DP-152 suşundan elde edilen biyoflokülantın bileşiminde %82,4 düzeyinde polisakkaritin yanı sıra asetik asit, pürivik asit ve üronik asidin bulunduğu tespit edilmiştir. Biyoflokülantın molekül ağırlığı ise 2×10^6 Da olarak ölçülmüştür. *Bacillus mucilaginosus* MBFA9 biyoflokülantının %93 düzeyinde içerdiği karbonhidratın yanında üronik asit, nötral şeker ve amino şekerin de bulunduğu, ancak bileşiminde proteinin bulunmadığı bildirilmiştir. %99,6 küme oluşturma aktivitesine sahip olan biyoflokülantın molekül ağırlığı ise $2,6 \times 10^6$ Da'dur (28). Diğer mikroorganizmalar ile yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlara rastlanmıştır. *Aspergillus parasiticus*'dan elde edilen biyoflokülantın %76,3'ünün karbonhidrat ve %21,6'sının proteinden oluştuğu belirlenmiştir. Biyoflokülantın molekül ağırlığı $3,2 \times 10^5$ Da tespit edilmiştir (33). Çalışmaların sonuçları kıyaslandığında ise karbonhidrat miktarı daha fazla olan biyoflokülantın molekül ağırlığının daha büyük olduğu ve bunun küme oluşturma aktivitesini olumlu yönde etkilediği görülmektedir. Bu çalışmada; saflaştırılan biyoflokülantın yapısında %86,44 düzeyinde karbonhidrat, %13,56 düzeyinde ise protein bulunmasının çöktürme aktivitesinin artması açısından üstünlük yarattığı düşünülmektedir. Karbonhidrat içeriğinin yüksekliği molekül ağırlığını da arttırdığından, biyoflokülant çözeltisi yüksek bir küme oluşturma aktivitesi göstermiştir.

4.2. FTIR analizi

FTIR spektrumunda -OH gruplarının varlığı bir ya da birden fazla su molekülü ile hidrojen bağı yapabileceği

olasılığını göstermektedir. Bu da biyoflokülantın suda iyi bir şekilde çözünür olduğunun göstergesidir (11). Bunun yanı sıra hidroksil grubu şeker halkasındaki OOH ya da ONH'nin salınımından da köken alabilmektedir (19). $1578-1384 \text{ cm}^{-1}$ aralığındaki altı piki oluşturan karboksil grupları, biyoflokülant-iyon-parçacık ağının oluşumundan sorumlu işlevsel gruplardandır (18). FTIR analizinde elde edilen tüm sonuçlar bir arada değerlendirildiğinde; biyoflokülantın protein içeren bir heteropolisakkarit olduğu sonucuna varılabilir. Spektrofotometrik yöntemle yapılan karbonhidrat ve protein tayinleri bu sonuçla uyum göstermektedir. Ancak biyopolimerin yapıtaşlarının tam olarak anlaşılabilmesi kromatografik analizlerle mümkündür.

Birçok alanda kullanılan mikroalglerin biyokütle hasadında çeşitli yöntemler bulunmasına rağmen bu işlemin daha kolay, ucuz ve çevreye zarar vermeden gerçekleştirilmesi için farklı bir yöntem arayışına gidilmiştir. Birçok olumlu yönleri ile umut vaat eden biyoflokülantlar; yüksek hasat verimliliği, biyolojik olarak parçalanabilir olması ve toksik olmaması ile son zamanlarda mikroalg hasadının yanı sıra atık su arıtımı araştırmaların da odak noktası haline gelmiştir. Bu nedenle, yüksek aktiviteye sahip *B. amyloliquefaciens* AS21a suşu biyoflokülantının mikroalg hasadında kullanılmasıyla ilgili çalışmaların sürdürülmesi, ayrıca atık su arıtımı alanında da araştırmaların yapılması gerekmektedir. Böylelikle, elde edilen olumlu sonuçlar ile ülkemiz ve dünyadaki bazı çevresel sorunların önüne geçmek mümkün olabilecektir.

TEŞEKKÜR

Çalışmada kullanılan *C. vulgaris* suşu Süleyman Demirel Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Sevgi Savaş'dan sağlanmıştır. Kendilerine teşekkür ederiz.

Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda yüksek lisansını tamamlayan Gizem Günay'a ait yüksek lisans tezinden hazırlanmıştır. Tez çalışması, Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri 3286-YL1-12 nolu proje ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı SDÜ BAP Koordinasyon Birimi'ne de teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Özdiş Ö. Krom (VI) birikiminin *Chlorella vulgaris*'te hücre sayısı, klorofil, büyüme hızı, protein ve şeker miktarlarına etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2005.
2. Lee AK, Lewis DM, Ashman PJ. Energy requirements and economic analysis of a full-scale microbial flocculation system for microalgal harvesting. *Chem Eng Res and Design*, 2010; 88: 988-96.
3. <http://w3.gazi.edu.tr/~tahir/alg/resim.htm> (08.06.2013).
4. Zheng Y, Ye ZL, Fang XL, Li YH, Cai WM. Production and characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus* sp. F19. *Bioresour Technol*, 2008; 99: 7686-91.
5. Jia B, Yu J. The research status and development trend of microbial flocculant. *Physics Procedia*, 2012; 24: 425-8.
6. Zheng H, Gao Z, Yin J, Tang X, Ji X, Huang H. Harvesting of microalgae by flocculation with poly (c-glutamic acid). *Bioresour Technol*, 2012; 112: 212-20.
7. Karahan AG, Arıdoğan B, Çakmakçı ML. Genel mikrobiyoloji uygulama kılavuzu. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi Yayınları, 2002.
8. Vijayalakshmi SP, Raichur AM. The utility of *Bacillus subtilis* as a bioflocculant for fine coal. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2003; 29: 265-75.
9. Xia S, Zhang Z, Wang X, Yang A, Chen L, Zhao J, et al. Production and characterization of a bioflocculant by *Proteus mirabilis* TJ-1. *Bioresour Technol*, 2008; 99: 6520-7.
10. Feng DL, Xu SH. Characterization of bioflocculant MBF3-3 produced by an isolated *Bacillus* sp. *World J Microbiol Biotechnol*, 2008; 24: 1627-32.
11. Abd-El-Haleem DAM, Al-Thani RF, Al-Mokemy T, Al-Marii S, Hassan F. Isolation and characterization of extracellular bioflocculants produced by bacteria isolated from Qatari ecosystems. *Pol J Microbiol*, 2008; 57 (3): 231-9.
12. http://www.dls.ym.edu.tw/ol_biology2/ultranet/Media.html (14.12.2000).

13. Oh HM, Lee SJ, Park MH, Kim HS, Kim HC, Yoon JH, et al. Harvesting of *Chlorella vulgaris* using a bioflocculant from *Paenibacillus* sp. AM49. *Biotechnol. Lett*, 2001; 23: 1229-34.
14. Lu WY, Zhang T, Zhang DY, Li CH, Wen JD, Du LX. A novel bioflocculant produced by *Enterobacter aerogenes* and its use in defecating the trona suspension. *Biochem Eng J*, 2005; 27: 1-7.
15. Nomura T, Araki S, Nagao T, Konishi Y. Resource recovery treatment of waste sludge using a solubilizing reagent. *J Mater Cycles Waste Manag*, 2007; 9: 34-9.
16. Nwodo UU, Agunbiade MO, Green E, Nwamadi M, Rumbold K, Okoh AI. Characterization of an exopolymeric flocculant produced by a *Brachybacterium* sp. *Materials*, 2013; 6: 1237-54.
17. Wan C, Zhao XQ, Guo SL, Alam MA, Bai FW. Bioflocculant production from *Solibacillus silvestris* W01 and its application in cost-effective harvest of marine microalga *Nannochloropsis oceanica* by flocculation. *Bioresour Technol*, 2013; 135: 207-12.
18. Auhim HS, Odaa NH. Optimization of flocculation conditions of exopolysaccharide bioflocculant from *Azotobacter chroococcum* and its potential for river water treatment. *J Microbiol Biotech Res*, 2013; 3(3): 93-9.
19. Xiong Y, Wang Y, Yu Y, Li Q, Wang H, Chen R, et al. Production and characterization of a novel bioflocculant from *Bacillus licheniformis*. *Appl Environ Microbiol*, 2010; 76 (9): 2778-82.
20. <http://chemistry.oregonstate.edu/courses/ch361-464/ch362/irinterp.htm> (06.07.2013).
21. Kumar GC, Joo HS, Kavali R, Choi JW, Chang CS. Characterization of an extracellular biopolymer flocculant from a haloalkalophilic *Bacillus* isolate. *World J Microbiol Biotechnol*, 2004; 20 (8): 837-43.
22. Salehizadeh H, Vossoughi M, Alemzadeh I. Some investigations on bioflocculant producing bacteria. *Biochem Eng J*, 2000; 5: 39-44.
23. Sathiyarayanan G, Seghal Kiran G, Selvin J. Synthesis of silver nanoparticles by polysaccharide bioflocculant produced from marine *Bacillus subtilis* MSBN17. *Colloids Surf B: Biointerf*, 2013; 102: 13-20.
24. Bajaj IB, Singhal RS. Sequential optimization approach for enhanced production of poly(γ -glutamic acid) from newly isolated *Bacillus subtilis*. *Food Technol Biotechnol*, 2009; 47 (3): 313-22.
25. Elkady MF, Farag S, Zaki S, Abu-Elreesh G, Abd-El-Haleem D. *Bacillus mojavensis* strain 32A, a bioflocculant-producing bacterium isolated from an Egyptian salt production pond. *Bioresour Technol*, 2011; 102: 8143-51.
26. Li Z, Zhong S, Lei H, Chen R, Yu Q, Li H. Production of a novel bioflocculant by *Bacillus licheniformis* X14 and its application to low temperature drinking water treatment. *Bioresour Technol*, 2009; 100: 3650-6.
27. Lian B, Chen Y, Zhao J, Teng H, Zhu L, Yuan S. Microbial flocculation by *Bacillus mucilaginosus*: applications and mechanisms. *Bioresour Technol*, 2008; 99: 4825-31.
28. Deng SB, Bai RB, Hu XM, Luo Q. Characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus mucilaginosus* and its use in starch wastewater treatment. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003; 60: 588-93.
29. Salehizadeh H, Shojaosadati SA. Extracellular biopolymeric flocculants: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnol Adv*, 2001; 19: 371-85.
30. Zhang Z, Xia S, Zhao J, Zhang J. Characterization and flocculation mechanism of high efficiency microbial flocculant TJ-F1 from *Proteus mirabilis*. *Colloids Surf B: Biointerf*, 2010; 75: 247-51.

31. Teixeira CMLL, Kirsten FV, Teixeira PCN. Evaluation of *Moringa oleifera* seed flour as a flocculating agent for potential biodiesel producer microalgae. *J Appl Phycol*, 2012; 24: 557-63.
32. Suh HH, Kwon GS, Lee CH, Kim HS, Oh HM, Yoon BD. Characterization of bioflocculant produced by *Bacillus* sp. DP-152. *J Ferment Bioeng*, 1997; 84 (2): 108-12.
33. Deng S, Yu G, Ting YP. Production of a bioflocculant by *Aspergillus parasiticus* and its application in dye removal. *Colloids Surf B: Biointerf*, 2005; 44: 179-86.