

Aşırı Asidik Ortamlarda Prokaryotik Çeşitliliğın Geleneksel ve Moleküler Yöntemlerle
Belirlenmesi ve Biyodesülfürizasyonda Kullanılabilirliğı

Pınar Aytar

DOKTORA TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Aralık, 2012

Determination of Prokaryotic Diversity in Extreme Acidic Environments with
Conventional and Molecular Methods and Usability at Biodesulphurization

Pınar Aytar

DOCTORATE THESIS

Department of Biology

December, 2012

Aşırı Asidik Ortamlarda Prokaryotik Çeşitliliğin Geleneksel ve Moleküler Yöntemlerle
Belirlenmesi ve Biyodesülfürizasyonda Kullanılabilirliği

Pınar Aytar

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca

Biyoloji Anabilim Dalı

Genel Biyoloji Bilim Dalı

DOKTORA TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç.Dr. Ahmet Çabuk

Aralık, 2012

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Pınar Aytar'ın Doktora tezi olarak hazırladığı "Aşırı Asidik Ortamlarda Prokaryotik Çeşitliliğin Geleneksel ve Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi ve Biyodesülfürizasyonda Kullanılabilirliği" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Ahmet Çabuk

İkinci Danışman : –

Doktora Tez Savunma Jürisi:

Üye: Doç. Dr. Ahmet ÇABUK

Üye: Prof. Dr. Nazif KOLANKAYA

Üye: Prof. Dr. Semra İLHAN

Üye: Prof. Dr. Tamer AKAR

Üye: Doç. Dr. Mehmet Burçin MUTLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof.Dr. Nimetullah BURNAK
Enstitü Müdürü

ÖZET

Biyoteknolojik potansiyele sahip yeni mikroorganizmalara kaynak olabileceğinden dolayı asidik ortamlarda bulunan mikroorganizmaları belirlemek ekolojik ve pratik açıdan önemlidir. Bu tez çalışmasının öncelikli hedefi asidik maden drenajı (AMD) gibi asidik sularda yaşayan asidofilik mikroorganizmaların çeşitliliğinin belirlenmesidir. Ülkemizde asidik çevrelerdeki mikrobiyal çeşitlilik hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Balıkesir ve Çanakkale’de bulunan Balya ve Çan asidik maden drenajları olarak adlandırılan sabit pH değerine sahip bu çevrelerdeki mikrobiyal komünite, floresan in situ hibridizasyon, denatüre edici jel elektroforezi, terminal restriksiyon uzunluk polimorfizmi gibi moleküler yaklaşımlar ve klasik mikrobiyal (kültürel) tekniklerin kombinasyonu ile değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, Balya AMD’den *Acidithiobacillus ferrivorans*, *Acidithiobacillus* sp., 2 farklı *Ferrimicrobium* sp., *Actinobacterium* sp., *Acidiphilium* sp., ve *Acidobacteriaceae* familyasına ait bir bakteri şeklinde 7 ve Çan AMD’den *Leptospirillum* sp., *Acidobacteriaceae* familyasına ait bir bakteri, *Acidiphilium* sp. ve kültüre edilmemiş bir bakteri şeklinde 4 tür izole edilmiştir.

Balya AMD’den elde edilen izolatlardan, kükürt ve demir metabolizmasına sahip bir suş olan, *At. ferrivorans*’ın biyodesülfürizasyon kapasitesi çalışılmıştır. Desülfürizasyon optimizasyon deneyleri Taguchi yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. pH, inokulum miktarı, pulp yoğunluğu, kömür partikül boyutu ve inkübasyon süresinin değerlendirildiği optimizasyon deneylerinde belirlenen koşullar; sırası ile 2,5; %2, %1, -500+212 µm, 15 gün olmuş ve %30 toplam kükürt giderim verimi elde edilmiştir. Biyodesülfürizasyondan sonra kömür yüzeyindeki değişimler taramalı elektron mikroskopu (SEM) ve FTIR analizi ile değerlendirilmiştir. Özellikle SEM analizi pirit kristallerine bakterinin yaptığı atağı göstermektedir, bu kristaller işlem görmemiş kömür kristalleri ile karşılaştırıldığında açık bir şekilde korozyon ve deformasyona uğradıkları görülmüştür. Bununla birlikte redoks potansiyeli ile Fe⁺² ölçümleri, kükürt oksidasyonunun yanısıra ferro demirin yükseltgenmesi ve ferrik demir indirgenmesi reaksiyonlarının varlığını göstermiştir.

Anahtar Kelime: Asidofil, asidik maden drenajı, biyodesülfürizasyon

SUMMARY

Determining the microorganisms present in the acidic environments has ecological and practical importance, being a source of new microorganisms with biotechnological potential. The first aim of the thesis study is determining the biodiversity of acidophilic prokaryotes living in acidic waters, such as acidic mine drainage. Very little is known about microbiological diversities of acidic environments at Turkey. Microbial communities in extreme acidic environments with a rather constant acidic pH, acidic mine drainages of Çan and Balya, at Çanakkale and Balıkesir were investigated a combination of classical microbiology (cultivation techniques) and molecular biology approaches including fluorescent in situ hybridisation, denaturing gradient gel electrophoresis, terminal restriction fragment length polymorphism, examined microbiological diversity and found the correlation between the approaches. As the result of this study, seven strains such as *Acidithiobacillus ferrivorans*, *Acidithiobacillus* sp., two different *Ferrimicrobium* sp., *Actinobacterium* sp., *Acidiphilium* sp., and a bacterium belonging to *Acidobacteriaceae* were isolated from Balya AMD, and four strains including *Leptospirillum* sp., a bacterium belonging to *Acidobacteriaceae*, *Acidiphilium* sp. and uncultured bacterium were isolated Çan AMD.

The biodesulphurization capability of a strain having sulphur and iron metabolism isolated from acidic mine drainage of Balya (Turkey) was studied. When molecular identification was carried out, this bacterium was shown that it was a strain of *At. ferrivorans*. Desulphurization optimization experiments were performed by Taguchi's method. The optimum conditions for these parameters have found to be pH 2.5, 2% of inoculum amount, 1% of pulp density, $-500+212$ μm of particle size, and 15 days of incubation period. The obtained yields were about 30% in removal of total sulphur. Scanning electron microscope (SEM) and FTIR analysis also indicated a modification of coal surface after biodesulphurization. Especially, SEM analysis showed that the attack of bacterium on pyrite crystals and there was clear corrosion and deformation on the pyrite surface compared to untreated coal. Besides, the redox potential and Fe^{+2} measurement demonstrated that sulphur oxidation was coupled with ferrous iron oxidation and ferric iron reduction.

Keywords: Acidophile, acidic mine drainage, biodesulphurization

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının başlangıcından bitimine kadar bilgisi ve tecrübesi ile her türlü desteği sağlayan, ayrıca kendimi geliştirmem için yurt dışı çalışmalarım konusunda katkılarını benden esirgemeyen ve en iyiyi başarma yönündeki tutumuyla her zaman örnek aldığım değerli danışman Hocam Doç. Dr. Ahmet ÇABUK'a,

Özellikle moleküler çalışmalarda beni yönlendirip desteğini ve yardımını esirgemeyen Hocam Doç. Dr. Mehmet Burçin MUTLU'ya,

Tez izleme komitesinde bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım hocalarım Prof.Dr.Nazif KOLANKAYA ve Prof.Dr.Tamer AKAR'a,

Tez süresince Bangor Üniversitesi/İngiltere'de çalışmalarımın sürdürülmesini sağlayan ve laboratuvarındaki tüm olanakları kullanmamı sağlayan başta Prof. Dr. David Barrie JOHNSON ve Dr. Cath KAY olmak üzere tüm Bangor Asidofil Araştırma Ekibi'ne,

Çalışmamın gerçekleştirilmesinde su örneklerinin alınabilmesi için her türlü fedakarlığı gösteren kardeşim Cemal AYTAR'a,

Analizler konusunda desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Sabiha KOCA, Yrd. Doç. Derya Öz AKSOY, Doç Dr. Evrim HÜR, Doç. Dr. Okan Zafer YEŞİLEL, M.T.A. Kömür Analiz Laboratuvar çalışanlarına, yüksek mühendis Yeliz BURUK'a, Balıkesir Üniversitesi Temel Araştırma Merkezi Laboratuvarı çalışanlarına,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardım ve dayanışmalarından ötürü öncelikle Serap GEDİKLİ, Meltem ÇELİKDEMİR, Yağmur TOPTAŞ ve Gökhan GÜNGÖRMEDİ ve tüm Biyoteknoloji Laboratuvarı çalışanlarına;

Bu tez Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 20111908 no'lu proje ile desteklenmiştir. Proje desteği sağlayan ESOGÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na,

Doktora sürecim esnasında bana burs desteği sağlayan TÜBİTAK-BİDEB'e,

Hayatımın her anında olduğu gibi doktora tez çalışmam süresince de her türlü desteği sağlayan, her zaman moral kaynağı olan, gösterdikleri sabır ve anlayıştan ötürü Kemal ÇELİK'e ve çok değerli aileme teşekkür ederim.

Pınar AYTAR

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA</u>
ÖZET	V
SUMMARY	VI
TEŞEKKÜR	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XV
ÇİZELGELER DİZİNİ	XIX
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Düşük pH değerine sahip ortamlar.....	4
2.1.1. Jeotermal ve volkanik alanlar.....	5
2.1.2. İnsan etkisiyle oluşan asidik bölgeler.....	6
2.1.2.1. Asidik maden drenajları.....	6
2.1.2.2. Atık ve yığınların biyooksidasyonu.....	10
2.1.2.3. Biyooksidasyon tankları.....	10
2.2. Asidik Çevrelere Adaptasyon Mekanizmaları.....	11
2.3. Aşırı Asidofilik Bakterilerin Biyoçeşitliliği.....	13
2.3.1. Demir okside eden ototroflar.....	13
2.3.2. Kükürt okside eden asidofiller.....	15
2.3.3. Demir ve kükürt okside eden ototroflar.....	17
2.3.4. Demir okside eden mikсотrof ve heterotroflar.....	19
2.3.5. Kükürt okside eden heterotroflar.....	20
2.3.6. Demir ve kükürt okside eden mikсотroflar.....	21
2.3.7. Demir–indirgeyen heterotroflar.....	22
2.3.8. Diğer asidofilik heterotrof bakteriler.....	22
2.3.9. Asidofilik arkeler.....	23

İÇİNDEKİLER (Devamı)

	<u>SAYFA</u>
2.3.9.1. <i>Crenarchaeota</i>	24
2.3.9.2. <i>Euryarchaeota</i>	25
2.3.10. Ökaryotik asidofiller.....	26
2.4. Asidofilik Mikroorganizmalar Arasındaki İlişkiler.....	28
2.4.1. Rekabet.....	28
2.4.2. Mutualizm.....	28
2.4.3. Sinerjizm.....	30
2.4.4. Ammensalizm.....	31
2.4.5. Predasyon.....	31
2.5. Asidofillerin Kültürasyonu.....	31
2.5.1. Sıvı besiyeri.....	31
2.5.1.1. Kemolitotrofik asidofillerin kültürasyonu.....	32
2.5.1.2. Heterotrofik ve miksotrofik asidofiller.....	34
2.5.2. Katı ortam.....	35
2.6. Aşırı Asidofillerin Karbon ve Enerji Kaynakları.....	38
2.6.1. Asidofilik ototrofların CO ₂ fiksasyonu.....	39
2.6.2. Ototrofik asidofiller için elektron vericileri.....	40
2.6.2.1. İndirgenmiş inorganik kükürt bileşikleri (İİKB).....	40
2.6.2.2. Demir.....	41
2.6.2.3. Alternatif elektron vericileri.....	42
2.6.3. Heterotrof asidofiller için elektron vericileri ve karbon kaynakları.....	42
2.6.4. Elektron alıcıları.....	43
2.7. Biyojeokimyasal Döngülerden Kükürt ve Demir Döngülerinde Asidofil Organizmaların Rolü.....	44
2.7.1. Kükürt döngüsü.....	45
2.7.2. Demir döngüsü.....	46
2.7.2.1. Ferro demir oksidasyonundan enerji eldesi.....	48
2.8. Asidofilik Prokaryotlarda Kükürt Metabolizması.....	49

İÇİNDEKİLER (Devamı)

SAYFA

2.8.1. İndirgenmiş kükürt bileşiklerini aerobik metabolize eden enzim ve yol izleri.....	49
2.8.2. Metabolizmada indirgenmiş kükürt bileşikleri.....	50
2.8.3. İndirgenmiş kükürt bileşiklerinin anaerobik metabolizması.....	52
2.8.4. Kükürt asimilasyonu.....	53
2.8.5. Kükürt oksidasyonunun enerjietiği.....	54
2.9. Uygulamalı Yaklaşımlar.....	57
2.9.1. Madencilik sürecinde ortaya çıkan sularda indirgenmiş kükürt bileşiklerinin oksidasyonu.....	59
2.9.2. Biyolojik zenginleştirme.....	59
2.9.3. Asidofil sülfidojenlerle seçici metal tutumu.....	60
2.9.4. Biyodesülfürizasyon.....	61
2.9.4.1. Desülfürizasyon sürecine ihtiyaç duyulan kömürler.....	61
2.9.4.2. Kömürden biyolojik kükürt gideriminde kullanılan mikroorganizmalar.....	64
2.10. AMD’lerde Yer Alan Prokaryotların ve Metabolik Fonksiyonlarının Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler.....	66
2.10.1. AMD’lerde yer alan prokaryotların belirlenmesinde kullanılan moleküler yöntemler.....	66
2.10.1.1. 16S klon kütüphanesi oluşturma.....	69
2.10.1.2. Amplifiye edilmiş ribozomal DNA restriksiyon analizi.....	69
2.10.1.3. Denatüre edici jel elektroforezi ve sıcaklık gradiyentli jel elektroforezi	69
2.10.1.4. Rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA	71
2.10.1.5. Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi	71
2.10.1.6. Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi ve terminal restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi	71
2.10.1.7. Otomize ribozomal genler arası alan analizi ve ribozomal genler arası alan analizi	73

İÇİNDEKİLER (Devamı)

	<u>SAYFA</u>
2.10.1.8. Tek iplik konformasyonel polimorfizm	73
2.10.1.9. Değişken Alanlı Jel Elektroforezi	74
2.10.1.10. Rep-PCR.....	74
2.10.1.11. Real time PCR.....	75
2.10.1.12. Floresan in situ hibridizasyon	75
2.10.2. AMD'lerin etkiledikleri çevrelerde yer alan prokaryotların fonksiyonları ile ilişkilendirmesini ortaya çıkaran teknolojiler.....	76
2.10.2.1. Mikroarray.....	76
2.10.2.2. Metagenomikler.....	77
2.10.2.3. Metaproteomikler.....	78
2.11. Desülfürizasyon Sürecinde Uygulanabilecek Potansiyel Deneysel Tasarımlar....	79
2.11.1. Taguchi Yöntemi.....	79
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	82
3.1. Materyal.....	82
3.1.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.....	82
3.1.2. Çalışmada kullanılan cihazlar.....	82
3.1.3. Çalışmada kullanılan besiyerleri.....	83
3.1.3.1. İnorganik demir ortamı (iFeo).....	83
3.1.3.2. Kükürt ortamı (FeSo)	84
3.1.3.3. Heterotrofik ortam (Yeo)	85
3.1.3.4. Demir-tripton soya broth ortam (FeTSBo)	87
3.1.3.5. <i>Acidiphilium</i> SJH aşılama besiyeri	87
3.1.3.6. <i>Acidocella</i> PFBC aşılama besiyeri	88
3.1.3.7. Luria Bertani (LB) besiyeri	88
3.1.3.8. SOC besiyeri.....	88
3.1.3.9. Desülfürizasyon besiyeri.....	89
3.1.4. Çalışmada kullanılan çözeltiler.....	89
3.1.4.1. Dilüsyon ortamı.....	89
3.1.4.2. 50X heterotrofik bazal tuz çözeltisi	90

İÇİNDEKİLER (Devamı)

	<u>SAYFA</u>
3.1.4.3. Bazal tuz çözeltisi	90
3.1.4.4. İz Element Çözeltisi	90
3.1.4.5. TAE 50X	91
3.1.4.6. TBE 5X	91
3.1.4.7. PBS 10X	92
3.1.4.8. Mackintosh çözeltisi	92
3.1.4.9. Lizozim stok çözeltisi	92
3.1.4.10. %80' lik DGGE stok solusyonu.....	93
3.1.4.11. %0' lık DGGE stok solusyonu.....	93
3.1.4.12. %10 amonyum persülfat çözeltisi	93
3.1.4.13. %10 SDS çözeltisi.....	94
3.1.4.14. In situ hibridizasyon tampon.....	94
3.1.4.15. FISH için yıkama tampon.....	94
3.1.4.16. X-gal çözeltisi.....	94
3.1.4.17. IPTG çözeltisi	95
3.1.5. Moleküler çalışmalarda kullanılan primer ve oligonükleotit problemler.....	95
3.2. Yöntem.....	97
3.2.1. Çalışma alanlarının özellikleri ve su örneklerinin alınması.....	97
3.2.2. Mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesine yönelik komünite analizleri.....	102
3.2.2.1. Kültüre bağlı yöntemler.....	102
3.2.2.2. Kültürden bağımsız komünite analizleri.....	104
3.2.2.3. Biyodesülfürizasyon deneyleri.....	113
3.2.3. Seçilen izolatın farklı kömür örnekleri kullanılarak biyodesülfürizasyon etkinliğinin belirlenmesi.....	115
3.2.3.1. Seçilen izolatın farklı kömür örnekleri kullanılarak biyodesülfürizasyon etkinliğinin belirlenmesi.....	116
3.2.4. Etkin izolatın metabolik özellikleri ile desülfürizasyon sürecinin ilişkilendirilmesi.....	117
3.2.4.1. Kömürün biyodesülfürizasyon öncesi ve sonrası fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR) spektroskopisi.....	117

İÇİNDEKİLER (Devamı)

	<u>SAYFA</u>
3.2.4.2. SEM Analizleri.....	117
3.2.4.3. Desülfürizasyonda sürecinde Fe ⁺² oksidasyonunun belirlenmesi.....	117
3.2.4.4. Kömürün kalori, emisyon değerlerindeki değişimin belirlenmesi.....	120
3.2.4.5. Kömür kalitesini etkileyebilecek parametrelerin desülfürizasyon öncesi ve sonrası ölçümleri.....	121
3.2.4.6. TGA/DTA analizleri.....	121
4. BULGULAR.....	122
4.1.Örneklem Yerleri ve Alınan AMD Örneklerinin Metal Analizleri.....	122
4.2.AMD Örneklerinden Asidofil Bakteri İzolasyonları.....	123
4.3.Çevresel Su Örneklerinin Kültür Bağımlı ve Kültür Bağımsız Prokaryotik Çeşitlilik Analizleri.....	132
4.3.1. İzolatların moleküler identifikasyonu.....	132
4.3.2. Kültürden bağımsız komünite analizleri.....	135
4.3.2.1. Flouresan in situ hibridizasyon.....	136
4.3.2.2. Denatüre edici jel elektroforezi	139
4.3.2.3. Terminal restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi.....	140
4.3.2.4. 16S klonlama	151
4.3.3. AMD örneklerinde kültüre bağımlı ve kültürden bağımsız prokaryotik çeşitliğin karşılaştırılması.....	153
4.4.Biyodesülfürizasyon Deneyleri.....	156
4.4.1. Seçilen izolatın farklı kömür örnekleri kullanılarak biyodesülfürizasyon etkinliğinin belirlenmesi.....	162
4.4.2. Kömürdeki kükürt miktarının biodesülfürizasyona etkisi.....	162
4.4.3. Etkin izolatın metabolik özellikleri ile desülfürizasyon sürecinin ilişkilendirilmesi.....	164
4.4.3.1. Kömürün biyodesülfürizasyon öncesi ve sonrası FTIR spektroskopisi.....	164

İÇİNDEKİLER (Devamı)

	<u>SAYFA</u>
4.4.3.2. Kömürün biyodesülfürizasyon öncesi ve sonrası SEM analizleri.....	168
4.4.3.3. Desülfürizasyonda kullanılan besiyerinin Fe ⁺² /Fe ⁺³ değişimleri.....	170
4.4.3.4. Desülfürizasyon kültüründe dönüşümlü voltametri ölçümleri.....	171
4.4.3.5. TGA/DTA analizleri.....	172
4.4.4. Desülfürizasyon öncesi ve sonrası kömürün kalitesini etkileyecek parametrelerin değerlendirilmesi.....	174
5. TARTIŞMA.....	176
6. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	201
ÖZGEÇMİŞ	228

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Rio Tinto AMD görüntüsü.....	9
2.2. Asidofillerde pH homeostesi ile ilişkili süreçler.....	12
2.3. Demir okside eden asidofillerin çevresel faktörlere göre dağılımı	14
2.4. Minimum ve maksimum pH ve sıcaklık değerleri dikkate alınarak hazırlanmış kükürt okside eden asidofillerin şematik gösterimi.....	16
2.5. Obligat heterotrof asidofillerin şematik gösterimi	21
2.6. Ototrof ve heterotrof asidofilik mikroorganizmalar arasındaki karbon akışı.....	29
2.7. Aşırı asidik çevrelerde demir ve kükürdün biyotransformasyonu.....	30
2.8. Aşırı asidik çevrelerde kükürdün transformasyonları.....	40
2.9. Kükürt için redoks döngüsü.....	45
2.10. Demirin redoks döngüsü	47
2.11. Asidofil <i>At. ferrooxidans</i> ile Fe ⁺² oksidasyonu sırasında elektron akışı.....	48
2.12. <i>At. ferrooxidans</i> 'da sistem biyolojisi yaklaşımlarından türevlenen indirgenmiş kükürt bileşiklerinin oksidasyon modelleri.....	51
2.13. <i>At. caldus</i> 'da sistem biyolojisi yaklaşımlarından türevlenen indirgenmiş kükürt bileşiklerinin oksidasyon modelleri.....	52
2.14. <i>Ac. ambivalens</i> 'te kükürt solunumu ile anaerobik büyüme	53
2.15. Kükürt kemolitotroflarınca indirgenmiş kükürt bileşiklerinin oksidasyonu.....	55
2.16. Sülfat indirgenmesinin biyokimyası.....	56
2.17. rRNA yaklaşımı	68
3.1. Çan AMD'si yerleşiminin uydu görünümü	98
3.2. Balya AMD'sinin haritadaki yerleşimi.....	99
3.3. Çan asidik maden drenajı (2011–Nisan ayı örneklem yeri).....	100
3.4. Balya asidik maden drenajı (2011–Nisan ayı örneklem yeri).....	101
3.5. pGEM–T easy vektör haritası.....	112
3.6. Dönüşümlü voltametri çalışmada kullanılan elektroduna uygulanan gerilim programı.....	119
4.1. Farklı koloni morfoloji görünümlerine sahip izolatlara örnekler.....	124
4.2. Çevresel AMD örneklerinden elde edilen izolatların DNA amplifikasyonları sonucunda elde edilen 16S PCR ürünleri.....	132

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.3. PA–5. izolatın 16S PCR ürününün HaeIII enzimi ile kesilerek elde edilen T–RF elektroferogramı.....	133
4.4. PA–5. izolatın 16S PCR ürününün CfoI enzimi ile kesilerek elde edilen T–RF elektroferogramı.....	133
4.5. PA–5. izolatın 16S PCR ürününün AluI enzimi ile kesilerek elde edilen T–RF elektroferogramı	134
4.6. Toplam DNA ekstraksiyonları sonucu elde edilen DNA’ların agaroz jelde görüntüleri.....	136
4.7. AMD örneklerinin DAPI görüntüleri.....	137
4.8. AMD örneklerine ait FISH görüntüleri	138
4.9. Çevresel DNA’ların DGGE–PCR ürünleri.....	139
4.10. Çan ve Balya çevresel örnekleri ile referans kültürlerin DGGE profilleri	140
4.11. Balya AMD’sinin bakteriyal komünitesinin T–RFLP elektroferogram profili (Hae III ile kesilmiş).....	141
4.12. Balya AMD’sinin bakteriyal komünitesinin T–RFLP analizi (Hae III ile kesilmiş)...	142
4.13. Balya AMD’sinin bakteriyal komünitesinin T–RFLP elektroferogram profili (Cfo I ile kesilmiş).....	142
4.14. Balya AMD’sinin bakteriyal komünitesinin T–RFLP analizi (CfoI ile kesilmiş)....	143
4.15. Balya AMD’sinin bakteriyal komünitesinin T–RFLP elektroferogram profili (Alu I ile kesilmiş).....	143
4.16. Balya AMD’sinin bakteriyal komünitesinin T–RFLP analizi (AluI ile kesilmiş)....	144
4.17. Çan AMD’sinin bakteriyal komünitesinin T–RFLP elektroferogram profili (Hae III ile kesilmiş).....	144
4.18.Çan AMD’sinin bakteriyal komünitesinin T–RFLP analizi (HaeIII ile kesilmiş)....	145
4.19.Çan AMD’sinin bakteriyal komünitesinin T–RFLP elektroferogram profili (CfoI ile kesilmiş).....	145
4.20.Çan AMD’sinin bakteriyal komünitesinin T–RFLP analizi (CfoI ile kesilmiş).....	146
4.21. Çan AMD’sinin bakteriyal komünitesinin T–RFLP elektroferogram profili (AluI ile kesilmiş).....	146

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.22. Çan AMD'sinin bakteriyal komünitesinin T-RFLP analizi (AluI ile kesilmiş).....	147
4.23.Çan AMD'sinin arkeal komünitesinin T-RFLP elektroferogram profili (HaeIII ile kesilmiş).....	147
4.24.Çan AMD'sinin arkeal komünitesinin T-RFLP analizi (HaeIII ile kesilmiş).....	148
4.25. Çan AMD'sinin arkeal komünitesinin T-RFLP elektroferogram profili (CfoI ile kesilmiş).....	148
4.26.Çan AMD'sinin arkeal komünitesinin T-RFLP analizi (CfoI ile kesilmiş).....	149
4.27.Çan AMD'sinin arkeal komünitesinin T-RFLP elektroferogram profili (AluI ile kesilmiş).....	149
4.28. Çan AMD'sinin arkeal komünitesinin T-RFLP analizi (AluI ile kesilmiş).....	150
4.29. Balya ve Çan AMD'lerinin bakteriyel komünitelerinin T-RFLP analizleri açısından karşılaştırılması.....	150
4.30. Çan'daki bakteriyel klonların enzimatik kesim profilleri.....	152
4.31. Balya AMD'sinin kültüre bağımlı ve moleküler yöntemlere göre elde edilen bakteri çeşitliliğinin karşılaştırılması.....	154
4.32. Çan AMD'sinin kültüre bağımlı ve moleküler yöntemlere göre elde edilen bakteri çeşitliliğinin karşılaştırılması.....	154
4.33. Balya ve Çan AMD'lerinin bakteri çeşitliliğinin karşılaştırılması.....	155
4.34. Çan AMD'sinin arkeal çeşitliliğinin karşılaştırılması.....	155
4.35.Optimizasyon deneyinde değerlendirilen parametreler ve ana etki grafikleri.....	154
4.36. İncelenen parametrelerin SN oranları açısından değerlendirilmesi.....	158
4.37. Farklı tipte kömürlerin desülfürizasyon sonrası kültür sıvısı görüntüleri	163
4.38. Biyodesülfürizasyon işlemine tabi tutulmamış kömürün FTIR görüntüsü.....	164
4.39. Mikrobiyal kükürt gideriminin gerçekleştiği kömürün FTIR görüntüsü.....	165
4.40. Desülfürizasyon öncesi pirit kristallerinin farklı büyütme ölçeklerinde SEM görüntüleri...	168

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.41. Desülfürizasyon sonrası pirit kristallerinin farklı büyütmelerde SEM görüntüleri....	169
4.42. Desülfürizasyonda kullanılan besiyerinin ve 1 haftalık kültür sıvısının dönüşümlü voltamogramı (demir için).....	171
4.43. Desülfürizasyonda kullanılan besiyerinin ve 2 haftalık kültür sıvısının dönüşümlü voltamogramı (demir için).....	172
4.44. Biyodesülfürizasyon öncesi kömürün TG/DTA ve DTG profilleri.....	172
4.45. Biyodesülfürizasyon sonrası kömürün TG/DTA ve DTG profilleri.....	173
4.46. Biyodesülfürizasyon öncesi ve sonrası kömürün TG eğrileri açısından karşılaştırılması.....	173

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Çalışma süresince kullanılan cihazlar.....	82
3.2. İzolatların moleküler tanımlama çalışmalarında kullanılan primer ve oligonükleotid problar.....	95
3.3. Toplam serbestlik derecesi.....	114
3.4. Biyodesülfürizasyon optimizasyon çalışmalarında kullanılan deney setleri.....	116
4.1. Çalışılan örneklem yerlerinin bazı özellikleri.....	122
4.2. Çevresel AMD örneklerinin metal analizleri.....	122
4.3. Örneklerdeki canlı bakteri sayısı (cfu/mL).....	124
4.4. Balya AMD'sinden izole edilen izolatların morfolojik görünüşleri.....	125
4.5. Çan AMD'sinden izole edilen izolatların morfolojik görünüşleri.....	130
4.6. Balya ve Çan örneklerinden elde edilen bakteri izolatlarının dizi analiz sonuçları...	134
4.7. Çan AMD'sinin bakteriyel klonlarının benzerlik gösterdiği türler.....	153
4.8. Kontrol ve deney gruplarında inkübasyon sonrası pH'larında gözlenen değişiklikler.	157
4.9. Taguchi dizaynına göre optimizasyon deneylerinde kullanılan parametre, düzey ve %desülfürizasyon ölçüm değerleri.....	160
4.10. Anlamlar için yanıt tablosu.....	161
4.11. Varyans analizi (Genel lineer modele göre).....	161
4.12. Farklı kükürt miktarlarına sahip kömürlerin <i>At. ferrivorans</i> bakterisi ile desülfürizasyona tabi tutulması ile elde edilen %kükürt giderimleri.....	162
4.13. FTIR tekniği ile desülfürizasyon öncesi ve sonrası kömür yapısında gözlenen bant pozisyon değişimleri.....	166
4.14. Total Fe ve Fe ⁺² miktarlarının desülfürizasyon süreci boyunca değişimi.....	171
4.15. İşlem görmemiş ve mikrobiyal işlem görmüş kömürün kalori ve kükürt emisyon değerlerinin karşılaştırılması.....	174
4.16. Mikrobiyal işlem görmemiş ve görmüş olan kömürde kaliteyi etkileyen parametrelerin değişimi.....	175

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope)
°C	Santigrat derece
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektroskopi
ASTM	American Society for Testing and Materials
TGA	Termogravimetrik analiz
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
M.T.A.	Maden Tetkik Arama
ICP–OES	Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy
FISH	Flouresans insitu hibridizasyon
mV	Milivolt
G	Gram
µL	Mikrolitre
µg	Mikrogram
mL	Mililitre
µm	Mikrometre
T–RFLP	Terminal restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi
Nt	nükleotit
UV	Ultraviyole
SDS	Sodyum dodesil sülfat
ATCC	American Type Culture Collection
XRD	X ray diffraction
TGA	Termogravimetrik analiz
DTA	Diferansiyel termal analiz
DTG	İlk türev termogravimetrik eğrisi

BÖLÜM 1

1. GİRİŞ

Mikroorganizmalar, Dünya'daki biyoçeşitliliğin çok büyük bir bölümünü oluştururlar ve jeokimyasal döngülerde önemli görevler üstlenirler. Mikroorganizmalar organik maddelerin ayrıştırılmasında, mineral maddelerin çözündürülmesinde önemli bir yer tutarlar. Bununla birlikte tarım, endüstriyel süreçler, pestisitlerin kullanımı gibi antropojenik aktiviteler de mikrobiyal çeşitliliği etkileyebilir.

Mikrobiyal komünitenin karmaşık çeşitliliğini anlamak zordur. Bu sadece yöntemlere dayalı sınırlamalardan değil aynı zamanda da taksonomik bilginin yetersizliğinden de kaynaklanabilir. Son yıllarda birçok araştırmacı mikrobiyal çeşitlilik ile ilgili "kara kutu"yu anlamak için çalışmalar yapmaktadır. Bu açıdan bakılacak olunursa mikrobiyal çeşitlilik çalışmalarında kullanılan yöntemlerin de büyük öneme sahip olduğunu söylemek yerinde olacaktır.

Günümüzde, ülkelerin yer altı zenginliklerinin belirlenmesi ve kullanıma sunulması kadar, biyolojik zenginliklerin de belirlenerek kayıt altına alınması önemli ve zorunlu bir durum haline gelmiştir. Ülkemizin bilinen bitki ve hayvan çeşitliliğinin yanı sıra mikrobiyal çeşitliliğinin belirlenmesi çalışmalarının da artması bu açıdan önemli bir katkı sağlayacaktır. Mikrobiyal çeşitliliğin araştırılması, gerek ülkemizin mikrobiyal biyoçeşitlilik envanterinin zenginleşmesi ve gerekse elde edilecek mikroorganizmaların sahip oldukları metabolik çeşitlilik nedeni ile birçok alanda kullanım potansiyellerinin olması açısından önemlidir. Özellikle aşırı ortamların mikrobiyal çeşitliliğini belirlemek olası endüstriyel potansiyelleri açısından da avantaj sunacaktır.

Aşırı (aşırı) çevrelerle ve aşırı asidofil olarak bilinen bu çevrelerde yaşayan mikroorganizmalarla çalışmak son yıllarda giderek artan bir ilgiye sahip olmuştur. İlk Dünya'nın aşırı çevrelerden oluştuğu ve ilk yaşam formunun böyle bir çevrede yaşayabileceği düşüncesi bu ilginin sürekliliğini sağlamıştır. Bununla birlikte, uzay

araştırma programlarından elde edilen sonuçlar aşırı çevrelerin Güneş sistemimizdeki diğer gezegen ve uydularda yaygın olduğunu ve eğer buralarda hayat varsa söz konusu yaşam formlarının dünya ekosistemindeki aşırı ortamlarda yaşayabilen canlılar gibi olabileceğini göstermiştir. Aşırı çevrelerdeki biyoçeşitliliği araştırmamızın bir diğer sebebi de endüstriyel kullanım için daha uygun biyomateryallerin ortaya çıkmasına ve uygulamalı biyoteknolojide daha fazla kullanılmasına olanak tanınmasıdır.

Aşırı çevrelerde önemli bir sınıf olan düşük pH'lı ortamlar, asidofiller olarak bilinen bakteri, arke ve ökaryotik organizmaların yaşayabildiği yerlerdir. Aşırı asidofil mikroorganizmaların yaşadığı çevreler (optimum pH 3 ya da daha düşük) Dünya'nın birçok yerinde bulunmaktadır. Söz konusu ortamların bazıları doğal olarak oluşmuşken, bazıları da insan aktivitesinin bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır. Antropojenik etkiler dışında oluşan asidik çevreler, inorganik kükürt bileşiklerinin yüzeye çıktığı ve sülfirik aside okside edildiği volkanik aktivite alanlarıdır. Sülfid içeren mineraller, kömür ve metal maden işletmeciliği sonucunda da açığa çıkabilmektedirler. Madencilik sürecinde sülfid (özellikle pirit [FeS₂]) cevherleri su ve havaya maruz kalır ve çözülebilir demir ve sülfata (H₂SO₄) doğru oksidatif çözülme meydana gelir. Bu nedenle asit maden drenajları metal yüklü ve düşük pH değerli olmaktadır. Bu alanlar dünyanın birçok bölgesinde ciddi bir kirlilik problemi oluşturmaktadır. Bu bölgeler kirlilik tehlikesi oluşturmasının yanı sıra bazı canlılar için de bir yaşam alanıdır. Bu gibi ortamlarda yaşamlarını sürdüren ve maden cevherlerinden metalleri çözebilen bazı asidofillerin yeteneği endüstriyel anlamda oldukça önemlidir. Bu süreç biyomadencilik olarak bilinmektedir. Biyolojik zenginleştirme ve biyodesülfürizasyon uygulamalarını biyomadencilik başlığı altında toplamak mümkündür. Biyolojik yolla kükürt giderimi anlamına gelen biyodesülfürizasyon birincil enerji kaynaklarından olan kömür ve petrolü iyileştirmeye yönelik, kalori değerini düşürmeksizin uygun sıcaklık ve basınç altında sürecin işlediği çevre dostu bir yöntemdir. Bir diğer ifade ile kükürdün sülfat gibi suda kolay çözünen bir bileşiğe oksidasyonudur. Özellikle milli servetimiz olan kömürün yakıt olarak performansını arttırmak için biyolojik süreçlerin gelişimi biyoteknoloji alanında gerçekleştirilebilecek önemli çözümler arasında yer almakta ve geleceğin biyoteknoloji endüstrisinin geliştirilmesi için önemli görülebilmektedir. Çevre kirliliğine neden olması gerekçesi ile kullanılmayan düşük kaliteli kömürlerin

iyileştirilmesi önemli bir enerji girdisi sağlayacaktır. Ülkemizin enerji açısından büyük ölçüde dışa bağımlı olduğu açıktır. Bu bağımlılık, evsel ısınmada doğal gazın zorunlu hale getirilmesi ile giderek artmaktadır. Bu konuda artışa sebep olan diğer bir unsur da yapılan anlaşmalar ile doğal gaza bağlı termik santraller ile elektrik enerjisi teminine ağırlık verilmesidir. Ülkemiz, kömür rezervi açısından zengin bir potansiyele sahiptir. Ancak çevre bilincinin artmasına koştur olarak, yüksek kül yapıcılar ve kükürt içeriği nedeni ile kömür rezervlerimizin kullanılabilmesi kısıtlanmıştır. Isıl değeri düşük, kül, nem ve kükürt değerleri yüksek olan kömürlerimizin iyileştirilmesi, dolayısıyla çevreye daha az zarar vermesinin sağlanması ve ithal kömürlerle rekabet koşullarının oluşturulması amaçlarıyla temiz kömür teknolojilerinin kullanımı yaygınlaştırılmalıdır. Böylelikle kükürt içeriği yüksek olduğu için değerlendirilemeyen kömür rezervlerimizin de işletilmesi mümkün olabilecektir.

Sunulan tez çalışmasının öncelikli hedefi asidik maden drenajı (AMD) gibi asidik sulara yaşayan asidofilik prokaryotların çeşitliliğinin belirlenmesidir. Ülkemizde asidik çevrelerdeki mikrobiyal çeşitlilik hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Sabit pH değerine sahip, Çanakkale Çan'da bulunan kömür AMD'si ile ve Balıkesir Balya'da bulunan metal AMD'sinin mikrobiyal komüniteleri, fluoresan in situ hibridizasyon (FISH), terminal restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi yöntemi ile kültürden bağımsız belirlenmeye çalışılmıştır. Bunun yanı sıra bu iki asidik maden drenajından mikroorganizmaların izolasyonu sağlanmış ve klasik mikrobiyal tekniklerin, kültürden bağımsız yöntemlerle elde edilen veriler kombine edilerek değerlendirilmiştir. Asidofil mikroorganizmalar sahip oldukları metabolik özellikler nedeni ile ortamdaki kükürtlü bileşikleri kullanabilme yeteneğine sahiptirler. Bu tez çalışmasının ikinci hedefi, elde edilecek asidofil mikroorganizma(lar)ın, kükürt içeriğinden dolayı düşük kaliteli olarak isimlendirilen kömürlerin desülfürizasyonunda kullanım potansiyellerinin belirlenmesi olmuştur. Bu doktora tezinden elde edilecek bilgi ile biyolojik süreçlerin katalizlediği düşük maliyetli ve optimize edilmiş bir desülfürizasyon sisteminin geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmüştür.

BÖLÜM 2

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Düşük pH Değerine Sahip Ortamlar

Aşırı asidofil mikroorganizmaların yaşadığı çevreler (optimum pH 3 ya da daha düşük) Dünyanın birçok yerinde bulunmaktadır. Bazıları doğal olarak oluşmuşken bazıları da insan aktivitesinin bir sonucudur.

Kükürtçe zengin bölgeler ise asidik olabilir, bazen pH 3'ün altına inip aşırı asidik olabilmektedir. En yaygın doğal kükürtlü çevreler solfatara olarak adlandırılıp dünyanın kabuğunun ince olduğu aktif volkanik bölgelerde oluşan topraksal jeotermal bölgelerdir. Kükürt, suda çözünebilir formda mağmada bulunur, sülfid mineralleri de volkanik gazlarda bulunur (Metrich ve Mandeville, 2010).

Solfatarik alanlarda su sıcaklığı kaynama noktasına yaklaşıp (~85–100 °C) fakat su jeotermal kaynaktan aktığı için çabuk soğur. Bu nedenle solfataralarda farklı optimum sıcaklıklarda çeşitli asidofil organizmalar kolonize olabilmektedir. Solfataralar; Yellowstone Ulusal Park'ın yanı sıra Whakarewarewa (Yeni Zelanda); Krisuvik (İzlanda); Kamchatka yarımadası (Rusya); Sao Michel (Azur); Volkan, Naples, ve Ischia (İtalya); Djibouti (Afrika); Montserrat ve St. Lucia gibi bazı Karaip Adaları'nda bulunmaktadır. Orta Atlantik, Batı Pasifik yükseltisi, Guaymas Basın, aktif deniz dağları (Tahiti civarında) gibi derin ve abissal deniz altı hidrotermal sistemler de bunlarla ilgilidir. Deniz suyunun pH tamponlama kapasitesinden dolayı aşırı düşük pH bölgeleri deniz altı hidrotermal bacaların çevresinde bulunan sınırlı alanlardır. Ancak hidrotermal bacalarda yaygın bulunan bir ılımlı asidofil (pH 3,3–5,8) aşırı termofil kükürt indirgeyen arke izole edilmiştir (Reysenbach et al., 2006).

Biyojenik sülfirik asitten, aşırı kükürtçe zengin bölgeler sorumludur ve jeotermal aktiviteyle ilişkili değildir. Bazı toprakaltı sistemler sülfidçe zengin zemin suları içerir, bunlar oksijenle temasta bulunduğu Meksika'daki Lechugilla mağarasında olduğu

gibi sülfidin sülfirik asite mikrobiyal oksidasyonu karbonat kayalarının çözülmesine ve mağara sistemlerinin gelişmesine neden olur. Asiditenin, temel minerallerle nötrale edilmediği yerlerde aşırı asidik alanlar oluşabilir. Bu tip alanlarda en çok çalışılan yere örnek İtalya'daki Frasassi mağara oluşumudur. Burada pH 0–1'de su filmi üzerinde viskoz biyofilmler görülmüştür. Bu biyofilmlerin komünite genom analizi ile, mikroorganizmalar açısından sınırlı bir biyoçeşitliliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Vlasceanu et al., 2000; Macalady et al., 2007).

Düşük pH'lı ortamlar biyoçeşitlilik açısından önem arz etmesinin yanı sıra aynı zamanda astrobiyoloji için de önemli bilgiler sunmaktadır. Özellikle Rio Tinto, bu açıdan önemli bir model habitatıdır. Rio Tinto, Güney İspanya'da İber pirit kuşağında bulunan bir nehirdir. Yaklaşık pH 2,3 gibi aşırı asidik bir pH'ya sahip olmasının yanı sıra çok yüksek konsantrasyonda ağır metaller de içerir (Prieto–Ballesteros et al., 2008). Bu pirit birikimleri demir ve kükürdün oksidasyonu ile de kemolitotrof mikroorganizmalara habitat görevi görür (Stoker et al., 2008; Fernández–Remolar et al., 2008). Bu metallerden hematit ve jarosit gibi bazıları son zamanlarda Meridiani Planum gibi Mars'ta da gözlemlenmiştir (Christensen et al., 2004). Rio Tinto'nun asidik şartları Mars'ta gözlenen mineralojiye benzer özelliktedir (Klingelhöfer et al., 2004). Sonuç olarak Rio Tinto'nun yüzey biyosferinin Mars'ın bazı alanlarına potansiyel jeolojik ve biyolojik anoluğu olduğu düşünülmektedir (Amils et al., 2007; Bonaccorsi et al., 2008).

2.1.1. Jeotermal ve volkanik alanlar

Yüksek sıcaklığa sahip ortamlar volkanik bölgelerde ve yer kabuğunun nispeten ince olduğu yerlerde yer almaktadır. Yellowstone Ulusal Parkı, Montserrat (Batı Hindistan), Whakarewarewa (Yeni Zelanda), Krisuvik (İzlanda), Kamchatka yarımadası (Rusya), Sao Michel (Azur adaları), Volcano, Naples ve Ischia (İtalya), Djibouti (Afrika) gibi sığ sucul ya da Orta Atlantik sırtı, Doğu Pasifik kabartısı, Guaymas havzası, aktif deniz dağları (Tahiti civarında) gibi derin ya da çok derin denizaltı hidrotermal

sistemler olabilmektedir. Deniz suyunun etkisinden dolayı denizaltı hidrotermal sistemler genelde pH 5–8 arası olup tuzludur (Johnson et al., 2003).

Jeotermal ve volkanik alanlardaki asidik bölgeler genellikle solfatarik alanlarda lokalize olmuşlardır. Bunlar, asit üretim potansiyelinin ortamda bulunan temel minerallerin tamponlama kapasitesini artırdığı kükürt–ve sülfid açısından zengin bölgelerdir. Elementel kükürt volkanik gazların yoğunlaşmasından oluşabilmektedir (Denklem 1).



Kükürdün biyolojik oksidasyonu solfatarik bölgelerdeki sıcak alanlarda bulunan asidofilik arkelerle veya suyun aktığı nispeten daha serin kenarlarda bulunan bakterilerle gerçekleştirilir (Denklem 2).



Aşırı asidik ve yüksek sıcaklığa sahip koşullar solfataraların civarında minerallerin kısmen ya da tamamen bozunmasına sebep olur, bu durum asidik çamur alanlarının oluşumuna öncülük eder. Oksijen çözünürlüğü sıcaklığın düşmesiyle artar, bu nedenle solfatarik bir bölgede okside olmuş yüzey genellikle daha yüksek pH'ya sahip anaerobik tabakanın üzerini kaplar, bu durum iki tabaka arasında demir ve kükürdün döngüsüne olanak tanır (Rawlings and Johnson, 2002).

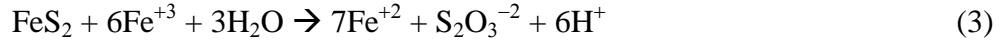
2.1.2. İnsan etkisiyle oluşan asidik bölgeler

İnsan etkisi ile oluşan asidik bölgeler, asidik maden drenajları, atık ve yığınların biyooksidasyon bölgeleri ve biyooksidasyon tankları olabilmektedir.

2.1.2.1. Asidik maden drenajları

Halen çalışan ya da terk edilmiş metalce zengin asidik suların deşarjından kaynaklanan su kirliliği, tüm Dünya'da kömür ve metal madenciliğinin yapıldığı

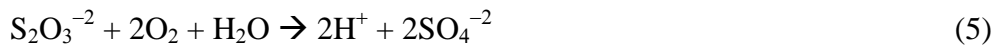
alanlarda karşılaşılan genel bir olgudur. Asidik maden drenajları (AMD) birçok yaşam formuna oldukça toksik etki gösterirken asidofiller bu sularda yaşamlarını rahatça sürdürebilmektedir. Bu türlerin ortamdaki miktarı, ağır metal konsantrasyonu, pH organik bileşik, oksijen varlığı gibi çevresel parametreler tarafından belirlenmektedir. Asit maden drenajları tamamen abiyotik kimyasal reaksiyonların sonucunda üretilebilmektedir. Ancak demir okside eden kemolitotrof bakteri ve arkelerin varlığı AMD oluşumunu önemli ölçüde hızlandırmaktadır. AMD oluşumunun en önemli aşaması, yüksek oranda sülfid içeren kömür veya metal cevherinin ya da mineral yığın ve atıkların fragmentasyonu sonucunda pirit (FeS_2) gibi sülfidik minerallerin suya ve oksijene maruz kalmasıdır. Kömür birikimlerinde kükürt içerikleri farklıdır fakat %10'a kadar FeS_2 içerebilirler, temel ve değerli metaller de sülfidik minerallerle ilgili yapıları içerir. Sülfid mineraline yapılan ilk atak ferrik demir tarafından olmaktadır (Denklem 3).



Bu, oksijenin varlığından bağımsız olan asit üreten abiyotik bir reaksiyondur. Fakat primer oksidant olan ferrik demirin yeniden üretilmesi gerekli olduğundan bu reaksiyon moleküler oksijen gerektirir. Bununla birlikte, $\text{pH} < 4$ asidik çözeltilerde ferro demirin kendiliğinden gerçekleşen kimyasal oksidasyonu çok yavaş ilerlerken biyolojik demir oksidasyonu ile daha hızlı olabilmektedir. Denklem 4'te gösterildiği gibi ferro demir oksidasyonu proton tüketen bir reaksiyondur:



$\text{pH} > 4$ 'ün üstünde moleküler oksijen ferro demirle kendiliğinden reaksiyona girer fakat $\text{pH} < 4$ 'ün altında Fe^{+2} 'nin abiyotik oksidasyon oranı önemsiz denecek kadar azdır ve bu nedenle ferro demir oksidasyonu sadece demir okside eden asidofillerin varlığında gerçekleşir. Çeşitli asidofiller de pirit oksidasyonunun yan ürünü olan tiosülfatı oksidasyona uğratırlar (Denklem 5).



Oksijen tüketiminin sonunda AMD, deşarj noktasında ferrik demirden çok ferro demir içerir, çözülmüş oksijen ya hiç yoktur ya da çok azdır. pH ve diğere metallerin konsantrasyonu bölgenin jeokimyasına önemli ölçüde bağlıdır. Alüminyum ve ağır metaller asidik sularda çok daha fazla çözünür olduğundan AMD'de yüksek konsantrasyonda bulunurlar. Bu nedenle, AMD'nin kimyasal kompozisyonu oldukça değışkendir. AMD'nin mineral asidite içeriğı çok önemlidir. Bu, çözülebilir demir, alüminyum ve manganezin varlığı ile ilgilidir, bunlar hidrolizlendiğinde proton üretirler (Denklem 6).



Dünyanın farklı bölgelerinden AMD'nin etkilediğı çevreler mevcuttur. Bu suların özellikleri kırmızı renkte olması ve koyu sarı sedimentlere sahip olmasıdır. Kırmızı olmasının nedeni çözülebilir ferrik demirin varlığından kaynaklanmaktadır, presipitatlar ise ferrik demirce zengin birikimlerdir. Yüksek enlemde yer alan (kuzey Grönland, orta Norveç) bölgelerde sıcaklık, donma derecesinin biraz üstünde olduğundan biyolojik sülfid mineral oksidasyonu yaz aylarında nispeten kısa sürer. Ancak düşük enlemlerde (Rio Tinto gibi, Şekil 2.1) AMD oluşumu kuraklıktan etkilenmesine rağmen bütün yıl boyunca devam eder. Asit akıntılarının mikrobiyal büyümelerinde görülen en çarpıcı hali genelde yeraltı AMD akıntılarında bulunurken öglenoid büyümeler daha çok yüzey sularında bulunur. Bazı kömür ve mineral atık yığımları kendiliğinden yanar, hatta yıllarca için için yanabilir. Böylece termoasidofilik bakteri ve arkelerin yaşayabilecekleri ortamlar oluşur (Johnson and Hallberg, 2005; Rawlings and Johnson, 2002).



Şekil 2.1. Rio Tinto AMD görüntüsü (Rawlings and Johnson, 2002)

Güney İspanya’da bulunan Rio Tinto, bu nehir dünyanın en eski ve en önemli maden ocağına suyunu boşaltır. Nehrin koyu kırmızı rengi ferrik demirin varlığından kaynaklanmaktadır (genelde 5,7 g/L); asidik nehirde (pH 2,5) yüksek konsantrasyonda bulunan diğer metaller çinko (0,36 g/L) ve bakır (0,22 g/L) (Rawlings and Johnson, 2002).

Kömür maden drenaj gölleri de ciddi çevresel problemlerden birisi olup kömür atıklarının yüzey kalıntıları ile ilişkilidir, pirit oksidasyonu sonucunda asidik bir çevre oluşmaktadır. Piritin oksidasyonu çözülmüş Fe^{+2} , SO^{-2} ve H^+ iyonlarını ortama salarken kimyasal ve/veya biyolojik yollarla Fe^{+2} ’nin Fe^{+3} ’e oksidasyonu FeS_2 ’nin daha fazla oksidasyonuna olanak sağlamaktadır. Kömür maden drenajı; düşük pH değeri ile karakterize edilmektedir. Bunun yanı sıra yüksek konsantrasyonda sülfat, demir, manganez, alüminyum, diğer toksik ve radyoaktif iyonları ayrıca fazla miktarda çözülmüş katı maddeyi bünyesinde barındırmaktadır. Yeraltı ya da açık maden ocaklarından, atık kalıntılarında, tortulardan kaynaklanan kömür maden drenajları özellikle kömür madenlerinin işletildiği bölgelerde ciddi bir endüstriyel problemdir. Zaman zaman sığ yeraltı suları ile toprak–su zonlarının kontaminasyonuna neden olabilmektedir. Yüzey sularına deşarj edildiğinde ferrik demir hidratlanmış demir oksit ve aşırı asidik koşullar üreterek hidroliz olur. Oluşan bu asidite yüzey sularının da pH’sını düşürür, bu da onu korozif yapar bunun yanısıra bir çok sucul yaşam formunun

yaşayamayacağı bir hal alır. Bu durum, sucul habitatı etkilediği gibi tarımsal aktiviteyi, bitki örtüsünü, kullanma ve içme sularının teminini de olumsuz etkiler. Toksikite düzeyleri özellikle deşarj hacmi, pH, toplam asidite, çözünmüş metal konsantrasyonu, alıcı akarsuların tamponlama kapasitesine bağlıdır. Tamponlama kapasitesi bir karbonat ve karbonat iyon konsantrasyonunun bir işlevidir (Komnitsas et al., 2001).

Kömür maden drenajı oksijen, su ve mikroorganizmalarla belli sülfid minerallerinin etkileşiminin bir sonucudur. Pirit (FeS_2), arsenopirit (FeAsS), kalkopirit (CuFeS_2) ve Fe, Cu, As, Sb, Bi, Se veya Mo içeren diğer formları gibi demir sülfid mineralleri oksidasyon sonrası asidik koşullar üretebilmektedir (Komnitsas et al., 2001).

2.1.2.2. Atık ve yığınların biyooksidasyonu

Maden aktiviteleriyle ilgili asidik çevrelerden bir tanesi de metalleri zenginleştirmek için kullanılan özel olarak inşa edilmiş yığınlardır. Çözülemeyen bakır içeren sülfid minerallerinden bakırın zenginleştirilmesi bu duruma örnek olarak verilebilir. Nemli yığılmış maden cevherinin yüzeyi demir ve kükürt okside eden ve bu organizmalarla birlikte yaşayan diğer organizmaların doğal seçimle gelişimini destekler. Bu yığına oksijen penetrasyonunun derinliği; mineralin büyüklüğü, sulamanın miktarına, havalandırmanın pasif ya da aktif olması gibi fiziksel özelliklere bağlıdır. Yığınlar altın içeren pirit ya da arsenopirit cevherlerinin veya da benzer süreçlerde okside olabilen çeşitli tipteki minerallerin biyooksidasyonu için de inşa edilmiştir. Bu yığınlarda bulunan organizma tipleri ıslanan minerale, sıcaklığa, asiditeye, yığının havalandırma oranına bağlıdır (Rawlings and Johnson, 2002).

2.1.2.3. Biyooksidasyon tankları

Madencilik aktivitesi sonucu ortaya çıkan üçüncü aşırı asidik çevre, altın taşıyan arsenopirit taşıyan konsantreler ya da diğer çeşitli minerallerin iyileştirmesinde kullanılan yüksek oranda havalandırılmış biyooksidasyon tanklarıdır. Altın taşıyan arsenopirit konsantrelerinde hacmin %18–20 kadarı olan iyi öğütülmüş mineral toplam

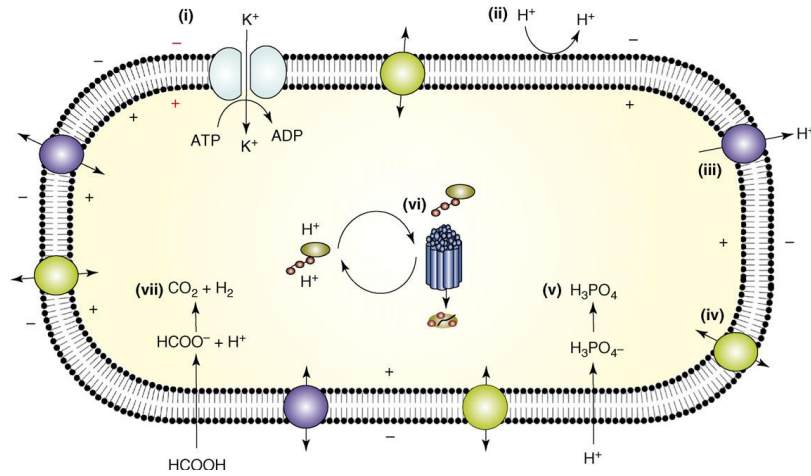
kalış süresi yaklaşık 4 gün olan bir seri karıştırmalı tank aracılığıyla geçer. Mineralleri okside eden mikroorganizmalar ferrik demiri ve sülfatı açığa çıkarır ve çözeltinin pH değeri 1,5–1,6 seviyesinde kalır. Reaksiyon ekzotermiktir, aynı sıcaklıkta tutmak için soğutma sistemi gerekmektedir. Biyooksidasyon tankları ya 40 ya da 50 °C’de çalıştırılabilir ve mevcut mikroorganizma popülasyonu özellikle sıcaklığa bağlı olarak değişebilmektedir. Ilımlı koşullardan 80 °C’nin üzerindeki sıcaklıklarda yaşayan asidofilik demir– ve kükürt okside eden bakteriler Dünya üzerinde çeşitli ekolojik nişlerden izole edilmişlerdir. Bunların birçoğu mineral okside edebilen ticari potansiyele sahiptir (Rawlings and Johnson, 2007).

2.2. Asidik Çevrelere Adaptasyon Mekanizmaları

Nötralofillere benzer şekilde asidofiller de hücre içi pH’sının nötr olmasına ihtiyaç duymaktadır. Fakat asidofiller daha büyük pH gradientlerini tolere edebilmektedir. Asidofillerde proton motif güce katkı sağlaması nedeniyle stoplazmik membran boyunca oluşan pH gradienti hücresel biyoenerjiye bağlıdır. Bununla birlikte, ATP üretimi için F_0F_1 ATPaz ile protonların içeri pompalanması hücresel protonasyonu yoğunlaştırır. Dolayısı ile kontrol edilmez ise hızlıca pH gradienti bozulabilecektir. Hücre içi protonların neden olduğu girişim DNA transkripsiyonu, protein sentezi ve enzim aktivitesi gibi süreçlere zarar verebilir (Madshus, 1988).

Asidofillerdeki pH homeostasi mekanizmaları tam olarak anlaşılmasa da korunmuş membran potansiyeli, geçirimsiz hücre membranı, sitoplazmik tamponlama, proton çıkarma ve organik asit degradasyonu gibi teoriler önerilmiştir. Korunmuş membran potansiyeli ($\Delta\psi$); potasyum iyonlarının iç akışı ile oluşan pozitif iç membran potansiyelidir, bu durum hücreye protonun girmesini engeller, bu pozitif membran potansiyeli pH gradienti ile oluşturulan büyük proton motif gücün etkisini azaltır. Proton pompaları fazla hücre içi protonları yok etmek için gereklidir. Bunlar fazla protonu hücre dışına pompalar. Asidofillerin sahip oldukları enzimler de asit stabil enzimlerdir. Şekil 2.2, asidofillerdeki pH dengesi ile ilişkili süreçleri göstermektedir (Austin ve Dopson, 2007). Bu süreçler şunlardır: (i) Potasyum transport ile korunmuş

membran potansiyeli protonların içe akışını azaltır (ii) Hücre içine protonların iç akışını engelleyen geçirimsiz hücre membranları rol oynayabilir (iii) Transporterlar tarafından dışarıya verilen aktif protonlarla pH gradienti sürdürülür (iv) Birçok asidofil genomu, sekonder transporterların asidofillerde nötralofillerden daha yüksek oranda olduğunu göstermiştir. Genel olarak, onlar hücre içine gerekli besinleri pompalama ile ilişkili enerji taleplerini azaltır (v) Protonları bağlayan ve izole eden demir perçin ile stabilize edilebilen enzimler ve/veya kimyasalların varlığı pH homeostasisinin sürdürülmesine yardım edebilir (vi) Asidofillerde daha fazla DNA ve protein tamir sistemi bulunabilir, bu da düşük pH'da yaşamın gereği ile ilişkilidir. Proteinlerin tekrar katlanmasında rol oynayan şaperonlar çevresel AMD proteinlerinde yüksek oranda ekspre edilmiştir. Asidofiller genellikle küçük genom boyutlarına sahiptir (vii) Asidofillerdeki bazı organik asitler heterotrofik asidofiller tarafından yıkılabilmektedir. Asetik veya laktik asit gibi organik asitler düşük pH'da solunum zincirinde hücre içine protonlanmış formun difüzyonuna neden olarak olumsuz rol oynarlar. Heterotrofik asidofillerde bu organik asitler parçalanmaktadır (Austin ve Dopson, 2007).



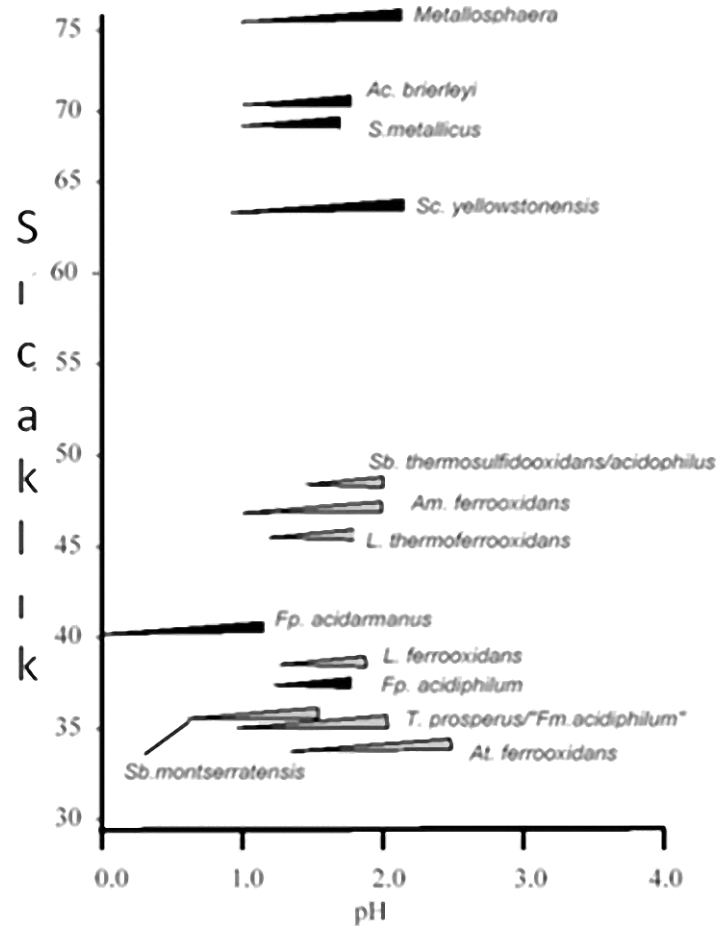
Şekil 2.2. Asidofillerde pH homeostesi ile ilişkili süreçler (Austin and Dopson, 2007).

2.3.Aşırı Asidofilik Bakterilerin Biyoçeşitliliği

Asidofil organizmalar çevresel parametrelere verdikleri cevaplar açısından çeşitlilik gösterirler. Şekil 2.3, 2.4 ve 2.5 demir-, kükürt- okside eden ve obligat heterotrof asidofiller için bu farklılıkları gösterir.

2.3.1. Demir okside eden ototroflar

Düşük pH'lı tipik asidik çevrelerde çoğu (katyonik) metal yüksek oranda çözülebilir. Piritin yaygın oluşumundan dolayı aşırı asidik çevrelerde en çok demir bulunmaktadır. Yüksek oranda çözülebilmemesinin yanısıra ferro demir pH <4'te moleküler oksijenle çok yavaş okside olabilmektedir (Stumm and Morgan, 1981). Demir oksidasyonu ile ilgili serbest enerji çok küçük olmasına rağmen asidik ortamlarda ferro demir önemli bir elektron vericisidir. Ayrıca ferrik demir pH 2,5'un altında yüksek oranda çözülebilir çünkü bu pH'ta Fe^{+2}/Fe^{+3} elektron çifti güçlü bir pozitif redoks potansiyeline ($E_0 = +770$ mV) sahiptir, ferrik demir son elektron alıcısı olarak etkili bir alternatiftir. Demirin yanısıra asidik çevreler genellikle indirgenmiş kükürt formları (elementel kükürt- S^0 , politiyonatlar, hidrojen sülfid- H_2S) açısından zengindir. Kükürdün bu formları aynı zamanda bazı asidofiller için elektron vericisidir, indirgenmiş kükürttten gelen elektronlar genellikle demirinkinden daha yüksek seviyede elektron taşıma sistemine girerler dolayısıyla elektron başına daha fazla enerji elde ederler. Bu nedenle asidik çevreler indirgenmiş kükürttten daha fazla ferro demir içerse de kükürt okside eden asidofiller demir okside edenlerden sayıca fazladır (Hallberg and Johnson, 2007).



Şekil 2.3. Demir okside eden asidofillerin çevresel faktörlere göre dağılımı (arkeler siyah, bakteriler gri boyanmıştır) (Rawlings and Johnson, 2002).

a) *Leptospirillum ferrooxidans*

L. ferrooxidans orijinal olarak 1972’de Ermenistan bakır ocağından izole edilmiştir, yıllardır daha önce izole edilen *At. ferrooxidans*’tan çevresel ve endüstriyel anlamda daha az öneme sahip olduğu düşünülmüştür. Fakat şunda bir çok durumda bilinenin aksine *L. ferrooxidans*, çoğu maden drenajında veya ticari biyolojik zenginleştirme işlemlerinde dominant demir okside eden asidofildir. Bunların dışında düşük sıcaklıklarda yaşayanlar da vardır. *L. ferrooxidans*, Nitrospira şubesinden farklı bir soyhattı oluşturan Gram (-) bir bakteri olup asidofiller içerisinde özgün bir gruptur. *L. ferrooxidans* olarak bilinen bakteriler en azından iki ayrı türden oluşur, 16S rRNA gen dizilimleri ve G+C oranlarındaki (%51–52 ve %55–56) farklılıklar buna kanıt

olarak gösterilebilir. Orijinal izolat kaybolmasına rağmen termotolerant bir *Leptospirillum* (*L. thermoferrooxidans*) tanımlanmıştır. *L. ferrooxidans* hücreleri vibroid ve küçüktür (genelde 1–2 µm uzunluğunda); ayrılmamış hücrelerin zincir görünüşleri spiral benzeri yapılar gösterebilir. Bir çok *Leptospirillum* suşu hücre agregatı oluşturur ve bunlar da sıvı kültürde flok benzeri yapılar oluşturur ve pirit gibi iyi öğütülmüş minerallerin flokülasyonuna neden olur. Bakteriler çözülebilir ferro demir veya pirit gibi ferro demir içeren sülfid mineralleri üzerinde büyür. İkincisinde *L. ferrooxidans* tarafından ferro demir oksidasyonu ya çözeltilinin içinde ya da hücre etrafındaki ekzopolimer tabakanın içinde gerçekleşir. Kimyasal olarak üretilen ferrik demir minerale okside edilir ve sonra ferro demire indirgenir, daha sonra da bakteri tarafından yeniden okside edilir. Piritin oksidatif çözülmesi süresince üretilen indirgenmiş kükürt bileşikler de abiyotik olarak ferrik demirle okside edilebilir ve tekrar ferro demir üretilir. Bu nedenle *L. ferrooxidans*'ın tek elektron vericisi olarak sadece Fe⁺²'yi kullandığı bilinmesine rağmen dolaylı yoldan abiyotik olarak ferrik demiri kullanarak mineral sülfid (sulfan–kükürt, piritte olduğu gibi) ve indirgenmiş kükürt bileşiklerinin oksidasyonundan elde edilen enerjiyi de kullanabilirler. Fakat doğal şartlarda indirgenmiş kükürt bileşiklerinin oksidasyonu *At. caldus* gibi kükürt okside eden asidofillerle sağlanmaktadır (Harrison and Norris, 1985).

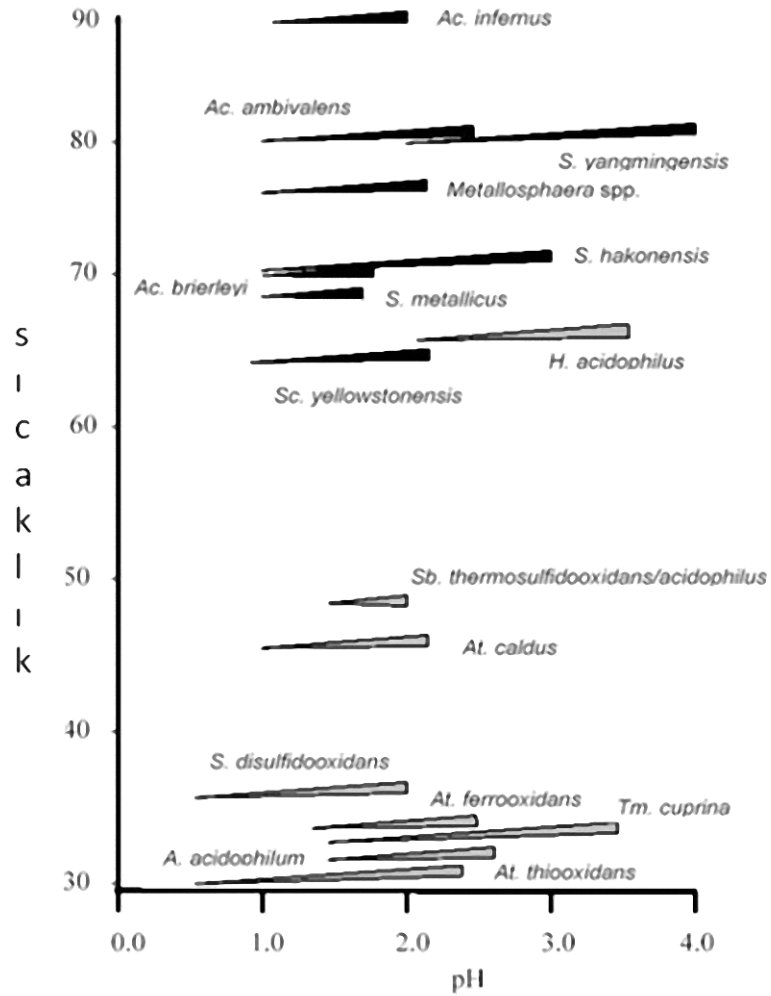
2.3.2. Kükürt okside eden asidofiller

Kükürt okside eden asidofillerin çeşitliliği Şekil 2.4'te verilmiştir.

a) *Acidithiobacillus thiooxidans*

At. thiooxidans optimum olarak pH 3'ün altında izole edilen ve tanımlanan ilk mikroorganizmadır (Waksman and Joffe, 1922). Elementel kükürt ile indirgenmiş kükürt bileşiklerinin sülfata oksidasyonunu gerçekleştirebilen obligat aerobtur. Ferrik demir, *At. thiooxidans* tarafından indirgenebilir fakat bu oksijen yokluğunda büyümesini desteklemez. En çok bilinen asidofil bakterilerden biri olup pH 0.5'e kadar yaşayabilmektedir. *At. thiooxidans* ototroftur, maya özütü gibi organik maddeleri kullanamaz, bu kükürt okside eden bakteri mezofildir, birçok suşu sıcaklığa duyarlıdır, 35 °C'nin üzerinde yaşayamaz. Filogenetik olarak *At. thiooxidans*, diğer

Acidithiobacilli türleri ile Y–proteobakterilerin içerisinde yer alır. *At. thiooxidans* ile hemen hemen aynı fizyolojik özelliklere sahip diğer bir kükürt okside eden asidofil olan *Acidithiobacillus albertensis* adında bir bakteri de tanımlanmıştır (Xia et al., 2007).



Şekil 2.4. Minimum ve maksimum pH ve sıcaklık değerleri dikkate alınarak hazırlanmış kükürt okside eden asidofillerin şematik gösterimi (arkeler siyah; bakteriler gri renklerle sembolize edilmiştir) (Rawlings and Johnson, 2002).

b) *Acidithiobacillus caldus*

At. caldus'un bir çok suşu daha öncelikleri yanlışlıkla *At. thiooxidans* olarak tanımlanmıştır. Bunların en önemli özelliği ototrofik olarak elementel kükürt ve indirgenmiş kükürt bileşikleri üzerinde büyürken ferro demir üzerinde

büyüyememesidir. Filogenetik olarak iki asidofilik bakteri de birbirine yakındır. En önemli farklılık ise *At. caldus*'un ılımlı bir termofil olması, 50 °C'ye kadar büyüebilmesidir. Fakat *At. thiooxidans*'ın yaşayabildiği üst sıcaklık aralığı 30–35 °C civarındır. Bu durum, *At. caldus*'un ticari ölçekte gerçekleştirilen zenginleştirme işlemlerinde niçin bulunduğuunun sebebini açıklamaktadır. *At. caldus*, diğer mezofilik rakiplerinden metabolik açıdan daha değişkendir, miksotrof olarak maya özütü ya da glikoz içeren ortamda büyüebilmektedir (He et al., 2012).

c) *Hydrogenomonas acidophilus*

H. acidophilus hem kükürdü hem de hidrojeni elektron vericisi olarak kullanabilir, buna oksijenin indirgenmesi eşlik etmektedir. *At. caldus* gibi *H. Acidophilus* da termo–asidofildir (maksimum sıcaklık 70 °C, daha az asidofil). Filogenetik olarak diğer tüm asidofillerden oldukça farklıdır, bakteri domaininin çok farklı bir kolunda yer alır, aşırı termo–nötrofil olan *Aquifex pyrophilus*'a yakındır (Rawlings and Johnson, 2002).

2.3.3. Demir ve kükürt okside eden ototroflar

Hem kükürdü hem de demiri oksitleyen ototroflara verilebilecek örnekler şunlardır:

a) *Acidithiobacillus ferrooxidans*

At. ferrooxidans tüm asidofiller içerisinde en çok çalışılmıştır. İlk olarak Pensilvanya'da kömür madenini drene eden demirce zengin asidik bir sudan izole edilmiştir. Filogenetik olarak hem *At.thiooxidans* hem de *At.caldus*'a yakındır, fakat fizyolojik olarak önemli bir noktada onlardan ayrılır. Bu organizma ototrof büyümesini sağlamak için indirgenmiş kükürt bileşiklerinin yanısıra ferro demirin oksidasyonundan elde ettiği enerjiyi kullanır. Diğer *Acidithiobacillus* spp.'nin aksine *At.ferrooxidans* fakültatif bir anaerobtur. Alternatif C1 kaynağı olarak formik asidi kullanma kapasitesine sahip olmasına rağmen obligat ototroftur. *At. ferrooxidans* aerobik şartlarda oksijenin anaerobik şartlarda ferrik demirin indirgenmesine eşlik eden elektron

verici olarak hidrojeni kullanır. Çözülebilir yüksek konsantrasyonlu ağır metali tolere etmesinin yanısıra birçok sülfidik mineralin oksidatif çözülmesinin hızlandırma kapasitesinden dolayı *At. ferrooxidans*'ın metallerin biyomadenciliğinde rol oynayan en önemli mezofil mikroorganizma olduğu düşünülmektedir. Fakat şimdi ise *L. ferrooxidans* gibi daha hızlı kültüre edilebilen asidofiller biyoteknolojide daha önemli rol oynamaktadırlar (Kargı and Weismann, 1985).

b) *Thiobacillus prosperus*

T. prosperus halotolerant bir demir- ve kükürt okside eden asidofildir, *Acidithiobacillus*'un aksine bu organizma %6 NaCl'ye kadar konsantrasyona sahip sıvılarda büyüebilir. Bu asidofil sülfid minerallerinde büyüebilirken bulunduğu yer (sadece tuzlu ve siyahımsı sular) bakımından ticari kullanımının olmadığı, etkili bir biyolojik zenginleştirme bakterisi olamayacağı düşünülmüştür (Nicolle et al., 2009).

c) *Acithiobacillus ferrivorans*

At. ferrivorans, 1,6–2,4 µm uzunluğunda Gram (–) basiller olup hareketli /hücrelere sahiptir. Küçük, kızarmış yumurtaya benzer koloniler oluşturur. Demir/tetrazyonat besiyerinde kolonilerin üstü opak/şeffaf bir tabaka ile kaplanır. Obligat ototrof olup ferro demir, elementel kükürt, sülfid, tetrazyonat, tiyosülfat ve sülfid minerallerini elektron verici olarak kullanabilir. Elektron alıcı olarak ferrik demiri kullanarak anaerobik büyüebilir, disazotofiktir, psikrotoleranttır, büyümesi için optimum sıcaklık 27–32 °C olsa da 4–37 °C arasında da rahatlıkla büyümesini devam ettirebilir. pH 1.9–3.4 arasında büyüse de optimum pH'sı 2.5'tur. Tip suşu NO–37 (=JCM 15606^T=DSM22755^T) olup Norveç'teki bir AMD'den izole edilmiştir. *At. ferrivorans*'ın diğer izolatları başka AMD'lerden de elde edilmiştir (Hallberg et al., 2010).

2.3.4. Demir okside eden miksotrof ve heterotroflar

Minimum ve maksimum pH ve sıcaklık değerleri dikkate alınarak hazırlanmış obligat heterotrof asidofilerin şematik gösterimi Şekil 2.5'te verilmiştir. Demiri okside eden miksotrof ve heterotroflara verilebilecek örnekler şunlardır:

a) *Acidimicrobium ferrooxidans*

Am.ferrooxidans demir okside eden, Gram (+), spor oluşturmeyan ılımlı bir termofilik bakteridir. Meksika'dan izole edilen orijinal suşunun obligat heterotrof olduğu düşünülürken İzlanda'dan elde edilen ikinci suşun CO₂'i fikse ettiği görülmüştür. Çubuk şeklindeki hücreler bazen uzayan zincir ve filamentler oluşturabilir, makroskopik floklar görülebilir (Clark and Norris, 1996).

b) *Ferrimicrobium acidophilum*

Fm. Acidophilum, *Am. Ferrooxidans*'ın aksine mezofildir, ferro demiri okside edip kükürdü edememesine rağmen karbondioksidi fikse edememektedir. Bu asidofil, metale zengin asidik çevrelerde yaygın bulunur, bazı kemoototrofik asidofillerle stabil karışık kültür oluşturur (Hallberg and Johnson, 2001).

c) *Ferrimicrobium acidiphilum*

Fm. Acidiphilium, İngiltere Kuzey Galler bölgesinde Cae Coch maden bölgesinden 2009 yılında izole edilmiştir. Hücreler 1–3 µm boyunda basiller olup jelatinli koloniler oluşturur, ferro demir besiyerinde ferrik demir birikimi oluşturur, mezofildir, obligat heterotroftur, maya özütü ve sınırlı çeşitte organik substratta büyüyebilir. Ferro demiri, piriti okside edip ferrik demiri de organik karbon varlığında indirgeyebilir (Johnson et al., 2009).

d) *Ferrithrix thermotolerans*

Ferrithrix sp., filamentli olarak büyür, ılımlı termofil, obligat heterotroftur. Demirin oksidasyon ve redüksiyonunu gerçekleştirebilir. Maya özütü, gliserol veya etanol üzerinde büyüyebilir. *Actinobacteria*'da *Acidomicrobidae* alt sınıfında yer alır.

Tip türü *Ferrithrix thermotolerans* olup ilk kez 2010 yılında Yellowstone'dan izole edilmiştir (Johnson et al., 2009).

2.3.5. Kükürt okside eden heterotroflar

Kükürdü oksitleyen heterotroflara verilebilecek örnekler şunlardır:

a) *Acidiphilium acidophilum*

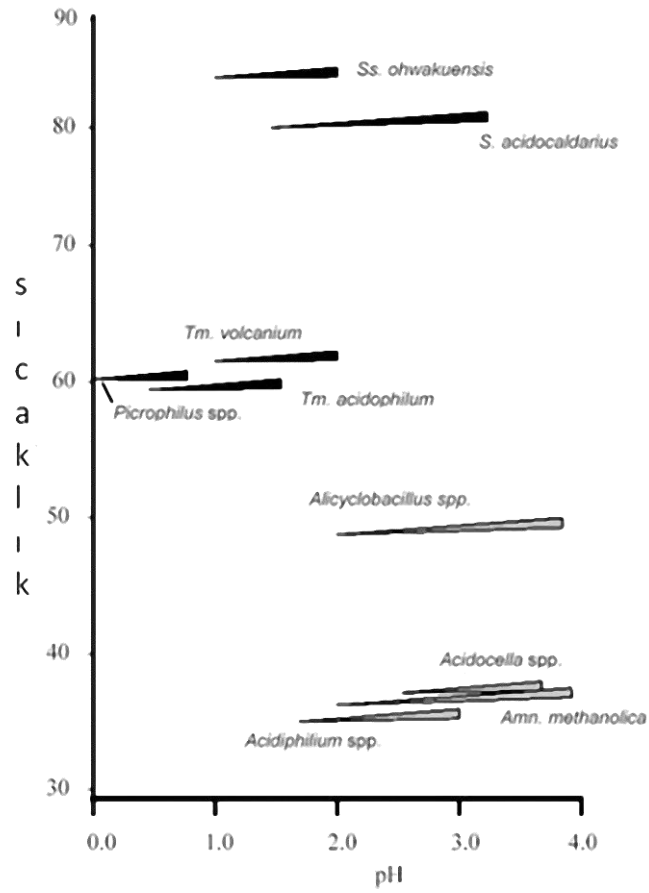
A. acidophilum (önceleri *Thiobacillus acidophilus* olarak biliniyordu) elementel kükürt ve indirgenmiş kükürt bileşikleri üzerinde ototrof olarak ya da çok sayıda organik bileşiğin üzerinde heterotrofik olarak ya da mikсотrof olarak büyümesi açısından *Acidiphilium* cinsinin üyeleri arasında tek organizmadır. Bu asidofil obligat kemolitotroflarla yakın ilişki kurmasına rağmen orijinal izolat (*A. ferrooxidans*'ın demirde büyüyen kültüründe bir kontaminant olarak elde edilmişti) *A. acidiphilium*'un tek temsili suşu olarak kalmıştır (Harrison, 1983).

b) *Thiomonas cuprina*

Thiomonas cuprina (daha önce *Thiobacillus cuprinus* olarak biliniyordu) ototrof, mikсотrof ve heterotrof yaşayabilir. *A. acidiphilium*'da olduğu gibi ferro demiri okside etmez ancak bazı kalkopirit cevherinin oksidatif çözünmesini hızlandırabilir (Huber and Stetter, 1990).

c) *Sulfobacillus disulfidooxidans*

Sb. disulfidooxidans heterotrof, mikсотrof ya da ototrof olarak büyüeyebilen ve diğer *Sulfobacillus* üyeleri gibi spor oluşturan bir Gram (+) mezofildir. Fakat diğer *Sulfobacillus* üyelerinden farkı ferro demiri okside edememesi ve filogenetik olarak *Alicyclobacillus*'a daha yakın olmasıdır, bu durum onun yeniden sınıflandırılmasını gerektirebilir (Dufresne et al., 1996).



Şekil 2.5. Minimum ve maksimum pH ve sıcaklık değerleri dikkate alınarak hazırlanmış obligat heterotrof asidofillerin şematik gösterimi (arkeler siyah; bakteriler gri renkle sembolize edilmiştir) (Rawlings and Johnson, 2002).

2.3.6. Demir ve kükürt okside eden mikсотroflar

Demiri oksitleyen mikсотroflara verilebilecek örnekler şunlardır:

a) *Sulfobacillus* spp.

Şimdiye dek sınıflandırılmış iki *Sulfobacillus* türü de (*Sb. Thermosulfidooxidans* ve *Sb. Acidophilus*) ılımlı termofil, mineral okside eden, spor oluşturan Gram(+) bakteridir. Bunlar önemli metabolik esneklik içeren bazı fizyolojik özellikleri (karbon ve enerji sağlama mekanizmaları açısından) paylaşırlar fakat 16S rRNA dizilimleri ve kromozomal baz içeriği (G+C) birbirinden farklıdır. Son zamanlarda mezofilik *Sulfobacillus* benzeri izolatlar Montserrat'da bulunan volkanik Caribbean adasından

izole edilmiştir. Bu bakterilerin pH 0,7'de bile yaşayabildiği gösterilmiştir. Demir okside eden *Sulfobacillus*'ların hepsi fakültatif anaerobtur, son elektron alıcısı olarak anaerobik solunumla oksijen yokluğunda da büyüeyebilirler (Norris et al., 1996).

2.3.7. Demir–indirgeyen heterotroflar

a) *Acidiphilium* spp.

Acidiphilium spp. en yaygın obligat heterotrof asidofildir. Bu α -proteobakteriler yaşadıkları doğal akuatik çevrelerinin (karbonun tükenmeye başladığı, <5 mg çözülmüş organik karbon/litre) bir yansıması olarak organik maddeleri ayrıştırmada yeteneklidir. 6 ayrı tür olarak sınıflandırılan *Acidiphilium* spp.'nin son yapılan 16S rRNA sekans analizlerine göre bu sınıflandırmanın sağlam temellere dayanmadığı görünmektedir. Filogenetik analiz bu cinsi *A. cryptum* ve *A. acidophilum* şeklinde 2 gruba ayırır. Sınıflandırılan *Acidiphilium* spp. ferrik demirin ferro demire disimilatif indirgenmesini katalizlerken bu daha çok ilk grubu ilgilendirmektedir ancak demir indirgenmesi *A. acidiphilium*'da da indüklenebilir. Bazı *Acidiphilium* türlerinin bakteriyofil–a ürettiği gösterilmesine rağmen onlar fototrof olarak büyüyemezler. Bu özellik en çok *A. rubrum* için geçerlidir, bu mikroorganizma katı ortamda pigmentli pembe–mor koloniler oluşturarak büyür (Akaira et al., 1998).

b) *Alicyclobacillus*–benzeri bakteriler

Bazı ılımlı termofil, obligat heterotrof, spor oluşturan bakteriler 16S rRNA gen dizilimine göre *Alicyclobacillus* cinsine yakındırlar. Fakat *Alicyclobacillus* türlerine göre daha asidofildir. Bu asidofiller anaerobik büyüyemedikleri gibi ferrik demiri ferro demire indirgeyebilmektedir. İzolatlar Yellowstone Ulusal Park'ındaki jeotermal havuzdan elde edilmiştir (Rawlings and Johnson, 2002).

2.3.8. Diğer asidofilik heterotrof bakteriler

Anlatılan grupların içine dahil edilemeyen asidofil bakteriler aşağıda verilmiştir:

a) *Acidocella* spp.

Filogenetik bilgilere dayanarak *Acidophilium* cinsinin yeniden değerlendirilmesi *Acidocella* gibi obligat heterotrof yeni bir asidofil genusun bu soy hattında ayrılmasına imkan tanımıştır. Bu cinsin tür ve suşları aşırı asidik koşullara ve ağır metallere *Acidiphilium*'dan daha az toleranslı olmasına rağmen bazı istisnalar vardır (suş GS19h kadmiyum ve çinkonun varlığında büyüyebilir). Beslenme açısından *Acidocella* spp. karbon asimilasyonu göstermesine rağmen *Ac. aromatica* çeşitli aromatik bileşiklerin katabolize edilmesinde eşsiz bir organizmadır (Rawlings and Johnson, 2002).

b) *Acidobacterium capsulatum*

Büyümesi için düşük bir pH (3) limitine sahip olan *Ab. capsulatum* püsküllü aşırı bir asidofildir. Fakat filogenetik olarak farklı olan bu heterotroflar önemli olduğu düşünülen ve çevresel klonlara göre yaygın bir yayılım gösteren bakterilerden biridir. Bu izolat Japonya'da ve İngiltere'de izole edilmiştir (Kishimoto et al., 1991).

c) *Acidomonas methanolica*

A.methanolica filogenetik olarak farklı metilotrofik asidofildir. Keşfinden beri metilotrofi bazı asidofil türlerde de kanıtlanmasına rağmen *Acidocella* spp.'nın C1 bileşiklerini kullanamadığı görülmüştür (Urakami et al., 1989).

d) *Alicyclobacillus* spp.

Bu cinsin 4 türü de (*Alb. Acidocaldarius*, *Alb. Acidoterrestris*, *Alb. Cycloheptanicus* ve *Alb. Hesperidum*) pH 2 ve üzerinde büyüyen Gram (+) basil, obligat heterotroftur. Bu bakterilerin karakteristik ve diagnostik özelliği hücre membranlarında bulunan w-alisiklik yağ asitlerini içermesidir (Yahya et al., 2008).

2.3.9. Asidofilik arkeler

Asidofilik arkeler, dünyanın ilkin yaşamında asidofilik kemolitotrofinin önemini yansıtmıştır, bazıları kültüre edilebilmiştir.

2.3.9.1. Crenarchaeota

İzole ve karakterize edilen tüm asidofilik *Crenarchaeota* üyeleri termofildir, >60 °C’de büyümektedirler (Rawlings and Johnson, 2002).

a) *Sulfolobus* spp.

Sulfolobus cinsi karakterize edilen ilk asidofil arkedir (*S.acidocaldarius*) ve en fazla sayıda türe sahip olan asidofilik arke cinsi olarak kalmıştır. Bazı *Sulfolobus* spp. (*S. Acidocaldarius* and *S. Solfataricus*) obligat heterotroftken *S. Metallicus* obligat ototroftur, enerjisini ferro demir, elementel kükürt, indirgenmiş kükürt bileşikleri ve sülfid minerallerinden sağlar. İndirgenmiş kükürdü kullanabilen ancak ferro demiri kullanamayan iki fakültatif ototrof *Sulfolobus* türü daha vardır (*S. Hakonensis* ve *S. Yangmingensis*). Tüm *Sulfolobus*’lar obligat aerobtur. Morfolojik olarak *Sulfolobus* (ve diğer asidofilik arkeler) asidofilik bakterilerden çok farklıdır. Genelde düzensiz veya loblu görünebilirken bir çoğu da 1–2 µm çapında uniform kok şeklinde görülebilir (Brock et al., 1972).

b) *Acidianus* spp.

Acidianus ile *Sulfolobus* spp. arasındaki en önemli fark ilkinin fakültatif anaerob olmasıdır, elektron vericisi olarak (aerob metabolizma) ya da elektron alıcısı olarak (anaerobik metabolizmada) kükürdü kullanabilir. *Acidianus*’un şimdiye dek tanımlanan 3 türünden ikisi (*Ac. infernus* ve *Ac. ambivalens*) obligat kemolitotroftken (oksijen yokluğunda kükürt indirgenmesine eşlik etmek suretiyle hidrojeni elektron verici olarak kullanır) *Ac. brierleyi* indirgenmiş kükürdün (veya ferro demirin) üzerinde ototrof, ya da organik maddeler üzerinde heterotrof olarak büyüyebilir (Andreas et al., 1986; Segerer et al., 1986).

c) *Metallosphaera* spp.

Şimdiye dek *Metallosphaera*’ya ait 2 tür keşfedilmiştir: *M. sedula* ve *M. prunae*. Bu arkeler moleküler temelde birbirinden farklıdır ancak fizyolojik açıdan oldukça benzerdir, her ikisi de aerob fakültatif kemolitotroftur. *M. sedula*, şimdiye dek karakterize edilen en termofil mineral okside eden asidofildir (Huber et al., 1989).

d) *Stygiolobus azoricus*

Sg. azoricus, Azur adalarında San Miguel adasından izole edilmiştir ve karakterize edilen ilk obligat anaerob termoasidofilik arkedir. Hidrojen oksidasyonunun yanısıra elementel kükürdün indirgenmesi ve böylelikle formik asit oluşumunu gerçekleştirir (Segeber et al., 1991).

e) Diğer Termo–asidofilik Crenarchaeota

Acidilobus aceticus da obligat anaerobtur ancak organotroftur, nişastayı asetata fermente eder. *Sg. azoricus*'ta olduğu gibi elementel kükürdü bir elektron havuzu gibi kullanır. *Sulfurisphaera ohwakuensis*, *Acidianus* spp.'nin fizyolojik özelliklerine benzer özellikler sergilerken *Sg. azoricus*'a filogenetik olarak yakındır. En önemli termotolerant asidofillerden biri olup 92 °C'ye kadar büyüyebilir. *Sulfurococcus yellowstonensis*, *Sulfolobus* benzeri mineral okside eden bir arke olup ferro demiri, kükürdü ve mineralleri kısmen okside edebilmektedir (Madigan and Martinko, 2005).

2.3.9.2. *Euryarchaeota*

Asidofilik *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota*'dan daha az termofildir, heterotrof ve miksotrof türlerden oluşur.

a) *Thermoplasma* spp.

Her iki *Thermoplasma* türü de (*Tp. Acidophilum* and *Tp. Volcanium*) ılımlı termofil heterotrofik asidofildir, kükürt solunumu ile anaerobik veya aerobik büyüyebilir. *Thermoplasma* spp. hücre duvarından yoksundur, pleomorfiktir, dominant morfoloji kok, disk, tokmak ya da filament şeklindedir (Madigan and Martinko, 2005).

b) *Picrophilus* spp.

P. oshimae and *P. Torridus* obligat heterotrof ve aerobik arkelerdir. Aynı zamanda karakterize edilen yaşam formları arasında en asidofilik olanlarıdır. Minimum pH<0'da optimum olarak pH 0,7'de yaşayabilir. Diğer asidofilik *Euryarchaeota*'nın

aksine *Picrophilus* hücreleri duvar benzeri bir dış yapıya sahiptir (Madigan and Martinko, 2005).

c) *Ferroplasma* spp.

Ferroplasma spp. demir okside eden mezofil veya termotolerant arkelerdir, hücre duvarları yoktur. 2 tür tanımlanmıştır (*Fp. acidophilum* ve *Fp. acidarmanus*), bunların 16S rDNA baz dizilimleri birbirine yakın olmasına rağmen fizyolojik özellikleri birbirinden farklıdır. Her iki tür de büyüme için maya özütüne ihtiyaç duyarken *Fp. acidophilum*'un obligat ototrof olduğu bildirilmiştir. *Fp. acidarmanus*, Kaliforniya'da Iron Mountain'de daha aşırı asidik (pH <1) nişlerde dominant asidofildir (Madigan and Martinko, 2005).

2.3.10. Ökaryotik asidofiller

Asidofilik prokaryotlarda olduğu gibi ökaryotik yaşam formları da pH 3'ün altındaki çevrelerde yaşayabilmektedir. Fakat bunların çoğu asidofilden ziyade asidotoleranttır, nötr pH'ta olduğu kadar iyi hatta daha iyi büyüme gösterirler. Asidofil/asidotolerant ökaryotların çoğunluğunu fungal örnekler oluşturur. *Juncus bulbosus*, *Phragmites australis*, ve bazı *Typha* spp. türleri gibi istisnalar da vardır, bunlar metalce zengin asidik suların çevrelerinde kolonize olmaktadır (Pietsch, 1995; Rawlings and Johnson, 2002).

pH 3–5 arasında olan asidik topraklar ya da turbalıklarda büyüyen bir çok maya ve fungus olmasına rağmen çok azı daha aşırı asidik çevrelerde aktiftir. Asidik maden drenajlarında en çok karşılaşılan mayalar *Rhodotorula*, *Candida*, *Cryptococcus*, ve *Trichosporon* spp. türleridir. pH 3'ün altındaki ortamlarda büyüeyebilen bir grup filamentli fungus da bildirilmiştir. Bunlar *Mucor racemosus* (pH aralığı 2,0–9,2), *Fusarium oxysporum*, *Oidiodendron griseum*, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Sclerotium rolfsii* ve *Trichoderma harziunum*'dur. Diğer önemli asidofilik funguslar (i) *Acontium velatum*, bakır toleransı (160 mmol/L) bir mitosporik fungus olup pH 0.2 ile 0.7 arasında gelişir, (ii) *Scytalidium acidophilum*, bu da 160 mmol/L bakırı tolere edebilir ve pH 0'da büyüeyebilirken pH 7'nin üstünde herhangi bir büyüme gözlenmez,

optimum ürediği pH aralığı 1–2'dir. Bu mitosporik fungus uranyum AMD'sinden izole edilmiştir (Gross and Robbins, 2000).

Laboratuvar şartlarında düşük pH'da protozoaların büyüebildiğine ilişkin az sayıda rapor olmasına rağmen asidik maden drenajlarında protozoalarla sıklıkla karşılaşılmaktadır. Bunlar genelde pH 2–3 aralığında yaşayabilen siliatlardan *Urotricha*, *Vorticella*, ve *Oxytricha* cinsleridir. Çok asidik sulara (pH 1,6–2,0) büyüebildiği gösterilen diğer protozoalar ise *Eutreptia* ve *Bodo* (flagellates), *Vahlkampfia* (amoeba) ve *Cinetochilium* (ciliate)'dur. Asidofilik/asidotolerant protozoalar kemolitotrofik demir, kükürt okside edenler veya heterotrofik bakteriler gibi çeşitli asidofilik bakteriler üzerinde fagotroftir (Rawlings and Johnson, 2002).

Kemolitotrofik prokaryotların yanısıra aşırı asidik sular primer üretici olarak mikroalglerle yayılış gösterirler. Bunlar obligat asidofil (pH 0.05'e kadar olan sulara yaşayabilirler) olduğu gibi asidotolerant olanları da mevcuttur. Temsili örnekleri klorofitler (örneğin *Dunaliella acidophila*, *Chlamydomonas* spp.), rodofitler (örneğin *Cyanidium caldarium*), krisofitler (örneğin *Ochromonas* spp.), dinofitler (örneğin *Gymnodinium* sp.) ve öglenoidler (örneğin *E. mutabilis*) (Olaueson et al., 1989). Diatomlar pH 3.5'un altındaki sulara daha nadir görülürler. *C. caldarium* hem ototrofik hem de heterotrofik büyüeyebilen ılımlı termofilik (optimum sıcaklık 45 °C, optimum pH 1.5) kırmızı bir algdir ve asidik jeotermal havuz ve akıntılardan izole edilebilirler. Benzer çevrelerde yaşayan iki ilgili rodofit olan *Galdieria sulphuraria* ve *Cyanidioschyzan merolae* genelde *C. caldarium* ile karıştırılır. *E. mutabilis*, AMD kirliliğinin indikatör bir türü olarak düşünülmektedir. Bu tür, pH 2 ve üstündeki metalce zengin akıntılarda ikinci bir öglena türü ile (*E. gracilis*) filamentli yeşilimsi kahverengi bir yapı oluşturur. *E. gracilis* küçük konsantrasyonlarda ağır metal içeren sulara daha iyi yaşayabilirken *E. mutabilis*'in ağır metal toleransı daha fazladır (Rooke et al., 2011).

Çok hücreli hayvan yaşam formları aşırı asidik çevrelerde çok nadiren görülür, çoğu da rotifer olarak kayda geçmiştir. Asit tolerant rotiferlerin pH açısından düşük sınırları 2,0–4,0 arasındadır, büyüme için geniş pH aralığına sahiptir. AMD'de sıklıkla

gözlenen türlerse *Cephalodella hoodi*, *Elosa worallii*, *Philodina roseola*'dır (Deneke, 2000).

2.4. Asidofilik Mikroorganizmalar Arasındaki İlişkiler

Asidofiller, aşırı olmayan çevrelerde yaşayan mikroorganizmaların aralarındaki ilişkilere benzer etkileşimlere sahiptir. Fakat aşırı asidik ile daha normal çevreler arasındaki önemli bir husus, primer üretimde önemli bir form olarak kemolitotrofinin yer almasıdır.

2.4.1. Rekabet

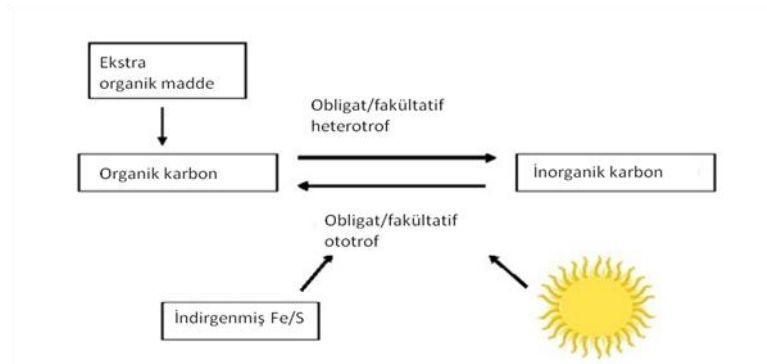
Asidofilik bakteri ve arkeler genel substrat ve enerji kaynakları açısından rekabet ederler. Örneğin *At. thiooxidans*, *At. ferrooxidans*, *At. caldus*, ve *A. acidophilum* kükürt ve indirgenmiş kükürt bileşikleri açısından 25–35 °C'de yarışırken 40–50 °C'de önemli potansiyel kükürt okside edicileri *At. caldus* ve Gram–pozitif *Sulfobacillus* spp.'dir. Benzer şekilde mezofilik sıcaklıklarda demir oksidasyonu *L. ferrooxidans*, *At. ferrooxidans*, *F. Acidophilum*, veya *Ferroplasma* spp ile sağlanır. Bu durumda en başarılı türler çeşitli mikrobiyal fizyolojik özellikler ve pH, ağır metal konsantrasyonu ve toplam çözülmüş katı madde gibi çevresel parametrelerle belirlenir (Schrenk et al., 1998; Johnson, 1991).

2.4.2. Mutualizm

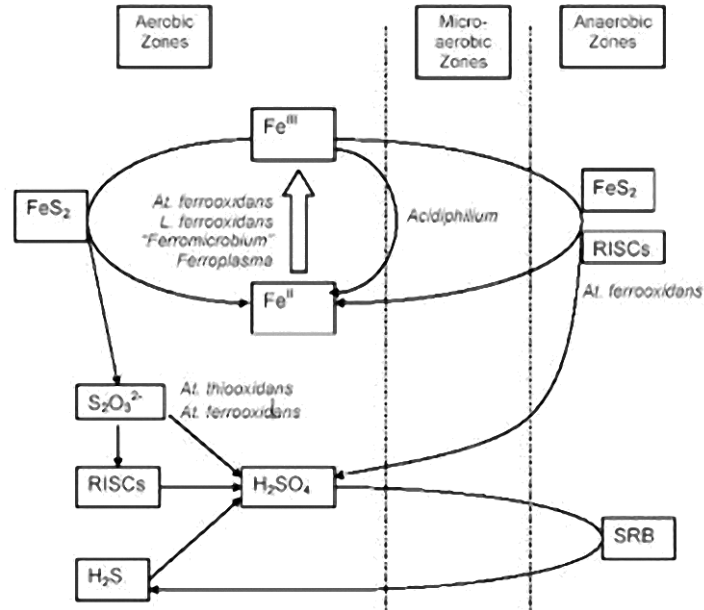
Her iki üyenin de birbirinden fayda sağladığı mutualizm asidofil mikroorganizmalar arasında sık görülür. Demir okside eden *L. ferrooxidans* ve kükürt okside eden *At. caldus*'un karışık kültürleri, pirit okside etmekte *L. ferrooxidans*'ın tek başına yaptığından çok daha etkilidir, ayrıca sülfür okside edenler saf kültürken piriti çözünür hale getiremezler. *L.ferroxidans* tarafından gerçekleştirilen demir oksidasyonu, indirgenmiş kükürt bileşiklerinin üretimini sağlamış olur, bu asidofil üretilen bu ferrik demiri metabolize edemez fakat böylelikle kükürt okside edenler için enerji kaynağı sağlamış olur. Ferro demirin oksidasyonu proton tüketen bir reaksiyondur. Sülfirik aside pirit oksidasyonunun yan ürünleri olarak üretilen indirgenmiş kükürt bileşiklerini

okside ederek kükürt okside edenler daha düşük olan optimum pH'larını sürdürebilirler (Hallman et al., 1992; Johnson et al., 1993).

Karbon akışına dayanan bir diğer mutualistik ilişki de ototrof ile heterotrof asidofiller arasında tanımlanmıştır (Şekil 2.6). Demir ve kükürt okside eden prokaryotlar tarafından fikse edilen karbonun önemli bir oranı (~10–15%) hem canlı hem ölü hücrelerden çevreye salınır. Asidofilik kemolitotroflar değişkendir, fakat bazen tamamen akut, çözülmüş organik karbona (özellikle düşük molekül ağırlıklı organik asitler) duyarlıdır. Bununla birlikte kemolitotrofik metabolizmanın son ürünleri olan ferrik demir ve sülfat akıntı sedimenti, mineral yığnında maden cevherinin iç kısmı gibi oksijenin tükendiği bölgelerde bazı heterotrofik asidofiller ve kükürt metabolize eden *At. ferrooxidans* için alternatif son elektron alıcısı olarak rol oynayabilir. Bunlar sırasıyla kemolitotroflar için potansiyel enerji kaynaklarıdır ve ferro demire ve hidrojen sülfide indirgenir, kemolitotroflar için potansiyel enerji kaynaklarıdır (Şekil 2.7). Aerob ve anaerob çevrelerde demir ve kükürdün indirgenmiş ve okside olmuş formlarının döngüsü aşırı asidik çevrelerin bir özelliğidir (Johnson et al., 1993; Johnson and Roberto, 1997).



Şekil 2.6. Ototrof ve heterotrof asidofilik mikroorganizmalar arasındaki karbon akışı. Asidik çevrelerdeki primer üretim güneş ışığı (fototrofi) ya da kimyasal oksidasyonla (kemotrofi) ile beslenir (Rawlings and Johnson 2002)



Şekil 2.7. Aşırı asidik çevrelerde demir ve kükürdün biyotransformasyonu

Bu bileşiklerin indirgenmiş formları (ferro demir, indirgenmiş kükürt bileşikleri) aerobik şartlarda kemolitotrofik prokaryotlar için elektron vericisi olarak rol oynarken okside formlar (ferrik demir, sülfat) anaerobik ya da mikroaerobik bölgelerde elektron alıcısı olarak kullanılabilir. Elementel kükürt bazı termo-asidofil arkeler tarafından çevresel şartlara bağlı olarak elektron vericisi ya da alıcısı olarak kullanılabilir (Rawlings and Johnson, 2002).

2.4.3. Sinerjizm

Birbirini tamamlayan aktivitelerle sonuçlanan iki veya daha fazla asidofil arasındaki etkileşim mikroorganizmanın tek başına olduğundan daha etkili olabilmektedir. *Fm. Acidophilum* ve *At. thiooxidans*'ın karışık kültürleri ile pirit oksidasyonu buna örnek verilebilir. Ototrofik demir okside edenlerden farklı olarak *Fm. Acidophilum*, *At.thiooxidans*'ın sağlayabileceği organik karbona ihtiyaç duyarken kemolitotrofik kükürt okside edici mikroorganizma sülfid minerali üzerinde ferrik demir atağı tarafından üretilen indirgenmiş kükürt bileşiklerinin devamlılığına bağlıdır. Bu

bakteriler saf kültürde piriti okside edemezken karışık kültürde oldukça etkilidir (Norris, 1990).

2.4.4. Ammensalizm

Ammensalizm, bir türün ürettiği toksinle bir veya daha fazla türün baskılanmasıdır ve bu durum bazı kemolitotrof/heterotrof asidofilik komünitelerde görülebilir. Heterotrofik asidofiller hidrojen iyonu ve ağır metallere duyarlılık açısından değişiklik gösterir. Genel olarak *Acidocella* spp., *Acidiphilium* spp.'den daha duyarlıdır. Bu nedenle asidofilik demir ve kükürt okside edenlerin son metabolik ürünleri daha yavaş üreyen *Acidiphilium* spp.'nin lehine daha hızlı büyüyen *Acidocella* spp.'nin popülasyonunu baskılayabilir (Rawlings and Johnson, 2002).

2.4.5. Predasyon

Asidofilik/asit-tolerant protozoa ve rotiferlerin asidofilik bakterileri avladığı çevresel örneklerde gözlemlenmiştir. Bunun sonucunda bakteri popülasyonunda hareketlilik, filament ve flokların oluşumu, elementel kükürt gibi istenmeyen depo bileşikleri meydana gelebilir (Johnson and Rang, 1993).

2.5. Asidofillerin Kültürasyonu

Asidofiller uygun pH değerlerinde ayarlanmış ve uygun bir şekilde formüle edilmiş kültür ortamları kullanıldığında laboratuvar ortamında hızlı bir şekilde üretilebilirler. Ancak, bu organizmaların besiyerlerini hazırlarken ve formülize ederken nötr pH ortamlarda yaşayan organizmalara uygulanan yöntemler uygulanamamaktadır (Hallberg and Johnson, 2007).

2.5.1. Sıvı besiyeri

Asidofil organizmalar arasında kemolitotrofi daha yaygınken çok sayıda asidofil prokaryot ya heterotroftur ya da mikсотroftur. İn vitro koşullarda bu organizmaları

zenginleştirme ya da kültüre etmek için kullanılan sıvı besiyerlerine ihtiyacı duyulmaktadır. Asidofil besiyerini hazırlamakta kullanılan minimal tuz çözeltisinin geniş kapsamlı makronütrient (azot, fosfor, potasyum, kalsiyum vb.) içermesi önemlidir. Birçok asidofilin sülfat haricindeki anyonlara karşı duyarlı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, besiyerinin asidifikasyonu her zaman diğer mineral veya organik asitlerden ziyade sülfirik asitle sağlanabilmektedir. Ayrıca mümkünse makronütrientlerin sülfat tuzları kullanılmalı, anyonlara olan duyarlılıktan dolayı azot kaynağı, ortama nitrattan ziyade amonyum olarak sağlanmalı, fosfat konsantrasyonu da çok düşük olmalıdır. Özellikle demir ve kükürt okside eden kemolitotrofik asidofilleri kültüre etmekte kullanılan inorganik ortamlarda, sentetik ortamlarda iz elementlerin de bulunması gerekmektedir (Hallberg and Johnson, 2007).

2.5.1.1. Kemolitotrofik asidofillerin kültürasyonu

Aşırı asidik çevrelerde genel olarak inorganik (ve organik) azot fazla bulunmadığından nitrifikasyon nispeten önemsizdir. Aşırı olmayan asidofilik prokaryotlar, kemosentetik metabolizma için ya amonyumu ya da nitriti elektron vericisi olarak kullanabilme yeteneğine sahiptir. Buna karşın ferro demir ve indirgenmiş kükürt formları doğal ve antropojenik asidik çevrelerde yüksek konsantrasyonda bulunur (Hallberg and Johnson, 2007).

Ferro demir, asidik pH'lı sıvılarda nötral pH'ta olduğundan çok daha kararlıdır. Ferro demir içeren ortamın ısı ile sterilizasyonu sürekli olarak kısmi oksidasyona ve sonuçta renk değişikliğine sebep olmaktadır. Besiyerinin hazırlandığı cam malzemede cidarının kirli bir sarı tabakaya bürünmesine ve katı presitata neden olur. Bu nedenle ferro demir çözeltileri konsantre ve asidifiye olarak 0.2 ya da daha az por çapına sahip filtreden geçirilmek suretiyle steril edilmeli, uygun miktarlarda ısı ile steril edilmiş bazal tuz ve/veya eser element çözeltisine eklenmelidir (Hallberg and Johnson, 2007).

Enerjetik anlamda ferro demir zayıf bir elektron vericisidir. Düşük pH'da ferro/ferrik demir çiftinin yüksek redoks potansiyeli, demir okside eden asidofiller için sadece oksijenin elektron alıcısı olarak rol oynayabileceğini göstermektedir. Sonuç olarak sıvı besiyerinde demir okside edenlerin hücre sayısı heterotrofik kültürlerden veya sülfürlü

ortamda büyüyenlerden çok daha düşüktür. Çeşitli inorganik kükürt bileşikleri ve elementel kükürdün oksidasyonundan gelen serbest enerji demir oksidasyonundan çok daha büyüktür (Kelly et al., 1997). Fakat turbiditedeki değişimin doğrudan ölçümü demir okside eden asidofillerin büyümesinin ölçülmesi için uygun değildir. Yeşilden turuncuya olan renk değişikliği oluşan oksidasyonun göstergesi olarak kullanılabilir. Çoğu zaman ferro demirin oksidasyonu demir okside eden asidofillerin büyümesine eşlik etmektedir. Ferro demirin konsantrasyonunda meydana gelen değişimler asidofillerin büyüme hızlarını belirlemede kullanılabilir (Hallberg and Johnson, 2007).

Ferrik demir, çok asidik sıvılarda çözülebilir fakat $\text{pH} \geq 2.5$ 'ta hidroliz olur, schwertmannite $[\text{Fe}^{+3}_{16}\text{O}_{16}(\text{OH})_{12}(\text{SO}_4)_2]$ gibi katı fazda ürünler oluşur. Birçok durumda demir presipitatların oluşumu ciddi bir dezavantajdır, bakteriyel hücrelerin büyütülmesini ve saflaştırılmasına engel teşkil eder. Kesikli kültürlerde pH kontrolünün sağlandığı fermentörlerin aksine, ferrik presipitatların oluşumunu engellemekten kaçınmak kolay değildir. Denklem 4'te de görüldüğü gibi ferro demir oksidasyonu proton tüketen bir reaksiyondur ve oksidasyon ilerledikçe pH artma eğilimindedir. Asidofiller için toksik olmayan uygun tampon çözeltilerin yokluğundan dolayı asidofilleri büyütmede kullanılan besiyerleri çok zayıf bir şekilde tamponlanmaktadır. Sülfirik asit kendisi bir derece pH stabilitesini sağlayabilir fakat bunu çok düşük pH'larda yapabilir ($\text{HSO}_4^- \leftrightarrow \text{SO}_4^{-2}$ 'nine pK_a 'sı 1,92'dir). Buna karşın mikrobiyolojik olarak katalizlenmiş demir oksidasyonundan daha yavaş oluşan ferrik demir hidrolizi proton üreten bir reaksiyondur (Denklem 7).



Demir okside eden prokaryotların sıvı kültürlerinin pH'ları (kültürün ilk pH'sı ve ferro demir konsantrasyonuna bağlı olarak) pH azalmasına neden olan ferrik demir hidrolizi faaliyete geçtiği noktaya kadar artma eğilimindedir. Bu durum meydana geldiğinde kültürün ilk pH'sının daha yüksek ya da daha düşük olduğuna bakmaksızın tam olarak okside olmuş ortamın son pH'sı yaklaşık olarak 2.2'de stabilize olur. Yüksek hücre konsantrasyonuna sahip demir ortamında büyüyen asidofilleri izole etmede yaşanan sıkıntılarla ilgili olarak ferrik demir presipitasyon problemine yenilikçi bir çözüm de Blake ve arkadaşları tarafından önerilmiştir. Onlar, demir okside eden

asidofillerin ürettiği ferrik demirle ve diğer ürünlerin elektrokimyasal olarak indirgendiğini böylece sürekli ferro demir üretildiğini bulmuşlardır. pH 1.6'da hücre sayısı $\sim 10^{10}$ bakteri/mL elde edilmiş ve ferrik minerallerin oluşumundan sakınılmıştır (Blake et al., 1994).

Kükürt okside eden asidofiller sülfat anyonunda kükürdün oksidasyon derecesi olan +6'dan daha indirgenmiş olan çeşitli inorganik kükürt formları içeren sıvı ortamlarda büyütülebilir. Kükürt okside eden asidofiller ya obligat ya da fakültatif ototrof oldukları için organik bileşiklere ihtiyaç duymazlar, makro- ve mikronütrient gereksinimleri demir okside edenlerinkine benzerdir. Politiyonat tuzları suda çözülebildiklerinden uygun substratlardır. Ancak tiyosülfat ($S_2O_3^{-2}$) özellikle ferrik demir varsa asidik sıvılarda stabil değildir ve tetratiyonat, pentatiyonat ve sülfat oluşturmak üzere okside olur (Schippers et al., 1996). Tritiyonat ($S_3O_6^{-2}$) asidik sıvılarda stabildir fakat ticari bir ürün değildir. Oysa ki, tetratiyonat hem asidik koşullarda stabildir hem de ticari olarak rahatlıkla temin edilebilir. Kolloidal hidrofilik kükürt bazı firmalar tarafından üretilmesine rağmen elementel kükürt hidrofobiktir ve kükürt okside eden asidofiller tarafından çok çabuk oksidasyona uğratılabilir. 120 °C'de eriyip plastik kükürt oluşumuna neden olmasına rağmen iyi taneli kükürt ısı ile steril edilebilir, bu formu mikrobiyal oksidasyona biraz daha dirençlidir. Yaklaşık 1 saat 110 °C'de ısıtmakla gerçekleştirilen tindalizasyon, plastik kükürt oluşumuna izin vermeyen iyi bir alternatiftir (Germida, 1985).

Kükürt ve politiyonatın oksidasyonu süresince sülfirik asit üretildiğinden ve daha önce de bahsedildiği gibi asidofilik ortamların zayıf tamponlama özelliğinden dolayı kültür ortamının pH'sı düşer. Mikrobiyal aktiviteyi göstermede basit bir yöntem olarak pH kullanılabilir, substrat konsantrasyonundaki ya da biyokütle ölçümündeki değişim kükürt okside eden asidofillerin büyüme hızlarını tahmin etmede daha doğru bir yaklaşımdır (Hallberg and Johnson, 2007).

2.5.1.2. Heterotrofik ve miksotrofik asidofiller

Heterotrofik asidofiller tek ya da kompleks karbon kaynağı içeren sıvı ortamlarda zenginleştirilebilir ve kültüre edilebilir. Birçok asidik çevre oligotrof olduğu

için daha önce izole edilmiş birçok heterotrofik asidofil daha zengin ortamlarda yüksek hücre yoğunluğuna ulaşabilse de zenginleştirme ortamlarında küçük konsantrasyonda organik substratların kullanılması önerilmektedir. Düşük molekül ağırlıklı alkoller (etanol gibi) ve monomerik şekerler (fruktoz gibi) çoğu bilinen heterotrofik asidofiller tarafından karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Glikoz ve gliserol de olası karbon kaynakları olmasına rağmen bazı asidofil heterotrofların (*Ac. aromatica*) ya bu bileşikleri ya da maya özütünü kullanamamaktadır (Hallberg et al., 1999). Birçok durumda düşük molekül ağırlıklı alifatik asitler (250 μ M– 1 mM konsantrasyonlarda) çoğu asidofilik mikroorganizmalar için toksiktir. Fakat *Ac. aromatica* çeşitli organik asitlerin varlığında büyüyebilir ve bunlarla zenginleştirilebilir örneğin pH ~3 ortamında 1–2 mM asetik asit varlığında rahatça yaşayabilir (Gemmel and Knowles, 2000).

2.5.2. Katı ortam

Araştırmacılar yıllardır sıvı ortamlarda kolayca üreyen asidofilik mikroorganizmaları katı ortam üzerinde büyütebilme ve tekrardan üretebilme ile ilgili olarak önemli sorunlarla mücadele etmek zorunda kalmıştır. *Leptospirillum ferrooxidans* gibi demir okside eden asidofillerin kültürasyonu daha zordur ve katı ortam üzerinde üretilmemektedir. Bu alandaki son gelişmeler asidofilik prokaryotların katı ortam üzerinde büyütülebilmelerine olanak tanımıştır. Ancak asidofiller için katı ortam hazırlarken dikkat edilmesi gereken bazı önemli noktalar mevcuttur. Örneğin agar gibi katılaştırıcı ajanlar polisakkarit yapıda olduklarından sıcak ve asidik ortamda hızla hidroliz olurlar bu nedenle katılaştırıcı ajanlar ayrı bir şekilde steril edilmeli ve soğuduktan sonra petrilere dökmeden hemen önce bazal tuz çözeltisi ile birleştirilmelidir. Böyle olsa bile inoküle edilen petrilerin inkübe edildiğinde katılaştırıcı ajanların hidrolizi yavaş bir şekilde devam etmektedir. Agar (ve agaroz) galaktoz rezidülerinden yapılmış bazı iskelet yapılarına sahip kompleks polisakkarit karışımlarıdır fakat bazı yüklü gruplarla (çoğu zaman pirüvik asit ve bazen de glukuronik asit) yer değiştirme dereceleri değişkendir. Asidofilik prokaryotlar özellikle kemolitotroflar katılaştırıcı ajanlarda bulunabilen çözülebilir organik maddelere ve özellikle organik asitlere karşı oldukça hassastır. Bu maddelerin toksisitesi, asidofilik büyüme ortamlarının pH'sının onların pKa değerlerinin altında olmasından dolayıdır.

Bu nedenle organik asitler ayrıştırılamaz. Dolayısı ile, mikrobiyal membranlara hızlıca çapraz geçiş yaparlar ve asidofilik hücre içlerinin daha nötral (pH 6.5) olduğunda bozulur ve hücre sitoplazmasını asidifiye ederler ve membran potansiyelini etkisiz bırakır. Bu nedenle agarla katılaştırılmış katı ortamlarda asidofillerin zayıf büyümesi ya da hiç büyümemesi daha çok galaktozdan ziyade pürivik asidin oluşturduğu toksisiteden kaynaklanır (Hallberg and Johnson, 2007).

Bu problem otoklavlanmanın öncesinde katılaştırıcı ajanı ılık ve yumuşak asitte ön yıkamaya tabi tutmakla aşılabilir. Bu, hidroliz olacak polimerlerde daha kararsız ve değişken bağların oluşmasına neden olacaktır ve çözülebilir ürünler (ayrıca fazla asit) ısı sterilizasyonundan önce uzaklaştırılabilir. Buna rağmen bu yöntem zaman alıcıdır ve uzun süren petri inkübasyonları süresince oluşan hidroliz problemini tam anlamıyla çözdüğü söylenemez. Bununla birlikte overlay tekniği bu problemi çözmeye çok daha iyi bir yaklaşımdır. Bu yaklaşım, inokulumda heterotrofik asidofil (*Acidiphilium* spp.) bulunduğu demir okside eden *At. ferrooxidans* kolonilerinin çok daha büyüdüğü gözleminden türetilen olarak oluşturulmuştur. İkinci bakteri kemolitotroflara toksik olan maddeleri uzaklaştırabilmektedir. Overlay tekniğinde iki tabakalı katı ortam hazırlanır, alt tabaka herhangi bir asidofilik heterotrofun aktif bir popülasyonunu içerirken üst tabaka sterildir. Orijinal overlay ortam olan Fe₀ hem ferro demir hem de tripton soya brot içerir ve pH ~ 2.6'ya sahiptir, kemolitotrofik demir okside eden asidofillerin büyümesini teşvik etmek üzere tasarlanmıştır, alt tabakada kullanılan heterotrof bakteri, *A. cryptum*'a yakın olan *Acidiphilium* sp (suş SJH)'dır. *At. ferrooxidans* ve *Leptospirillum* spp. gibi demir okside edenler, koloni morfolojisi ve büyüklüğü açısından farklılık gösterebilen ferrik demirle kaplanmış koloniler olarak görülür. Aynı şekilde demir okside etmeyen heterotrofların büyüebildiği bu besiyerinde “*Fr. Acidiphilium*” gibi demir okside eden heterotroflar da büyüebilirler ve kemolitotrof türlerde olmayan demirle kaplanmış kolonilerinin jelatin bir kenara sahip olduğu farkedilmektedir. Ferrik demirin birikimi, asidofilik demir okside eden mikroorganizma tanımlanmasına olanak tanır. Ancak ferrik demir birikimi önleniyorsa besiyerinin pH'sı 2'nin altına düşebilmektedir (*Acidiphilium* SJH suşu pH 1.8'te büyüebilmektedir) (Hallberg and Johnson, 2007).

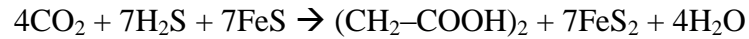
Hem demir hem de kükürt okside eden türleri izole edebilmek için diğer overlay besiyeri formülasyonları tetratiyonat ekleyerek ya da pH 3.5'in üstünde tiyosülfat ekleyerek elde edilebilmektedir, bazı *Leptospirillum* suşları bu ortam üzerinde sporadik büyüme göstermektedir. Ferro demir/tiyosülfat/tripton soya sıvı besiyeri çevresel örneklerden yeni tür olarak ılımlı asidofilleri (*Thiomonas* spp.) izole etmekte başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Hallberg and Johnson, 2003).

Yukarda bahsedildiği gibi çevresel örneklerden inoküle edilen petrilere heterotrofik asidofillerin kolonileri sıklıkla Feo besiyerinde de gözlenmektedir. Bakteriler, alt tabaka jelinde bulunan *Acidiphilium* SJH suşu ile yarışmak zorundadır. İlginç olan şudur ki; overlaid olmayan ortama göre, overlaid besiyeri üzerinde büyüyen heterotrofların petride üremiş koloni sayımları daha fazladır, bu muhtemelen organik asit toksitesi ile ilişkilidir. Overlay katı besiyerinin modifiye edilmiş şekilleri tasarlanmıştır, bu bağlamda alt tabakada *Acidiphilium* SJH'den ziyade *Ac. aromatica* kullanılmıştır. Bu asidofilik heterotrof alternatif, organik asitleri katabolize etmede yetenekli olmasına rağmen glikoz, gliserol ve maya özütü gibi genel olarak kullanılan mikrobiyal substratlardan yararlanamamaktadır. Bu nedenle eklenen organik substratlar ortamda mevcuttur aynı zamanda da toksite tehlikesinden de korunmuş olunur. Bu modifiye edilmiş yaklaşım, birçok aşırı ve ılımlı heterotroflardan aerobik asidofilleri (*Acidobacterium* ve *Acidisphaera* spp. vb.) ve anaerobik asidofilleri (yeni *Desulfosporosinus* vb.) izole ve kültüre edilmesinde başarılı bir şekilde kullanılabilir (Hallberg and Johnson, 2003; Hallberg and Johnson, 2005).

Katılaştırıcı ajan toksitesi üstesinden gelmek için önerilen bir diğer yaklaşım da asidofilleri membran filtre üzerinde büyütmektir. Daha önce yapılan bir çalışma, bakterilerin 0.2 µm por çapına sahip membran filtre üzerinde filtrelendiğinde *At. ferrooxidans* kolonilerinin tekrardan üretilebilir formlarını elde etmişlerdir (de Bruyn et al., 1990).

2.6. Aşırı Asidofillerin Karbon ve Enerji Kaynakları

Yüksek sıcaklığa sahip, anaerobik, asidik çevrelerin Dünya'nın ilkin yaşamı boyunca geniş alanlara yayıldığı düşüncesi ile, asidofillerin enerji kaynaklarına olan ilgi, daha da artmıştır. Günther Wächtershäuser ferro sülfid (FeS) ve hidrojen sülfitten (H₂S veya HS⁻) piritin oksidatif oluşumunun karbondioksit fiksasyonu için enerjinin ilk kaynağı olduğunu ortaya atmıştır. Bu reaksiyon ekzergoniktir (FeS + H₂S → FeS₂ + H₂, ΔG⁰ = -38,4 kJ mol⁻¹, pH 0 ve 25 °C) ve asidik pH aralığında sıcaklık 125 °C'ye çıkarsa reaksiyon daha ekzergonik bir hal alır. Bu, pirit oluşumu ile sağlanan enerji kaynağının Carl Woese tarafından önerilen yaşamın termofilik evrensel ataları için uygun olduğu anlamına gelir. Karbon dioksit fiksasyonu için piritin ilerlettiği reaksiyonlar düşük konsantrasyonlu CO₂ (5,7 mmol/L) ve H₂S (7.5 mmol/L)'de bile (günümüzün hidrotermal baca sularına benzeyen) oldukça ekzergoniktir (Rawlings and Johnson, 2002) (Denklem 8).



$$[\Delta G^{0'} = -284 \text{ kJ mol}^{-1}, \text{ pH } 0 \text{ ve } 25 \text{ }^\circ\text{C}'\text{de}] \quad (8)$$

Hidrojen sülfid, ferro demirin asidik, anaerobik sulu çözeltileri çözülürken pirit presipite olur, böylece reaksiyonun ilerlemesine yardımcı olur. İlk organizmalar bu çevrede yerleşmiş, enerjilerini sürekli olarak piriti oluşturup kullanarak elde etmişlerdir. Asıl enerji kaynağı olarak hizmet eden pirit oluşumunun avantajı, bakteriyoklorofil ve enerji çiftleri gibi kompleks moleküllere gerekli kalınmamasıdır. Wächtershäuser bu hipotezin Dünya'daki ilkin yaşamla ilişkili olduğuna inanılan ve günümüze kadar gelmiş olan birçok arkeyle ilgili fenomenleri açıkladığına inanır. Bir çok arkenin hidrojen sülfide bağlı olması, daha sonra evrimleşen öbakteriyel fotosentezin hidrojen sülfide bağlı olması, üç biyolojik domainin de günümüze kadar gelen organizmalarının elektron taşıma zincirlerinde demir-kükürt reaksiyon merkezlerinin olması, bu demir – kükürt reaksiyon merkezlerinin fotosistem 1'de varken daha sonra evrimleşen fotosistem 2'de de olmaması, birçok demir ve kükürt metabolize eden ototrofun optimum pH aralığının asidik olması bunlara örnek verilebilir. Bununla birlikte, demir veya kükürt metabolize eden birçok arke yüksek sıcaklıkta büyüebilme yeteneğine sahiptir (Rawlings and Johnson, 2002).

Aşırı asidofiller çeşitli beslenme tiplerine göre alt bölümlere ayrılmaktadırlar. Bazıları obligat ototrof, bazıları tamamen heterotrofikken bir kısmı da arada kalıp miksotrof özelliğe sahiptir. Bazı ototrof olarak gelişen asidofillerin büyümeleri az miktarda maya özütü ile arttırılabilir, diğerleri ise miksotroftur (Rawlings and Johnson, 2002).

2.6.1. Asidofilik ototrofların CO₂ fiksasyonu

Acidithiobacilli gibi birçok ototrof asidofil, 1,5-bifosfat karboksilaz (RuBPCaz veya Rubisco) Calvin pentoz fosfat döngüsü ile CO₂'i fikse etmektedir. *At. ferrooxidans* gibi bakteriler ferro demir ortamında büyüdüğünde karbon sınırlamasından sakınmak için havadaki CO₂ konsantrasyonu genelde yeterli olur. Bu bakteri, Rubisco'nun hüresel konsantrasyonunu arttırarak CO₂ sınırlamasına yanıt verir. Ilımlı termofil *Sb. Thermosulfidooxidans* gibi diğer aşırı asidofillerde hızlı ototrofik büyüme için %1 CO₂ ile zenginleştirilmiş havaya ihtiyaç duyulur. Bu, 50 °C'de CO₂'nin çözünürlüğünün azalmasından ve kısmen bu bakterilerin CO₂ alınımında etkisiz olduğu bilindiğinden dolayıdır (Rawlings and Johnson, 2002).

At. ferrooxidans'ın obligat ototrof olduğu düşünülmektedir fakat sürekli kültürde büyütüldüğünde sağlanan formik asidi karbon kaynağı olarak kullandığı gösterilmiştir. Fakat formik asit, tek karbon bileşiğidir ve muhtemelen hücre içinde Calvin döngüsüyle assimile edilmektedir (Rawlings and Johnson, 2002).

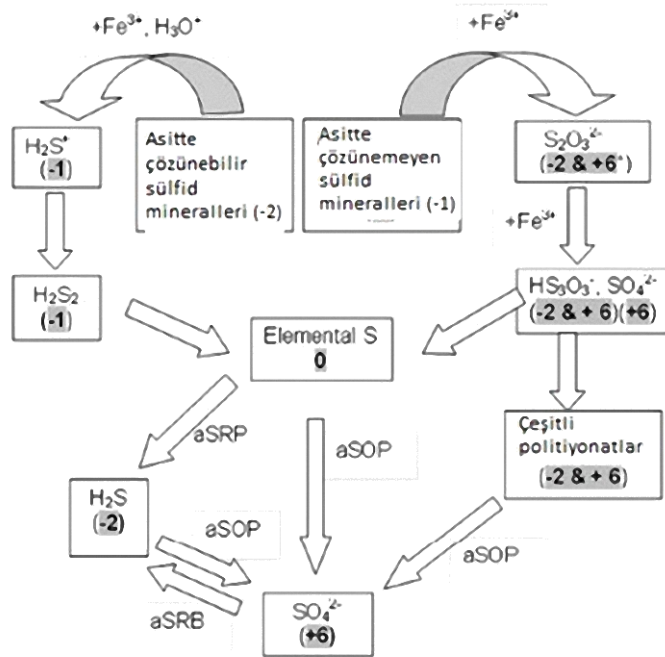
Sulfolobus gibi arkelerin de ototrofik büyüdüğü bildirilmiştir fakat yol izinin detayları bilinmemektedir. Bir çalışmada asetil-Co-A karboksilasyonunun kilit basamak olabileceği ve biotin karboksilaz ile biotin-karboksil-taşıyıcı proteinin sentezinin, CO₂'nin sınırlandırıldığı şartlarda arttırıldığı önerilmiştir. Bu kompleks, kabul edilen propionil-CoA karboksil transferaz genine komşudur (Rawlings and Johnson, 2002).

2.6.2. Ototrofik asidofiller için elektron vericileri

2.6.2.1. İndirgenmiş inorganik kükürt bileşikleri (İİKB)

Birçok asidofil bakteri ve arke türü 1–8 elektron içeren redoks transformasyonlarını katalizleyen disimilatif metabolik süreçlerde bir elektron kaynağı ya da havuzu olarak bu Grup 6 elementini kullanabilmektedir. Şekil 2.8, aşırı asidik çevrelerde oluşan kükürdün çeşitli transformasyonlarını göstermektedir. Burada gösterilen redoks reaksiyonları mikroorganizmalar tarafından katalizlenebilir ya da abiyotik olarak gerçekleşebilmektedir.

Şekil 2.8’de bileşik ve minerallerdeki kükürdün çeşitli oksidasyon dereceleri kalın yazılmış ve griyle boyanmıştır (politiyonattaki kükürt atomları farklı oksidasyon derecelerine sahip olabilir). Asidofilik prokaryotlar tarafından katalizlenen reaksiyonlar gösterilmiştir. Tiyosülfattaki kükürt atomlarının oksidasyon dereceleri -2 ve $+6$ arasında değişmesine rağmen XANES spektroskopik analizler iki atomun -1 ve $+5$ oksidasyon derecesi ile ilgili yük yoğunluğuna sahip olduğunu göstermiştir (Vairavamurthy et al., 1993).



Şekil 2.8. Aşırı asidik çevrelerde kükürdün transformasyonları.

Aşırı asidofillerin bulunduğu çok düşük pH ortamından sorumlu asit genellikle sülfirik asittir. Sülfirik asit indirgenmiş kükürt bileşiklerinin oksidasyonu ile üretilir. Biyolojik oksidasyonda, indirgenmiş kükürt bileşikleri, enerjetik olarak en iyi elektron alıcısı olan oksijenle birlikte elektron vericisi olarak iş görür. Bir sülfidden bir kükürt atomu sülfata okside edildiğinde 7 elektrona kadar açığa çıkabilir. Sülfid içeren minerallerin yüzeye maruz kaldığı yerlerde doğal olarak oluşan indirgenmiş kükürt bileşikleri mevcuttur. Sülfid minerallerinin su, oksijen ve ferrik demirle kimyasal reaksiyonunun bir sonucu olarak çeşitli indirgenmiş kükürt bileşiği açığa çıkar. İndirgenmiş kükürt bileşiklerinin farklı bir kaynağı da, sülfat indirgeyen bakteriler tarafından sülfatın anaerobik indirgenmesinin gerçekleştiği, tamamen farklı bir çevreden elde edilir (Dopson and Johnson, 2012).

Yapılan çalışmalar, asidofilik bakterilerle kükürt oksidasyonunda rol oynayan yol izlerinin belirlenmesinin zor olduğunu göstermiştir. Bunun birkaç nedeni vardır. Kimyasal reaktivite ve böylelikle birçok kükürt ara ürününün stabilite yetersizliği, bazı ara ürünlerin kendiliğinden ve enzimatik reaksiyonların kombinasyonu ile üretilebildiği anlamına gelir. Bununla ilgili olarak genellikle redoks reaksiyonu gözlenir ve bu da oksijen yol izinin takibini zor hale getirir. Bununla birlikte kükürt okside eden çeşitli bakteriler tarafından kullanılan yol izlerinde bir birlik olmadığı gibi yol izleri arasında farklılıkların büyük olabileceği açıktır. Kullanılan yol izlerinde bakmaksızın indirgenmiş kükürt bileşiklerinin son oksidasyon ürünü sülfattır ve bu da pH'ı düşürür (Dopson and Johnson, 2012).

2.6.2.2. Demir

Ferro demir, ferrik demire hızlı bir şekilde okside olur ve bu yolla elektron vericisi olarak işlev görür. Fe^{+2}/Fe^{+3} redoks çifti çok pozitif bir standart elektrod potansiyelidir (pH 2'de +770 mV). Sonuç olarak, sadece oksijen doğal elektron alıcısı olarak rol oynayabilir ve proton varlığında bu reaksiyonun ürünü sudur (O_2/H_2O +820 mV, pH 7'de). Bu yüzden elektron alıcısı olarak demirin kullanımı sadece aerobik şartlarda meydana gelir. Fakat, anaerobik şartlarda, pH düşük olmadıkça, ferro demir kendiliğinden ferrik demire okside olur. Bu nedenle aşırı asidofilik bakteriler elektron alıcısı olarak ferro demiri bu yolla kullanabilirler. Ancak Fe^{+2}/Fe^{+3} ile O_2/H_2O redoks

çifti arasındaki redoks potansiyeli farklılığı küçük olduğundan fazla miktarda ferro demirin oksidasyonu nispeten daha az hücre biyokütlesi gerektirdiği için nötral pH'ta büyüyen bakteriler için bu geçerli değildir. Fazla miktarda demir hücre membranından geçmez, hücre dışında kalır sonra da her ferro demir basitçe elektronunu hücre zarında bulunan bir taşıyıcıya verir (Hedrich et al., 2011). Farklı organizmaların demir oksidasyon elektron taşıma zincirinin benzer olup olmadığı merak edilen sorular arasındadır. Bob Blake ve arkadaşları 5 farklı asidofil mikroorganizmada demir oksidasyon bileşenlerini değerlendirmiştir. Her organizmada elektron taşıma zinciri bileşenlerinin farklı olduğunu ve sonuç olarak ferro demir oksidasyon yeteneği birkaç kez evrim geçirmiş olduğunu bildirmişlerdir (Hedrich et al., 2011).

2.6.2.3. Alternatif elektron vericileri

Çözülebilir metal iyonları, kuvvetli asidik çevrelerde genellikle yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. Bir oksidasyon seviyesinden daha fazlasında yer alan ve O_2/H_2O redoks çiftinden daha negatif redoks potansiyeline sahip metal iyonları asidofilik bakteriler için elektron vericisi olarak iş gören bir potansiyele sahiptir. *At. ferrooxidans* benzeri bir bakterinin doğrudan Cu^+ 'yi Cu^{+2} 'ye ve U^{+4} 'ü U^{+6} 'ya aerobik şartlarda okside ettiği bildirilmiştir. Bu oksidasyon reaksiyonlarına CO_2 fiksasyonu eşlik etmiştir. Ancak, ortamda ferrik demir bulunduğu, ferrik demirle metalin kimyasal oksidasyonunun aksine metalin biyolojik oksidasyonu daha zordur. Benzer şekilde Mo^{+5} de Mo^{+6} 'ya okside edilebilir, *At. ferrooxidans*'ın hücre ekstraktlarında molibden oksidaz izole edilmiştir. As^{3+} (AsO_2^-)'nin As^{5+} (AsO_4^{3-})'ye oksianyonların oksidasyonunda olduğu gibi mevcut potansiyel de asidofilik organizmalar için alternatif elektron vericisi olarak iş görür (Rawlings and Johnson, 2002).

2.6.3. **Heterotrof asidofiller için elektron vericileri ve karbon kaynakları**

Nötraloofilik prokaryotlarla karşılaştırıldığında istisnalar dışında asidofilik bakteri ve arkeler tarafından kullanılan organik elektron vericilerinin yelpazesi oldukça dardır. Çoğu mezofilik asidofil heterotrof şeker, alkol ve bazı aminoasitler gibi küçük molekül ağırlıklı monomerik bileşikler kullanırken polimerik bileşikler kullanamaz. Bazı

organik asitler de katabolize edilmektedir ancak asetik asit ve pirüvik asit gibi birçok monokarboksilik asit için eşik konsantrasyonu yaklaşık 300–500 mmol/L'dir bunun üstü asidofiller için toksiktir. Diğer yandan dikarboksilik ve sitrik asit daha az toksiktir, litrede mmol konsantrasyonunda sağlandığında bazı heterotrof asidofiller için kullanılmaktadır. Aromatik bileşiklerin katabolizması heterotrofik asidofillerde sınırlıdır, sadece bir mezofilik izolatın (*Ac. aromatica*) karbon ve enerji kaynağı olarak birçok aromatik madde (fenol, substitüye fenol, benzoik asit ve naftalen) üzerinde büyüdüğü bulunmuştur. Ancak, tam aksine *Ac. aromatica* daha evrensel substratlar olan gliserol ve glikozu kullanamaz. Ilımlı termofiller olan Gram pozitif heterotroflarda (*Alicyclobacillus* spp.) ve mikсотroflarda (*Sulfobacillus disulfidooxidans*) nişasta ve glikojenin kullanımı kanıtlanmıştır. Bu polisakkaritlerin her ikisi de termo–asidofil bir arke olan *Acidolobus aceticus* tarafından metabolize edilmesine rağmen bu prokaryot, bu polisakkaritlerin glikoz gibi monomerik birimlerini kullanamaz. Buna karşın Euryarchaeotlardan olan *Thermoplasma* ve *Picrophilus* spp. çok sınırlı organik elektron vericisine sahiptir, *Picrophilus*'un büyümesi maya özütü ile sınırlanmıştır (Rawlings and Johnson, 2002).

2.6.4. Elektron alıcıları

Kemolitotrofik asidofiller, ototrofik yaşam tarzları için büyük miktarda enerjiye ihtiyaç duyarlar. Onların genelde kullandıkları elektron alıcıları enerjetik açıdan en iyi elektron alıcısı olan oksijendir. Daha önce de belirtildiği gibi Fe^{+2}/Fe^{+3} çiftinin redoks potansiyeli nerdeyse O_2/H_2O 'nunki kadar pozitifdir ve sonuçta ferrik demir potansiyel olarak uygun bir alternatif elektron alıcısıdır. Alternatif elektron alıcısı olarak aerobik çevrelerde nerdeyse tamamen çözülemez durumda olması nedeni ile ferrik demiri kullanma olasılığı aerob nötralofiller ya da ılımlı asidofiller için mevcut değildir. Bununla birlikte pH 2 ve altında ferrik demir çözünürlüğü artık bir problem değildir ve eğer ortamda oksijen kıtlığı varsa ferrik demir enerjetik olarak iyi bir elektron alıcısı olabilir. Ferrik demiri elektron alıcısı olarak kullanan bir ototrofik asidofil için elektron vericisi olarak ferro demirden ziyade indirgenmiş kükürt bileşiklerini ya da moleküllerini kullanabilir olmalıdır. Anaerobik şartlar altında ferrik demir indirgenmesine eşlik eden kükürt ve tetratiyonat oksidasyonu *At. ferrooxidans*'ta

gösterilmiştir. Ohmura ve arkadaşları bu bakterinin ferrik demiri indirgemesine eşlik eden H_2 'yi kullanarak büyüebildiğini göstermişlerdir. Benzer şekilde *At. thiooxidans* ve *At.caldus* gibi ototrofik kükürt okside ediciler oksijen yokluğunda ferrik demirin indirgenmesini katalizleyebilirler. *At. ferrooxidans* ferrik demiri kullanabilmesinin yanı sıra elementel kükürdü elektron alıcısı olarak kullandığında Mo^{6+} , Cu^{2+} , ve Co^{2+} 'yi de indirgeyebilir. Ferrik demir solunumu ile büyüme potansiyeli aşırı asidofil heterotroflar arasında da fazlaca görülmektedir. Çünkü ferrik demir indirgenmesi birçok organik bileşiğin de oksidasyonuna eşlik edebilir. Bazı *Acidiphilium* türleri aerobik şartlarda bile ferrik demiri indirgeyebilirse de ferrik demir indirgenmesi oksijen konsantrasyonu düştüğü zaman artmaktadır. Bununla birlikte, sadece çözülebilir değil aynı zamanda çözülemeyen amorf ve kristal ferrik demir bileşikleri indirgenmektedir. *Acidiphilium* SJH, $Fe(OH)_3$ ve jarosit gibi mineralleri içeren birçok ferrik demirin redüktif solubilizasyonunu gerçekleştirebilirler. Ferrik demir solunumu, demir okside eden obligat ototroflar için ilave bir ferro demir elektron vericisi üretme üstünlüğünü sunmaktadır (Rawlings and Johnson, 2002).

Sülfat, sülfid minerallerinin ya da indirgenmiş kükürt bileşiklerinin oksidasyonundan aerobik şartlarda üretilir. Bu, aynı zamanda anaerobik asidofil prokaryotlar için de potansiyel bir elektron alıcısıdır. Ancak, ılımlı ve aşırı termofilik arkeler anaerobik şartlarda elementel kükürdü sülfide indirgeyebilmesine rağmen sülfat indirgeyen asidofillerle ilgili durum çok açık değildir. Sülfat indirgeyen bakterilerin izolasyonu ve çeşitliliği ile daha az sayıda bilgi mevcuttur (Rawlings and Johnson, 2002).

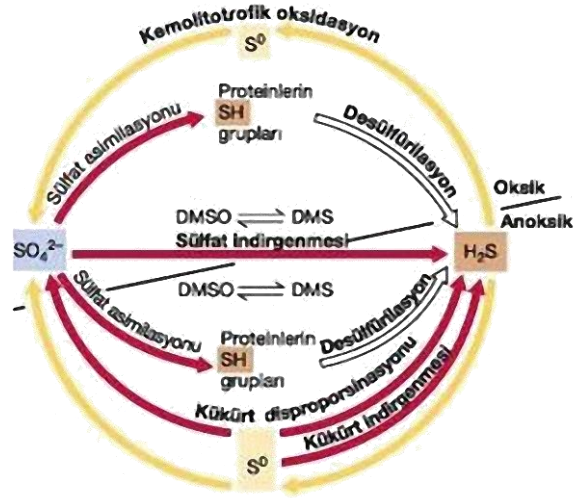
2.7. Biyojeokimyasal Döngülerden Kükürt ve Demir Döngülerinde Asidofil Organizmaların Rolü

Asidofil organizmalar kükürt ve demir döngülerinde önemli rol oynamaktadır.

2.7.1. Kükürt döngüsü

Kükürt döngüsünde bazı dönüşümler hem kimyasal hem de biyolojik olarak gerçekleşir. Kükürtün redoks döngüsü ve kükürt dönüşümlerinde mikroorganizmaların gerekliliği Şekil 2.9'da gösterilmiştir.

Kükürdün birçok oksidasyon durumu olabilirliğine rağmen doğadaki kükürt oksidasyonun yalnızca 3 önemli formu bulunur, -2 (sülfidril, R-SH, ve sülfür HS⁻), 0 (elementel sülfür S⁰) ve $+6$ (sülfat, SO₄⁻²). Okyanusların, biyosfer için en fazla kükürt rezervlerini (sülfat formunda) içermelerine rağmen yer kürenin en büyük kükürt miktarı sedimentlerde ve kayalarda sülfat mineralleri biçiminde bulunur (özellikle alçı taşı ve pirit). Kükürt döngüsündeki anahtar süreçler Tablo 2.1'de gösterilmiştir (Madigan and Martinko, 2005).



Şekil 2.9. Kükürt için redoks döngüsü (Oksidasyonlar sarı oklarla indirgenmeler ise kırmızı oklarla gösterilmiştir. hiçbir redoks değişiminin gerçekleşmediği reaksiyonlar beyaz ile gösterilmiştir. DMSO, dimetilsülfiksit; DMS, dimetilsülfür) (Madigan and Martinko, 2005).

Tablo 2.1. Kükürt döngüsünde anahtar süreçler ve prokaryotlar (Madigan and Martinko, 2005)

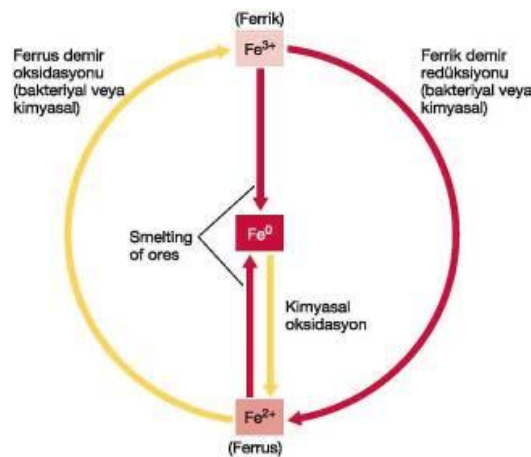
Süreç	Organizma
Sülfid/sülfür oksidasyonu ($H_2S \rightarrow S^0 \rightarrow SO_4^{-2}$)	
Aerobik	Kükürt kemolitotrofları (<i>Thiobacillus</i> , <i>Beggiatoa</i> vb.)
Anaerobik	Mor ve yeşil fototrofik bakteriler, bazı kemolitotroflar
Sülfat indirgenmesi (anaerobik) ($SO_4^{-2} \rightarrow H_2S$)	<i>Desulfovibrio</i> , <i>Desulfobacter</i>
Kükürt indirgenmesi (anaerobik) ($S^0 \rightarrow H_2S$)	<i>Desulforomonas</i> , çok sayıda hipertermofilik arke
Kükürt disproporsiyonu ($S_2O_3^{-2} \rightarrow H_2S + SO_4^{-2}$)	<i>Desulfovibrio</i> ve diğerleri
Organik kükürt bileşiği oksidasyonu ve indirgenmesi ($CH_3SH \rightarrow CO_3 + H_2S$) ($DMSO \rightarrow DMS$)	Birçok organizma yapabilir
Desülfürilasyon (Organik S $\rightarrow H_2S$)	Birçok organizma yapabilir

2.7.2. Demir döngüsü

Demir dünyanın dış tabakasında en çok bulunan elementlerden birisidir. Demir yeryüzünün yüzeyinde, doğal olarak ferro (Fe^{+2}) ferrik (Fe^{+3}) olarak iki oksidasyon durumunda bulunur. Fe^0 , Fe^{+2} ya da Fe^{+3} cevherlerinin eritilmesinden elde edilen insan faaliyetlerinin temel bir ürünüdür. Sonrasında, doğada element demir döngüsü, öncelikle Fe^{+2} ve Fe^{+3} formları arasında gerçekleşir. Fe^{+3} 'ün indirgenmesi ya kimyasal ya da anaerobik solunum sonucunda gerçekleşir ve Fe^{+2} 'nin oksidasyonu da ya kimyasal olarak ya da kemolitotrofik metabolizmanın bir sonucu olarak gerçekleşir (Şekil 2.10).

Kendiliğinden Fe^{+2} 'yi oksitleyebilen tek elektron alıcısı O_2 'dir. Nötral habitatlarda Fe^{+2} , *Gallionella* ve *Leptothrix* gibi demir bakterileri tarafından okside edilebilir. Oksidasyon öncelikle ferro demirce zengin anoksik yer altı suları ve hava arasındaki ara yüzeylerde gerçekleşir. Buna rağmen, en yaygın bakteriyel demir

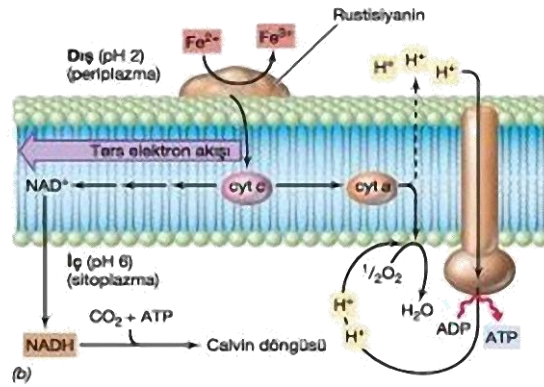
oksidasyonu Fe^{+2} 'nin spontan oksidasyona karşı kararlı kaldığı asidik pH'larda gerçekleşir. Aşırı asidik habitatlarda, asidofilik kemolitotrof *Acidithiobacillus ferrooxidans* ve buna akraba demir oksitleyicileri, Fe^{+2} 'yi, Fe^{+3} 'e oksitlerler. Ferro demirin ferrik demire oksidasyonunda çok az enerji oluşturulur ve bu yüzden bu bakteriler büyümek için fazla miktarda demir okside etmelidirler. Sonuçta az sayıda hücre bile demirin büyük bir kısmının presipitatlaştırılmasından sorumlu olabilir. *At. ferrooxidans* ve *Leptospirillum ferrooxidans* sülfirik asidin baskın asit olduğu çevrelerde yaşarlar ve buralarda büyük miktarda sülfat bulunmaktadır. 20–30 °C'de ve hafif asidik pH'da *At. ferrooxidans*'ın baskın olduğu görülürken diğer taraftan 30–50 °C ve daha asidik pH'da (1–2) *L. ferrooxidans* baskın bir organizmadır. Bu şartlar altında, ferrik demir, hidroksit olarak presipitatlaşmaz fakat jarosit olarak adlandırılan $[Hf_3(SO_4)_2(OH)_6]$ kompleks bir sülfat mineral olarak çöker. Jarosit sarımsı ya da kahverengimsi bir presipitattır. Asitli maden sularında temel kirleticilerden birisidir. Doğadaki en yaygın demir formlarından biri demir pirittir. Piriti, ferro sülfür ile kükürtün reaksiyonundan oluşur ve yüksek oranda çözünemeyen kristal yapı oluşturur ve maden kömürü ile bir çok cevherin yapısında yaygın şekilde bulunur (Madigan and Martinko, 2005).



Şekil 2.10. Demirin redoks döngüsü (Doğadan demirin temel formu Fe^{+2} ve Fe^{+3} 'tür. Fe^0 başlıca demir cevherlerinin eritilmesinde insan aktivitelerinden ortaya çıkan bir üründür. Ferro demir, demir kemolitotroflarınca aerobik olarak (veya nötr pH'da kimyasal olarak) belli anoksijenik fototrofik bakterilerce ve denitrifikasyon bakterilerince aerobik olarak oluşur. Oksidasyonlar sarı oklarla indirgenmeler ise kırmızı oklarla gösterilmiştir (Madigan and Martinko, 2005).

2.7.2.1. Ferro demir oksidasyonundan enerji eldesi

At. ferrooxidans'ın demir oksidasyonunun enerjietiği çok ilginçtir, çünkü Fe^{+3}/Fe^{+2} çiftinin indirgenme potansiyeli oldukça elektropozitiftir (pH 2'de +0.77 V). *At. ferrooxidans*'ın solunum zincirinde a ve c tipinde sitokromlar ve periplazmada bulunan, bakır içeren bir protein olan rustisiyanin bulunur (Şekil 2.11). Fe^{+3}/Fe^{+2} çiftinin indirgenme potansiyeli oldukça yüksek bir değerde olduğu için, oksijene kadarki ($1/2 O_2/H_2O$, $E_0 = +0.82$ V) elektron taşınım yolu da oldukça kısa olur



Şekil 2.11. Asidofil *At. ferrooxidans* ile Fe^{+2} oksidasyonu sırasında elektron akışı (Madigan and Martinko, 2005).

Şekil 2.11'e göre periplazmik bakır içeren protein olan rustisiyanin, Fe^{+2} 'den gelen elektronların aracı alıcısıdır. Buradan gelen elektronlar kısa bir elektron taşıma zinciri boyunca hareket eder ve O_2 'nin H_2O 'ya indirgenmesi ile sonuçlanır. Calvin döngüsünü devam ettirmek için gerekli indirgeyici güç ters elektron akışı reaksiyonlarından gelir. Zarın her iki tarafındaki pH farklıdır (Madigan and Martinko, 2005).

Demir oksidasyonu, periplazmadaki rustisiyaninin Fe^{+2} 'den Fe^{+3} 'e bir elektron geçişi sağlaması ve dolayısıyla Fe^{+2} 'nin Fe^{+3} 'e okside edilmesi ile gerçekleşir. Bu protein önce sitokrom c'yi indirgemekte, sitokrom c de sitokrom a'yı indirger. Son olarak da O_2 , H_2O 'ya indirgenir (Şekil 2.11). Daha sonra, proton aktaran ATPaz aracılığıyla zarda ATP sentezi gerçekleşir. ATP kazancı, elektron vericisinin yüksek

potansiyelinden dolayı tahmin edileceği üzere düşüktür. *At.ferrooxidans*'ın zardaki doğal proton gradientinin (sitoplazmanın pH'ı 5,5–6 iken, periplazmanın pH'ı 1–2'dir) sağlanması için, protonların ATPaz ile sitoplazmaya alınması yoluyla harcanmasına bağlı olarak iç pH kabul edilebilir sınırlarda tutulur (Şekil 9). Protonlar H₂O oluşumu sırasında tüketilir, ancak bu reaksiyon elektron da gerektirir ve bu elektronlar ferro demirden sağlanır. Sonuç olarak *At. ferrooxidans*, sitoplazmik zardaki doğal protein motive gücü kullanarak ve Fe⁺²'yi elektron vericisi olarak kullanarak ATP sentezleyebilir. *At. ferrooxidans*'ta ototrofi, Calvin döngüsü ile gerçekleştirilir ve elektron vericisi Fe⁺²'nin yüksek indirgenme potansiyeli nedeni ile, elde edilen enerjinin büyük bir bölümü CO₂ fiksasyonu için gerekli olan indirgeyici gücü sağlamak amacı ile ters elektron akışı reaksiyonlarında harcanır. Buna göre *At. ferrooxidans* oldukça yüksek enerji isteğine rağmen çok az miktarda enerji üretebilir. Bu nedenle de daha fazla enerji için, çok daha fazla miktarda Fe⁺²'yi okside etmesi gerekir, bunu gerçekleştirdiğinde bile hücre materyalini az miktarda üretebilir. Dolayısıyla, Fe⁺² okside eden asidofil bakterilerin yaşadığı çevrelerde, hücre materyali oluşumunun azlığı, buna karşın çökelmiş ferrik demir miktarının fazlalığı bu bölgede demir oksitleyici bakterilerin varlığına işaret eder. Bunun dışında birçok organizma elektron alıcısı olarak ferrik demiri kullanabilir. Ferrik demir indirgenmesi suyla kaplanmış topraklar, bataklıklar ve anoksik göl sedimentlerinde yaygın olarak görülür. Anoksik bataklıklar ya da suyla kaplanmış topraklardan demirce zengin yeraltı suyunun hareketi çok büyük miktarlarda ferro demir taşınımı ile sonuçlanabilmektedir. Bu demir yüklü su, oksijenli bölgelere ulaştığında, ferro demir kimyasal olarak ya da demir bakterileri tarafından okside edilir. Daha sonra ferrik demir bileşikleri kahverengi demir birikintileri biçiminde dönüşerek çöker (Madigan and Martinko, 2005).

2.8. Asidofilik Prokaryotlarda Kükürt Metabolizması

2.8.1. İndirgenmiş kükürt bileşiklerini aerobik metabolize eden enzim ve yol izleri

İndirgenmiş kükürdün oksidasyonu Fe⁺² oksidasyonundan gelen tek elektron ya da enerji korunumu için 8 elektron (H₂S'nin SO₄⁻²'ye oksidasyonu) kadar sağlayabilir. Buna ilaveten indirgenmiş kükürt bileşiklerinin oksidasyonundan türetilen elektronlar

daha düşük bir potansiyelde elektron taşıma sistemine girer. Bu da Fe^{+2} oksidasyonu ile gerçekleşenkinden daha fazla ATP üretimini sağlar (Kelly, 1999). İlk bakışta, asidofiller, ATP sentezi için faydalanılan dış ortamdan iç ortama doğru oldukça büyük bir proton gradientine sahiptir (Slonczewski et al., 2009). Fakat ATP üretimine elektron taşıma sisteminin bileşenleri ile gerçekleştirilen metabolik proton akışı eşlik etmeseydi sitoplazmada hızlı bir şekilde asidifikasyon gelişirdi ve hücre ölümüne neden olurdu.

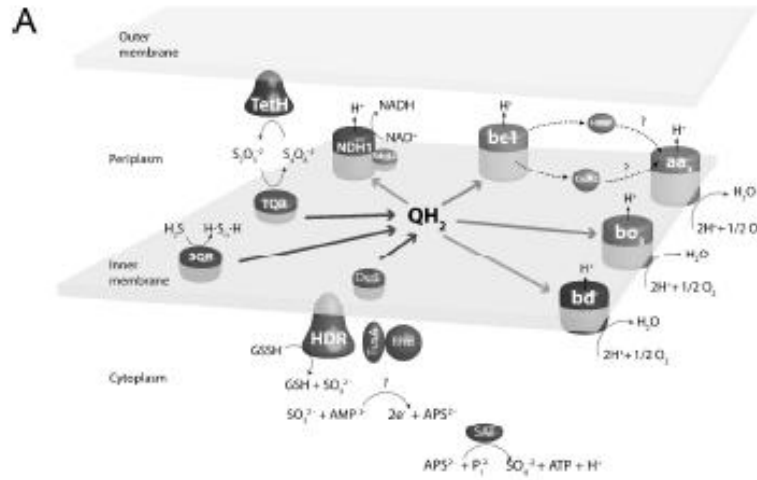
Asidofillerin indirgenmiş kükürt bileşiklerinin oksidasyonunda rol oynayan enzimlerin biyokimyasına son yıllarda yeterince yer verilmiştir (Rohwerder and Sand, 2007; Johnson ve Hallberg, 2009). *At. ferrooxidans* (Pronk et al., 1990), *At. caldus* (Hallberg et al., 1996), *A. acidophilum* (Meulenberg et al., 1992) için genel bir yol izinden gelen ara ürünler biyokimyasal ve inhibitör analizleri ile tanımlanmıştır (Johnson ve Hallberg, 2009). Bu modeldeki enzimlerin hücresel yerleşimi tüm asidofillerde aynı değildir örneğin denizden izole edilen bir *At.thiooxidans* suşunda kükürt okside eden enzimler periplazmada lokalize olmuştur (Kamimura et al., 2005). *At.caldus*'un ATP üretiminin analizi elektron taşıma sisteminin ara ürünlerinin bo_3 olduğu ATP üretiminin de F_0F_1 ATPaz olduğunu göstermiştir (Dopson et al., 2002). Gram (-) asidofillerin aksine *Sulfobacillus* spp. Gram (+) olanlarda indirgenmiş kükürt bileşiklerinin metabolizması hakkında çok az şey bilinmektedir.

Sulfolobales grubu arkelerinin indirgenmiş kükürt bileşiklerini metabolize eden enzimlerinin çoğu karakterize edilmiştir (Rohwerder and Sand, 2007). Arkeal ve Gram (-) bakteriyal kükürt metabolizmaları arasındaki ilk fark elementel kükürdün arkelerde bozulmasıdır (Kletzin, 1992). Anahtar enzim kükürt oksijenaz redüktazdır (Veith et al., 2011). Bununla birlikte diğer indirgenmiş kükürt bileşikleri ara ürünleri de (tetrasyonat ve tiyosülfat gibi) tanımlanmıştır.

2.8.2. Metabolizmada indirgenmiş kükürt bileşikleri

Gelişen moleküler tekniklerin asidofillere uyarlanmasında karşılaşılan zorluklardan dolayı bu prokaryotlardaki indirgenmiş kükürt bileşiklerinin metabolik yol izleri ile ilgili hipotezlerin çoğu sistem biyolojisine dayanır. Bu çalışmalardan elde edilen verilere göre bazı aday genler, *At.ferrooxidans* (Bruscella et al., 2007; Chi et al., 2007; Amouric et al., 2009; Quatrini et al., 2009), *At. caldus* (Mangold et al., 2011),

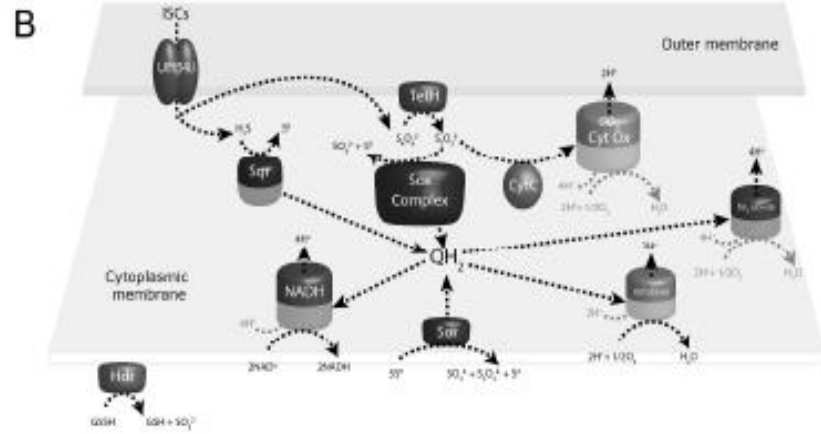
Sulfolobus spp. (Chen et al., 2005; Bathe and Norris, 2007), *Metallosphaera sedula* (Kappler et al., 2005; Auernik et al., 2008) ve *Ac.ambivalens* (Laska et al., 2003) gibi bazı organizmalarda indirgenmiş kükürt bileşiklerinin oksidasyonu ve indirgenmesine atanmıştır.



Şekil 2.12. *At.ferrooxidans*'da sistem biyolojisi yaklaşımlarından türetilen indirgenmiş kükürt bileşiklerinin oksidasyon modelleri (Quatrini et al., 2009).

At.ferrooxidans'ın indirgenmiş kükürt bileşiklerinin oksidasyonu (Şekil 2.12) sqr geni ile kodlanan sülfid/quinon oksidoredüktaz ile sülfid oksidasyonunu içerirken heterodisülfid redüktazı (hdrCBA) kodlayan genlerin aktivitesi elementel kükürtte büyütüldüğünde artmaktadır (Quatrini et al., 2009).

At. caldus'un indirgenmiş kükürt bileşik metabolizması için genler *At. ferrooxidans*'inkine benzerdir (Şekil 2.13) ve 2 tür arasındaki homologlar sülfid/quinon oksidoredüktaz (sqr), tetrasyonat hidrolizi (tetH) bd ubiquinol oksidaz (cydAB) ve bo₃ oksidazdır (cyoABCD) (Valdes et al., 2009; Mangold et al., 2011). *At. caldus* genomu tiyosülfat oksidasyonunda (soxABXYZ) rol oynadığı önerilen 2 sox gen kümesi içerir ve elementel kükürt oksidasyonunu kükürt oksijenaz redüktaz (sor) veya heterosülfid redüktaz (hdrA–hyp–C–B) sağlar (Mangold et al., 2011). *At.caldus* tetrasyonat hidrolaz operondan TetH ve doxD geninin aktivasyonu tetrasyonatın varlığında artmaktadır (Rzhepishevskaya et al., 2007).



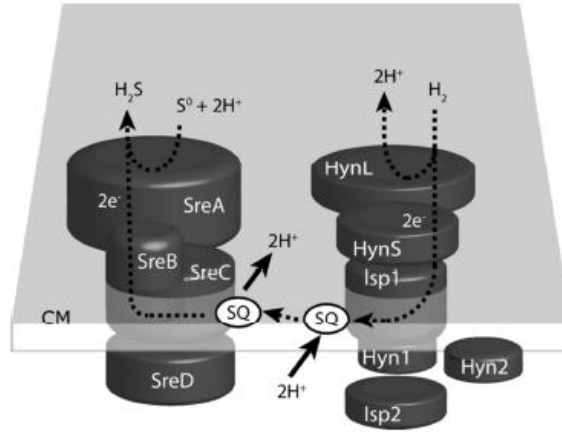
Şekil 2.13. *At.caldus*'da sistem biyolojisi yaklaşımlarından türevlenen indirgenmiş kükürt bileşiklerinin oksidasyon modelleri (Mangold et al., 2011).

At.ferrivorans genom sekansı ile SOX kompleksini (sox YZ–hypB) ve *At.caldus*'unkine benzer kükürt oksijenaz:redüktazı (sor) kodlayan genler tanımlanmıştır. İleri analizler elementel kükürdü okside eden protein genini *hdrABC* ve tiyosülfat okside eden proteinleri kodlayan *doxD* açığa çıkarmıştır (Liljeqvist et al., 2011a). Ancak bu genlerin ekspresyon ve rolleri deneysel olarak doğrulanmamıştır.

2.8.3. İndirgenmiş kükürt bileşiklerinin anaerobik metabolizması

Ac.ambivalens'te elementel kükürdün indirgenmesine eşlik eden anaerobik H_2 oksidasyon modeli Şekil 2.14'da gösterilmiştir. Yol izindeki anahtar enzim aktivitelerine 12 gen lik bir küme ile kodlanan hidrojenaz ile birlikte *sreABCDE* gen kümesi sayesinde kodlanan aday kükürt redüktaz aracılık eder (Laska et al., 2003). Kükürt redüktaz ve hidrojenaz, muhtemelen quinonlara bağlanan elektron taşıma sistemini oluşturur ve ATP sentezini yürüten elektrokimyasal gradient membranın sitoplazmik kenarında *Sulfolobus* quinon'ı indirgemedede kullanılan protonlar tarafından üretilmektedir. *At.ferrooxidans* da da bu şekilde aday genler vardır (Valdes et al., 2008). *At.ferrooxidans*'da anaerobik S^0 oksidasyonuna eşlik eden Fe^{+3} indirgenmesi ile ilgili proteomik çalışmalar sülfid/quinon oksidoredüktazın (sqr) aktivitesinin arttığını

göstermektedir. Ayrıca rustisiyanin ve sitokrom c_{552} gibi Fe^{+2} oksidasyonu süresince elektron taşıma sisteminde rol oynayan proteinlerin aktivitesi de artmaktadır (Kucera et al., 2012).



Şekil 2.14. *Ac.ambivalens*'te kükürt solunumu ile anaerobik büyüme (Laska et al., 2003). CM: sitoplazmik membran; SQ:sulfolobusquinon

2.8.4. Kükürt asimilasyonu

Kükürt (genelde sülfat olarak) çevreden asimile edilir ve metiyonin ile sistein aminoasitleri, demir–kükürt merkezleri ve diğer metabolitlere dahil olur (Aguilar–Barajas et al., 2011). Hücre dışı sülfat, ya ABC sistemi /CysU ve CysA) veya SulP sülfat permeaz aracılığıyla membrandan karşıya taşınabilir (Valdes et al., 2003). *At.ferrooxidans* biyomolekülünün (aminoasit gibi) sülfata asimilasyonu deneysel olarak kanıtlanmıştır (Tuovinen et al., 1975), bu sülfat asimilasyonun da biyoinformatik açıklaması değerlendirilmiştir (Valdes et al., 2003). Sistein üretimi; adenozin–5'–fosfosülfat (APS), sülfid ve sülfid ara ürünleri ile olur ve cysJIHDNG operonu tarafından kodlanır (Valdes et al., 2003). *At. ferrooxidans* APS redüktazı klonlanmış, ifade edilmiş ve aktivitesi doğrulanmıştır (Zheng et al., 2009). Miksotrof olmasına rağmen APS redüktaz ve sülfat adenil transferaz (SAT), *M.sedula*'da olduğu gösterilmiştir, ATP üretimi için bu proteinlerin sülfat asimilasyonuna ters yönde rol oynadığı düşünülmektedir (Auernik et al., 2008).

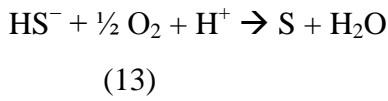
2.8.5. Kükürt oksidasyonunun enerjietiği

Elektron vericisi olarak kullanılan en yaygın kükürt bileşikleri; hidrojen sülfür (H_2S) (oksidasyon durumu -2), elemental kükürt (S^0) (oksidasyon durumu 0), ve tiyosülfattır ($\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$) (oksidasyon durumu $+2$). Kükürt oksidasyonunun son ürünü çoğu kez sülfattır ve H_2S (oksidasyonu -2) ile sülfat (oksidasyonu $+6$) arasındaki oksidasyon basamaklarında toplam 8 elektron taşınır. Bunun dışında kükürt dioksitin (SO_2)'nin sülfitin (SO_3^{-2}) oksidasyon durumu $+4$ 'dür (Madigan and Martinko, 2005).

Bir ara üründen başlayan kükürt oksidasyonlarında daha düşük miktarlarda enerji eldesi söz konusu olur (Denklem 2, 5, 12, 13):



(son ürün sülfat) $\Delta G_0' = -798,2$ kJ/reaksiyon



(son ürün, kükürt) $\Delta G_0' = -209,4$ kJ/reaksiyon



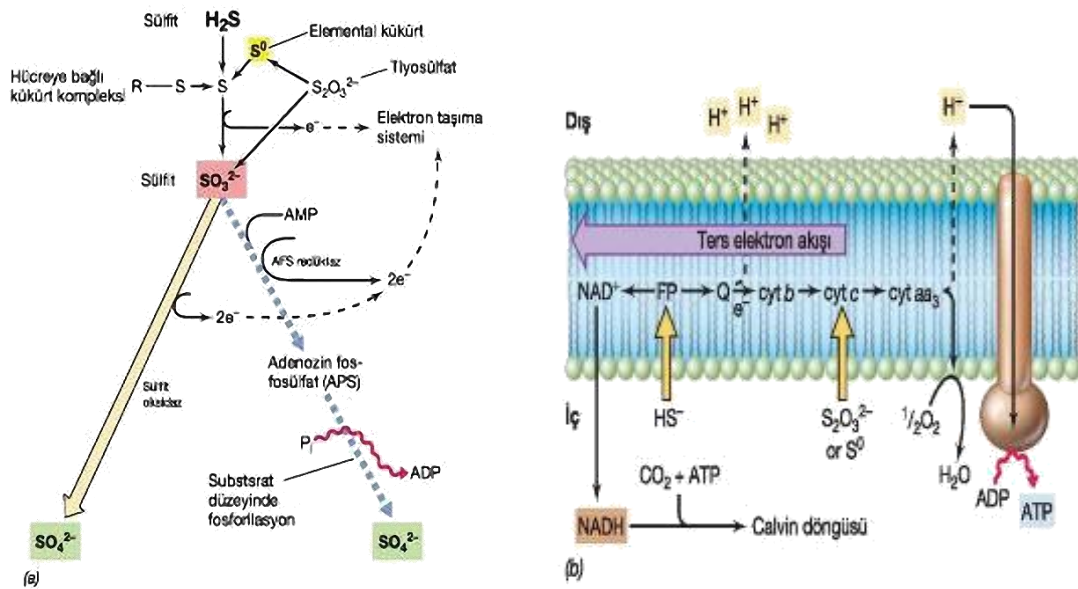
(son ürün, sülfat) $\Delta G_0' = -587,1$ kJ/reaksiyon,



(son ürün, sülfat) $\Delta G_0' = -818,3$ kJ/reaksiyon

En indirgenmiş kükürt bileşiği olan H_2S 'nin oksidasyonunun ilk basamağı sonucunda elemental kükürt oluşur. Bazı H_2S oksitleyen bakteriler bu elemental kükürdü hücre içine bırakır. Kükürt, ilk oksidasyonun sonucunda enerji rezervi olarak hücre içine biriktirilir. H_2S tükendiği zaman kükürdün sülfata oksidasyonu ile ek enerji elde edilebilir. Elemental kükürt elektron vericisi olarak dışarıdan sağlandığı zaman, elemental kükürdün son derece yüksek olan çözünmezliğinden dolayı organizma kükürt partikülüne bitişik olarak büyümek zorundadır. Organizma partiküle yapışarak, kükürt atomlarını sülfata oksidasyonla uzaklaştırabilir. Zarın veya periplazmik proteinlerin

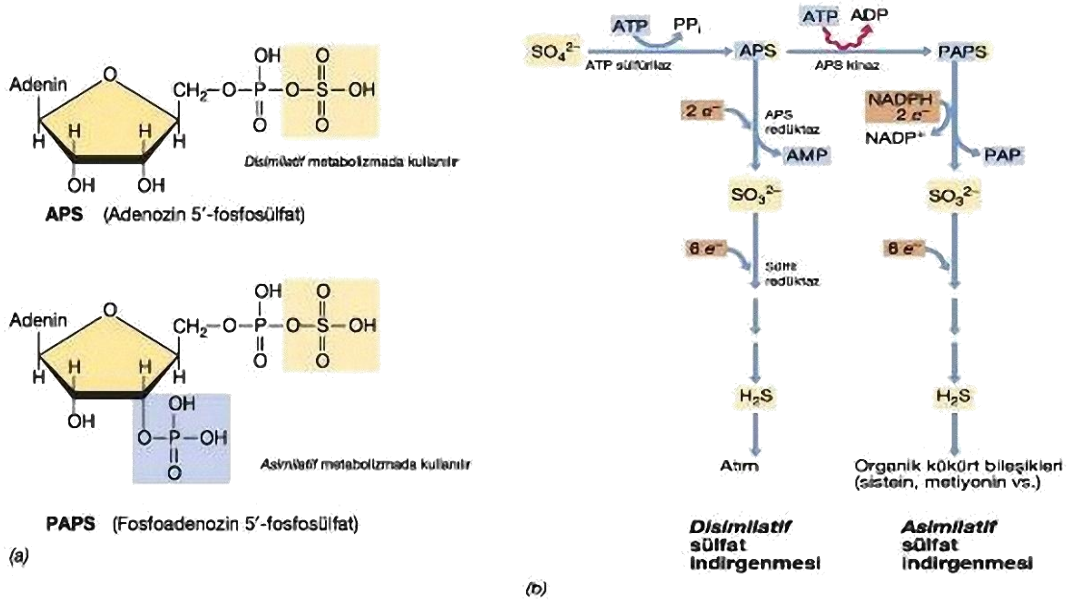
aktivitesi ile çözünmez haldeki S^0 , HS^- 'e indirgenerek çözünür forma getirilmekte ve hücre içine alınarak kemolitotrofik metabolizma ile kullanılır. Kükürt oksidasyonunun bir ürünü de H^+ 'dur. Protonların üretimi pH'yı düşürmektedir. Sonuç olarak, indirgenmiş kükürt bileşiklerinin oksidasyonu ortamın asitleşmesine yol açar. Kükürt bakterileri güçlü bir asit olan sülfürik asit üretmekte ve ortam pH'sını düşürmektedir (Madigan and Martinko, 2005).



Şekil 2.15. Kükürt kemolitotroflarınca indirgenmiş kükürt bileşiklerinin oksidasyonu. (a) Farklı bileşiklerin oksidasyonundaki basamaklar. Sülfat oksidaz yol izi sülfatin oksitlenmesinde büyük ölçüde sorumludur (b) Kükürt bileşiklerinden gelen elektronlar bir proton motive gücü oluşturmak üzere elektron taşıma zincirine katılır; tiyosülfat ve elemental kükürttten gelen elektronlar sitokrom c düzeyinde zincire girer. NADH ters elektron akışının enerji tüketen reaksiyonları tarafından oluşturulur. Çünkü elektron vericiler NAD⁺/NADH'dan daha fazla elektropozitifliğe sahiptir. Sit, sitokrom; FP, flavoprotein; Q, quinon (Madigan and Martinko, 2005).

Çeşitli kükürt bileşiklerinin oksidasyonunun biyokimyasal basamakları Şekil 2.15'de özetlenmiştir. Oksidasyon sülfür ile başladığında, sülfat (SO_3^{2-}) üretilmekte ve 6 elektronun oksidasyonu yapılmaktadır. Eğer S^0 başlangıç substratı ise, S^0 öncelikle sülfüre indirgenmesine rağmen aynı zamanda sülfat da üretilir (Şekil 2.15a). SO_3^{2-} 'nin

SO_4^{-2} 'e oksidasyonu için 2 yol mevcuttur. Bu oksidasyon için kullanılan en yaygın sistem, sülfir oksidaz enziminin kullanıldığı sistemdir. Sülfir oksidaz elektronları doğrudan SO_3^{-2} 'ten sitokrom c'ye transfer etmekte ve elektron taşınımı sırasında oluşan proton motive güç aracılığıyla ATP üretimi sağlamaktadır (Şekil 2.15b).



Şekil 2.16. Sülfat indirgenmesinin biyokimyası. (a) Aktif sülfatın iki tipi olan adenozin 5'-fosfosülfat (APS) ve fosfoadenozin 5'-fosfosülfat (PAPS) yapılabılır. Her ikisi de adenozin difosfatın (ADP) ikinci fosfatı ile sülfatın yer değiştirmesi sonucu oluşan ADP türevleridir (b) Asimilatif ve disimilatif sülfat indirgenme şeması (Madigan and Martinko, 2005).

Sülfir oksidaza ek olarak, sülfat indirgeyici bakterilerin metabolizması için gerekli bir enzim olan adenozin fosfosülfat (APS) redüktazın ters aktivitesi yolu ile de birkaç kemolitotrofu, SO_3^{-2} 'i SO_4^{-2} 'e okside edebilir (Şekil 2.15a ve 2.16). Bu reaksiyon kükürt kemolitotroflarınca AMP'nin ADP'ye dönüştürülmesi ile bir adet yüksek enerjili fosfat bağı kazancı sağlanarak, SO_4^{-2} üretimi yönüne doğru devam ettirilir (Şekil 2.15a). Kükürt kemolitotrofları elektron vericisi olarak tiyosülfatı kullandığı zaman, tiyosülfat S^0 ve SO_3^{-2} 'e ayrılır ve sonuçta her iki tiyosülfat bileşeni ayrı ayrı SO_4^{-2} 'ye okside edilir. İndirgenmiş kükürt bileşiğinden gelen bütün

elektronlar Şekil 2.15b'de de gösterilen bir elektron taşınım sistemine girerler. Çiftlerin indirgenme potansiyeline bağlı olarak, elektronlar flavoprotein ($E_0' = -0.2$) veya sitokrom c ($E_0' = +0.3$) seviyesinden taşınımına katılır ve son elektron alıcısı olan oksijene ulaşırken proton motive güç ATPaz'ın ATP sentezlenmesini teşvik eder. Ototrofik karbondioksit fiksasyonunda elektronlar, ters elektron akışından gelir, sonuçta NADH kazancı sağlanır ve CO_2 , Calvin döngüsü ile fikse edilir (Şekil 2.15b). Kükürt kemolitotrofları esas olarak aerobik bir grup oluşturmasına rağmen *At. denitrificans* gibi bazı türleri nitratı elektron alıcısı olarak kullanıp anaerobik olarak gelişebilir (Madigan and Martinko, 2005).

2.9. Uygulamalı Yaklaşımlar

Metal cevherleri ve konsantrelerinin biyolojik işlemleri olarak bilinen biyomadencilik biyoteknolojinin önemli bir alanıdır. İlk olarak 1960'lı yıllarda ABD'de maden atıklarındaki bakırın iyileştirilmesi amacıyla uygulanmaya başlanmıştır (Brierley, 2008). Günümüzde bakır, kobalt, nikel, uranyum ve altın gibi metaller bu yolla kazanılmaya çalışılmakta ve büyük ölçekli ticari uygulamalarda kendini göstermektedir. Uraninit gibi bazı minerallerin sülfidlerin oksidatif çözülmesini sağlayarak şartların oluşumuna öncülük edip ferrik demir ve sülfürik asit üreten bazı asidofil prokaryot türleri ile biyolojik madencilik gerçekleştirilebilmektedir (Rawlings and Johnson, 2007; Kimura et al., 2006). Hedef metallerin çözüldüğü (bakır gibi) süreçler biyolojik zenginleştirme olarak bilinmektedir. Altında olduğu gibi metalin mikroorganizma tarafından girilebilir ama çözünemediği durumda biyooksidasyon gerçekleşir. Günümüzdeki biyomadencilik işlemlerinde rol oynayan primer organizmalar demir okside eden prokaryotlar, ikinci grup olan kükürt okside eden mikroorganizmalar 3 açıdan önemli bir rol oynarlar: i) demir okside eden mikroorganizmaların ihtiyaç duyduğu asidik şartları (pH~1-3) sürdürmede sülfürik asit üretme ii) metal çözülmesini engelleyebilen mineral yüzey üzerinde kükürtçe zengin tabakaları uzaklaştırma iii) aşağı akışlı süreçlerde iyileştirmelerini kolaylaştırmak için solusyonda biyolojik zenginleştirmeye uğramış minerallerden açığa çıkan metallerin kalması (Dopson ve Lindström, 1999; Rawlings and Johnson, 2007). Bununla birlikte

At. ferrooxidans, *At. ferrivorans* ve *Sulfobacillus* spp. gibi mineralleri parçalayan bazı asidofiller hem ferro demiri hem de indirgenmiş kükürdü oksidasyona uğratabilir, bu yüzden biyomadencilik işlemlerinde ikili prtansiyel role sahiptir.

Sülfid minerallerinin oksidatif çözülmesi süresince meydana gelen kükürt transformasyon bilgisinin çoğu Sand ve Schippers'in yaptıkları çalışma ile edinilmiştir (Schippers et al., 1996; Schippers and Sand, 1999). Onlar metal sülfidleri “asitte çözülebilir” ve “asitte çözülemez” olarak 2 kategoriye ayırmıştır ve bunlar düşük pH'ta mikrobiyolojik olarak okside edildiğinde farklı ara ürünler oluşturmuştur. Pirit gibi asitte çözülemeyen sülfidlere ferrik demir atak yapar ve toplamda 6 tek–elektron oksidasyon basamağı ile sülfür metal bağları çözülür. Parçalanan mineralden açığa çıkan ilk kükürt ürünü tiyosülfattır ve bu nedenle oksidatif sülfid mineral çözülmesinin bu formu tiyosülfat mekanizması olarak tanımlanmaktadır. Tiyosülfat ferrik demir tarafından tetrasyonata okside edilir bu da oldukça reaktif olan sülfan–monosülfonik asit ($HS_3O_3^-$) ve sülfata hidrolize edilir. Çeşitli kükürt anyonları ve S^0 , sülfan–monosülfonik asit içeren reaksiyonlardan oluşur, bundan da kükürt okside eden asidofiller tarafından elektron verici olarak faydalanılır. Buna karşın asitte çözülebilir sülfidlerde (örneğin kalkosit; Cu_2S gibi) metal–kükürt bağları ferrik demir aracılığıyla olduğu gibi protonlar tarafından bozulmasına rağmen daha çok ferrik demir varlığında ilk serbest kükürt bileşiğinin kararlı olmayan sülfid katyonu (H_2S^+) olduğu düşünülmektedir. Polisülfid metabolizması olarak bilinen bu süreçte çeşitli polisülfidlerle elementel kükürde okside olan H_2S_2 'ye dimerize edilir (Schippers and Sand, 1999).

Biyolojik işlem ile gerçekleştirilen mineral oksidasyonu ile tüm ticari biyomadencilik süreçleri gerçekleştirilirken böyle bir yaklaşım okside edilen cevherlere uyarlanmamıştır. Bunlar ferrik demir mineralleri ile ilişkili nikelin çoğunun bulunduğu yerde olan nikel lateritleridir. Mikrobiyal olarak katalizlenmiş redüktif mineral çözülmesi aracılığıyla işleyen limonitik maden cevherlerinden nikeli ekstrakte etmek için yeni bir yaklaşım da Hallberg ve arkadaşları tarafından önerilmiştir (Hallberg et al., 2011). Bunda, *At. ferrooxidans* ile elementel kükürt oksidasyonuna mineral fazda bulunan ferrik demirin indirgenmesi eşlik eder. Bu da goetitin çözülmesi ve bunla

ilişkili nikelin açığa çıkması ile sonuçlanır. Goetitin mikrobiyal olarak katalizlenmiş redüktif çözülmesi “ferrodoks” süreci olarak bilinmektedir (du Plessis et al., 2011).

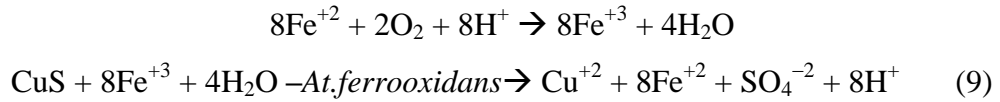
2.9.1. Madencilik sürecinde ortaya çıkan sularda indirgenmiş kükürt bileşiklerinin oksidasyonu

Sülfid madenciliği iyileştirme süreçlerinden gelen atık sular; flotasyon, hidrojen iyonu, pirit ve elementel kükürt arasındaki anaerobik reaksiyonlar süresince oluşan yüksek konsantrasyonlu indirgenmiş kükürt bileşikleri (özellikle $S_4O_6^{-2}$ ve $S_2O_3^{-2}$) içerir (Liljeqvist et al., 2011b). Eğer iyileştirilmeden kalırsa bu indirgenmiş kükürt bileşikleri alıcı su sistemlerinde mikrobiyal olarak okside edilebilirler bu da çevrenin asidifikasyonuna ve oksijence azalmasına neden olur (Silver and Dinardo, 1981; Li ve Boucher, 1999). Bu bileşiklerin açığa çıkarılmasında bir yöntem de kimyasal işlemdir (Ikumapayi et al., 2009; Lagace, 2010). Fakat bu süreçte, yüksek maliyet istendiği gibi istenmeyen kimyasal ajanların kullanımına da ihtiyaç duyulmaktadır. Atık suların çevreye salınmasından önce asit üreten potansiyelinin önlemek amacı ile kullanılan alternatif bir yöntem de biyolojiktir. Kuzey İsveç gibi bazı düşük sıcaklığa sahip coğrafik yerleşimlerde büyük hacimde atık sular deşarj edilmektedir. Bu da indirgenmiş kükürt bileşiklerinin oksidasyonunu 4–10 °C’de gerçekleştirilmesini gerekli kılar. Bu işlemin sürekli modu *At. caldus*, *At.thiooxidans* ve *Sulfobacillus* sp. gibi karışık asidofil kültürlerini kullanarak 37 °C’de gerçekleştirilebilmektedir (Saaf et al., 2009). Bu aşamada psikrotolerant *At. ferrivorans* bu amaçla kullanılabilir (Liljeqvist et al., 2011b; Kupka et al., 2009).

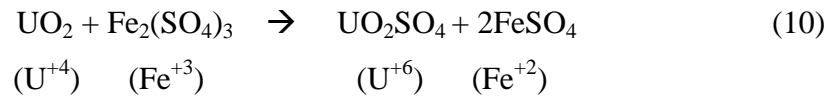
2.9.2. Biyolojik zenginleştirme

Zenginleştirme (liçing), sülfid içeren maden cevherlerinden Cu, Pb, Zn ve U’nun ekstraksiyonu için kullanılan ticari ölçekte bir uygulamadır. *At. thiooxidans* ve *At. ferrooxidans* asidofiliktir, karbon kaynakları CO_2 ’dir ve genelde asidik çevrelerde bulunurlar (sıcak su kaynakları ve sülfid maden cevheri birikimleri gibi). Büyümeleri için gereken enerjiyi demir ya da kükürdün oksidasyonundan sağlarlar. Bu organizmalar biyolojik zenginleştirme yapan organizmalara örnek olarak verilebilir. Mikrobiyal zenginleştirmede düşük oranda cevher büyük yığınlar halinde dökülür ve seyreltilmiş

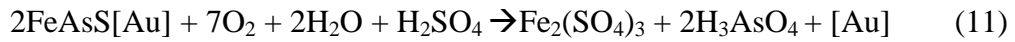
sülfirik asit solüsyonu yığına süzülür. Yığının alt bölgesinden metalleri çözerek gelen, metalin zenginleştiği sıvı (metal yüklü sıvı) toplanır. Çöktürme ünitesine taşınır. Burada istenilen metal tekrar çöktürülür ve saflaştırılır. Yüklü sıvı yığının tepesine tekrar pompalanır ve bu döngü tekrarlanır (Denklem 9) (Madigan and Martinko, 2005)



At. ferrooxidans U^{+4} , U^{+6} , ya okside edebilir (Denklem 10).



Altın doğada tipik olarak arsenik ve pirit mineralleri ile birlikte bulunur. *At.ferrooxidans* gibi mikroorganizmalar bu bileşiklere atak yaparak altın serbest kalana kadar arsenopirit minerallerini çözebilir (Denklem 11) (Madigan and Martinko, 2005).



2.9.3. Asidofil sülfidojenlerle seçici metal tutumu

Günümüzde geliştirilmekte olan teknolojilerden biri de asit tolerant ya da asidofil olan sülfat indirgeyen bakteri türleri kullanarak asidik maden drenajlarında ya da madencilik faaliyetleri oluşturulan kalkofilik metallerin seçici olarak uzaklaştırılmasını hedeflemektedir. Maden sularında bulunan bir çok geçiş metali, arsenik gibi metalloidler farklı çözünürlüklü ürünlere sahip olan sülfid fazlar oluşturur. Anahtar reaktant S_2 'nin konsantrasyonu çeşitli çözelti pH'ları ile kontrol edilebilir ($\text{H}_2\text{S} \leftrightarrow \text{HS}^-$ ($pK_a \sim 7$); $\text{HS}^- \leftrightarrow \text{S}^{-2}$ ($pK_a \sim 12$)). Aşırı düşük pH'larda (pH 2 gibi) sadece çok küçük çözünürlüklü ürünlere sahip metal sülfidler oluşacaklardır oysa ki diğer sülfidler sadece daha yüksek pH'larda oluşacaktır (FeS oluşumu en az pH 6 gerektirir). Biyosülfid süreci pH kontrollü kontakt reaktörlerde metal sülfidlerini segregates etmesine rağmen burdaki sülfidojenler SRB' den ziyade nötrofilik kükürt indirgeyicileridir ve asidik sularla temasta bulunmasını önlemek amacı ile kapalı

biyoreaktörlerde kültüre edilir aksi takdirde bakteriler inhibe olacak ya da ölecektir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada Nancuqueo ve Johnson, tek biyoreaktörle asidik sıvılardan gelen metalleri seçici olarak çöktürmek için ve sülfidi oluşturmak için asidofilik SRB konsorsiyumunun kullanılabilirdiği düşük pH'lı biyo-sülfidojenik bir sistem tanımlamışlar böylelikle hem reaktör kompleksliğini azaltmışlar hem de maliyeti düşürmüşlerdir. Çeşitli geçiş metallerinin ve alüminyumun bulunduğu sentetik AMD suları ile yapılan testler sabit pH değerlerinde (2,2–4,0) biyoreaktörle seçici olarak bakır ve çinkoyu presipite ettiklerini kanıtlamışlardır (Nancuqueo and Johnson, 2012).

2.9.4. Biyodesülfürizasyon

Fiziksel ve kimyasal yöntemlerden doğan handikaplar, araştırmacıları daha avantajlı olan biyolojik yöntemlere yönlendirmiştir. Biyolojik yöntemler zararsız reaksiyon ürünlerin oluşumunu sağlar, ılımlı şartlar altında gerçekleşir ve uygulanan organik maddenin değerini etkilemez. Biyodesülfürizasyon; birincil enerji kaynaklarından olan kömürden mikrobiyolojik kükürt giderimi şeklinde tanımlanabilir, aynı zamanda kalori değerini düşürmeksizin uygun sıcaklık ve basınç altında kükürdün uzaklaştırılabildiği çevre dostu bir yöntemdir. Bir diğer ifade ile mikrobiyal kükürt giderimi kükürdün sülfat gibi suda kolay çözünen bir bileşiğe dönüştürülmesidir ki bu da bir oksidasyon olayıdır. Biyodesülfürizasyon aerobik mikroorganizmalar tarafından katalizlenen biyokimyasal bir reaksiyondur (Kilbane et al., 2002). Biyodesülfürizasyonun CO₂ emisyonunu %70–80 azaltacağı düşünülmektedir. Etkin bir biyodesülfürizasyon sürecinin, şu anda kabul gören hidrosülfürizasyon sistemine nazaran %15 daha düşük maliyetle gerçekleştirilebileceği tahmin edilmektedir (McFarland et al., 1998; Vazquez–Duhalt et. al., 2002).

2.9.4.1. Desülfürizasyon sürecine ihtiyaç duyulan kömürler

Kömür; rezervlerinin geniş olması, ucuz, garantili, güvenilir ve fiyatlara duyarlı olmaması gibi nedenlerden dolayı tercih edilen birincil enerji kaynakları arasında yer almaktadır. Bu üstünlüklerden dolayı özellikle enerji sektörünün kömüre yatırım yapma eğiliminde olduğu görülmektedir. Petrol ve doğalgaz gibi fosil yakıt rezervlerinin giderek tükenmesi, enerji sektörünü, bu fosil yakıtlara nazaran daha uzun ömür biçilen

kömürün daha etkili ve daha doğru kullanmaya sevk etmektedir. Söz konusu enerji kaynaklarının kalan ömürleri dikkate alındığında, kömürün, özellikle 2030 yılından sonra çok daha büyük önem kazanacağı anlaşılmaktadır. Dünyada üretilen kömürün yaklaşık %70'i elektrik üretimi amacıyla kullanılmaktadır. Bunu takiben diğer kullanımları ısınma, demir-çelik ve çimento sektörlerinde yoğunlaşmıştır. Elektrik üretimi amaçlı kullanımın ise, 2030 yılında %79 düzeyine yükseleceği tahmin edilmektedir (WCI, 2005). 2006 yılı itibariyle dünya toplam elektrik üretiminde kullanılan kaynaklar içerisinde en büyük pay, %40,3 ile kömüre aittir (IEA, 2007).

Dünya üzerindeki tüm ülkeler enerji maliyetlerini düşürmek ve arz güvenliğini sağlamak amacıyla önceliği yerli kaynaklara vermektedirler. Ülkemizde ise, kullanılabilir kaynaklar sınırlı olmamasına karşın, öncelik, yerli kaynaklara değil ithal kaynaklara verilmektedir. Yerli linyitin Pazar payının ithal kömür ve doğal gazın tehdidi altında olması bu duruma verilebilecek en iyi örnektir. Ülkemizde, elektrik üretimi amacıyla kullanılabilir önemli miktarlarda kömür rezervleri bulunmaktadır. Bu rezervlerin projelendirilmesiyle, mevcut linyit sahalarının önemli bir kısmından elektrik üretimi amacıyla yararlanılmış olacaktır. Böyle bir durumun gerçekleşmesi, kömür sektörünün geleceği bakımından olumlu sonuçlar doğuracaktır (TEİAŞ, 2007).

Türkiye kömürlerine bakıldığında, genellikle daha genç oluşumlar olduğu görülmektedir. Daha açık ifade ile, ülke coğrafyasına yayılmış halde oldukça büyük rezervlerimiz olmakla birlikte bu depozitlerin (Doğu Karadeniz bölgesi hariç) çoğu linyit kömürleridir. Rakamlarla ifade edilmek istenirse linyitten daha kaliteli kömürlerimizin toplam rezerv değeri sadece 1.33 milyar tonken linyitler için bu değer 12.4 milyar ton civarındadır (enerji.gov.tr, 2010). Bununla birlikte linyitlerimizin çoğu düşük kalori değerine, yüksek nemlilik ve yüksek kül içeriğine sahip olup düşük kaliteli kömürlerdir ve bu özelliklerinden dolayı termik santrallerde kullanımı ön plana çıkmıştır (enerji.gov.tr, 2010; Palmer et al., 2004).

En genel tanımıyla “kömür” değişik oranlarda organik bileşenler içeren tortul bir kayadır (Kural, 1991). Bitkisel toplulukların deprem vb. olaylar sonucu bataklık ortamı gibi geçirimsiz ortamlarda yer altında kalması ile oluşan bozuşma ürünleridir. Yerin ısısı arttıkça önceleri “turba” olarak adlandırılan ama kömür sayılmayan bu organik madde, önce “liniyit” daha sonra “alt bitümlü kömür”, sonra da “taş kömürü” ve

“antrasit”e dönüşür. Bu ilerleyen olgunlaşma sürecine “kömürleşme” her seviyeye de “kömürleşme derecesi (rank)” denmektedir (Ateşok, 2004).

Kömürde birçok inorganik safsızlık yanında çevresel açıdan en önemli kirletici kükürttür. Kükürt kömür yapısında iki farklı formda bulunabilmektedir: Organik yapıya bağlı ve fiziksel yöntemlerle ayrıştırılamayan organik kükürt; genellikle pirit, nadiren markazit ve çok daha nadir olarak da millerit ve pirotin halinde görülen inorganik kükürt. Bunlar dışında sülfatık kükürt ve eser miktarda elementel kükürt de bulunur.

Literatürde; kömür yapısına; ikincil oluşumlar olarak da gelebilen kükürdün, gerçekte çoğunlukla kömürü oluşturan bitkisel oluşumların yapısında yani organik yapıya bağlı olarak bulunduğu verilmiştir. Organik yapıya bağlı olarak kükürdün, kömür rankı arttıkça süren başkalaşım sonucu ve doğal organizmaların da büyük etkisi ile organik yapıdan ayrılıp inorganik formlara dönüştüğü ileri sürülmektedir (Baruah and Gogoi, 1998).

Ancak yüksek oranda kükürt içeren kömürlerin yanması; sağlık, çevre ve ekonomi üzerinde olumsuz bir etki yapan SO_x gazlarının emisyonuna neden olmaktadır. Bu kükürtlü bileşikler, havadaki nemle reaksiyona girerek düşük pH'lı sislere ve asit yağmurlarına neden olur (EPA, 2006). Kükürtlü bileşikler, hava akımları ile taşındığı için, sadece üretildiği alanda değil, çok daha geniş alanlar üzerinde etkili olabilirler. Bu nedenle Sox emisyonlarını kontrol etmek için uluslar arası işbirliği gerekir (Malik et al., 2001).

Kömürün diğer enerji kaynakları ile daha iyi rekabet edebilmesi için temiz teknolojilerle donatılması gerekmektedir. Fosil yakıtların yanması sonucu oluşan karbondioksit ve sera gazları, mevcut enerji sisteminin sürdürülebilirliğini riske sokmaktadır. Canlıların doğal yaşam ortamını ve doğal kaynaklarımızı tehdit eden yerel ve küresel ölçekteki çevre sorunlarının artmasından dolayı çevre bilinci oluşmaya başlamış ve buna paralel olarak kömür üretimi ve tüketilmesinden kaynaklanan çevre sorunlarının önlenmesi de enerji politikaları ve programlarının ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir. Günümüzde çevre sorunları yerel sorunlar olmaktan çıkıp uluslar arası platformlarda tartışılan ve önlem paketleri önerilen konular arasında yer almaya başlamıştır. 1987 yılında BM komisyonu tarafından hazırlanan Ortak Geleceğimiz Raporu'ndan sonra Rio'da 1992'de gerçekleştirilen konferansta kabul edilen Gündem 21, yine bundan 10 yıl sonra yapılan Dünya Sürdürülebilir Kalkınma Zirvesi, medyada

da geniş yankı bulan Kyoto Protokolü gibi uluslar arası anlaşmalar ve toplantılar çevre bilincinin oluşmasına öncülük etmiştir. Araştırma ve geliştirme çalışmaları sonucunda düşük emisyonlu ve kabul edilebilir maliyetlerde kömür kullanımının artırılmasını sağlama konusunda önemli mesafeler alınması beklenmektedir. Sürekli gelişmekte olan temiz kömür teknolojileri, kömürün çevresel performansını artırma bakımından bir dizi seçenek sunmaktadırlar. Söz konusu teknolojiler vasıtasıyla, emisyon ve atıkların azaltılması mümkün olmakta, kömürden elde edilen enerjinin verimliliği artmaktadır. Gelecekte Avrupa'da Kyoto Protokolünün de içinde olduğu, üzerinde uzlaşma sağlanmış emisyon azaltma eğilimlerinin bir gereği olarak, tüm termik santraller emisyon kontrol ekipmanları ile donatılmak zorunda kalacaktır. Ayrıca enerji piyasalarının dünya rekabetine açılması, daha ucuz yakıt kullanımını beraberinde getirecektir. Kömür arz ve talep senaryoları planlanır ve modellenirken bu gelişmelerin de hesaba katılması gereklidir (Tamzok, 2007). Kömürde kükürdün yüksek olması sanayide de maliyeti artırmaktadır. Yüksek kükürt içeriği, hem çelik üretiminde hem de termik santrallerde korozyona ve SO₂ emisyonuna neden olmaktadır (Demirbilek, 1987).

2.9.4.2. Kömürden biyolojik kükürt gideriminde kullanılan mikroorganizmalar

Kömürdeki kükürdün biyolojik gideriminde farklı mikroorganizmalar rol oynamaktadırlar. Son yıllarda biyolojik süreçle kükürt giderim çalışmaları hız kazanmıştır. Bu nedenle düşük kaliteli kömürlerin biyolojik iyileştirilmesinde desülfürizasyon uygulamaları önemlilik arz etmektedir (Bayram et al., 2002; Aytar et al., 2008; Gonsalvesh et al., 2008; Aytar et al., 2011). Böylelikle kükürt içeriği yüksek olduğu için değerlendirilemeyen kayıp rezervlerimizin de işletilmesi mümkün olabilecektir.

Kükürt giderimi amacıyla ilk kullanılan mikroorganizmalar; *At. ferrooxidans*, *At. thiooxidans* (Silverman, 1967), *S. Acidocaldarius* (Kargi and Robinson, 1985) ve *Ac. brierleyi*'nin kültürleridir (Larrson et al., 1990; Ollsen et al., 1993). *At. ferrooxidans*; kömür biyodesulfürizasyonunda en yaygın kullanılan mikroorganizmadır. Bu tür, piritin indirgenmiş demir ve kükürt bileşenlerinin oksidasyonundan metabolik enerjisini karşılayan aerobik kemototrofik bir bakteridir (Malik et al., 2001).

Aller ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada kömür yıkanmasının drenajından gelen karışık bakteri kültürlerinin, kömürdeki piritik formu parçalamada oldukça etkili

olduğu bulunmuştur. Bilinen bu gerçek ışığında, simbiyotik ve kommensal ilişkide bulunan türler arasında mikrobiyal ekosistemler aracılığıyla oluşturulan biyolojik zenginleştirme doğal sistemini kurmak mümkündür. *L. ferrooxidans*, *At. organoparus*, *At. thiooxidans* ve *At. acidophilus*' un kükürt giderimi konusunda yaptıkları birliktelik bir simbiyozis örneğidir. Bunlardan her biri bireysel olarak bir şey yapamazken *L. ferrooxidans* diğer 3 türden herhangi biri ile bir birliktelik oluşturduğu zaman piriti parçalayabilir. Kömürün kendisinden izole edilen ve zenginleştirilen karışık kültürler kullanılarak yapılan bu çalışmada yüksek oranda piritik kükürt giderimi olmuştur (Aller et al., 2001).

Mezoasidofilik bakteriler, kömürden inorganik kükürdü uzaklaştırmada önemli mikroorganizmalar olmasına rağmen organik kükürdü elimine etmede fazla etkili değildir. *Pseudomonas* ve *Sulfolobus* gibi bakteri türleri, organik kükürdü yok etmede kullanım potansiyellerinin ortaya konması açısından büyük ilgi görmüştür. Farklı kömürlerin kükürt giderim oranları da farklıdır. Kükürt giderimine en yatkın kömür tipi linyittir. Bu, linyitin genç bir kömür olmasından kaynaklanır. Aynı zamanda linyitteki piritin morfolojisi diğer kömürlere göre farklıdır bu da ona mikrobiyolojik muamelede avantaj sağlar. Linyit, kömüre gevşek şekilde bağlı pirit kristallerini içinde barındıran bir kömürdür ve bu mikrobiyal atağı daha kolay hale getirir. Pirit-kömür bağlantısı güçlü ise desülfürizasyonun her tipi zayıf sonuçlar verecektir. Acharya ve arkadaşlarının yaptığı araştırma sonucu farklı kömürlerle *At. ferrooxidans*'ın izole kültürleri kullanılarak yaptıkları deneyde piritteki giderim açısından bakıldığında en fazla verim linyit kömüründe alınmıştır (Acharya et al., 2001).

Kömürün kendisinden ya da maden bölgelerinin çevrelerinde bulunan drenajlardan izole edilen bakteri ya da funguslar, doğal ekolojik nişlerinde mevsimsel sıcaklık değişimlerine ve çözünmüş maddelerin değişen konsantrasyonlarına sürekli maruz kalmaktadırlar. Bu nedenle, uygulama yapılan maden cevherlerinin mineralojik ve kimyasal kompozisyonları ile iklimsel şartlara adapte olabilen yerli suşları izole etmek ve daha sonra bunları desülfürizasyon sürecinde değerlendirmek avantajlı olacaktır.

2.10. AMD’lerde Yer Alan Prokaryotların ve Metabolik Fonksiyonlarının Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Çeşitlilik çalışmalarında kültür temelli yöntemlerin getirdiği sınırlamaların üstesinden gelebilmek için genellikle PCR’a dayanan moleküler teknikler kullanılmaktadır. Bu belirleme protokolu ekolojik ve çevresel araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Çevreden direk olarak ekstrakte edilen DNA, PCR için kalıp = template olarak kullanılabilir. 16S rDNA’yı hedefleyen PCR, prokaryotik çeşitlilik ve identifikasyon çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Pace, 1999). Hedef DNA (16S) evrensel ya da spesifik primerler ile çoğaltılır ve ürünler farklı yollarla ayrılabilir (Muyzer and Smalla, 1999).

2.10.1. AMD’lerde yer alan prokaryotların belirlenmesinde kullanılan moleküler yöntemler

Mikroorganizmalar arasındaki doğal akrabalığı yansıtan prokaryotik sistematığın geliştirilmesi her zaman taksonomistlerin ana hedefi olmuştur. Bununla beraber, bu akrabalıkların “süzgeçten geçirilmesi” bakteriyal identifikasyon ve sınıflandırmaya imkan sağlayan moleküler yöntemler (makromoleküllerin analizi) geliştirilene kadar başarılamamıştır (Mutlu, 2006).

Zuckerlandl ve Pauling (1965)’in fikri olan, moleküler dizi analizi tekniklerinin iyileştirilmesi, organizmaların filogenetik tarihçeleri için, makromoleküllerin primer yapılarını karşılaştırılabilir hale getirmiştir. Bu amaçla analiz edilen ilk moleküller sitokromlar ve ferrodoksinlerdir. Bunların hemen ardından, Carl Woese ve arkadaşları evrensel filogenetik bir marker olarak küçük alt ünite rRNA’nın yararlılığını göstermişlerdir. Bu çalışmalar mikroorganizmalar arasındaki doğal akrabalığı ortaya koyabilecek yeni bir prokaryotik sistematığın önerilmesini sağlamıştır (Woese, 1998).

Temelde, bir filogenetik marker’da aranan tüm özellikler, küçük alt ünite rRNA’da diğer tüm filogenetik markerlardan çok daha fazlasıyla mevcuttur. Fonksiyonel sabitliği yanında, heryerdeki dağılımı ve büyük yapısı (bilgi içeriği açısından) ile küçük alt ünite rRNA’yı kodlayan genler hem evrimsel olarak korunmuş bölgeleri hem de son derece değişken yapı elementlerini içermektedir. Sonuncu özelliği,

bağımsız yapı elementleri üzerine farklı fonksiyonel seçici baskıların oluşumu sebebiyledir. Dizi korunumunun bu değişebilen derecesi, tür düzeyinden domain düzeyine kadar geniş bir akrabalık için filogeninin kurulmasına olanak tanır. Çok yönlü küçük alt ünite rRNA dizi bilgileri setleri (şu anda 16.000'den fazla) herkese açık bilgi veri tabanlarında metin ya da dizilenmiş formatta ve hızla artan bir şekilde mevcut durumdadır (Ludwig and Klenk, 2001).

Doğru tanımlanmış prokaryotik türlerin önemli bir kısmı tür suşları ya da yakından ilişkili suşlardan gelen 16S rRNA dizileriyle temsil edilmektedir. Taksonomi alanındaki yeni tekniklerden biri ile küçük alt ünite rRNA dizilimlerinin karşılaştırılması, mikroorganizmaların identifikasyonu ya da doğal akrabalıklarına göre prokaryotik taksonların oluşturulmasında ya da tanımlanmasında çok güçlü standart bir yöntemdir. Dizilemedeki hızlı ilerleme ve in vitro nükleik asit amplifikasyon teknolojisi, pahalı karmaşık ve yorucu teknikler yerine, hızlı ve rutin uygulaması kolay tekniklerin kullanılmasına yol açmıştır. Sonuçta, küçük alt ünite rRNA'yı kodlayan genin analizi prokaryotik identifikasyon ve sistematikte en çok kullanılan sınıflandırma tekniğidir (Boone et al., 2001).

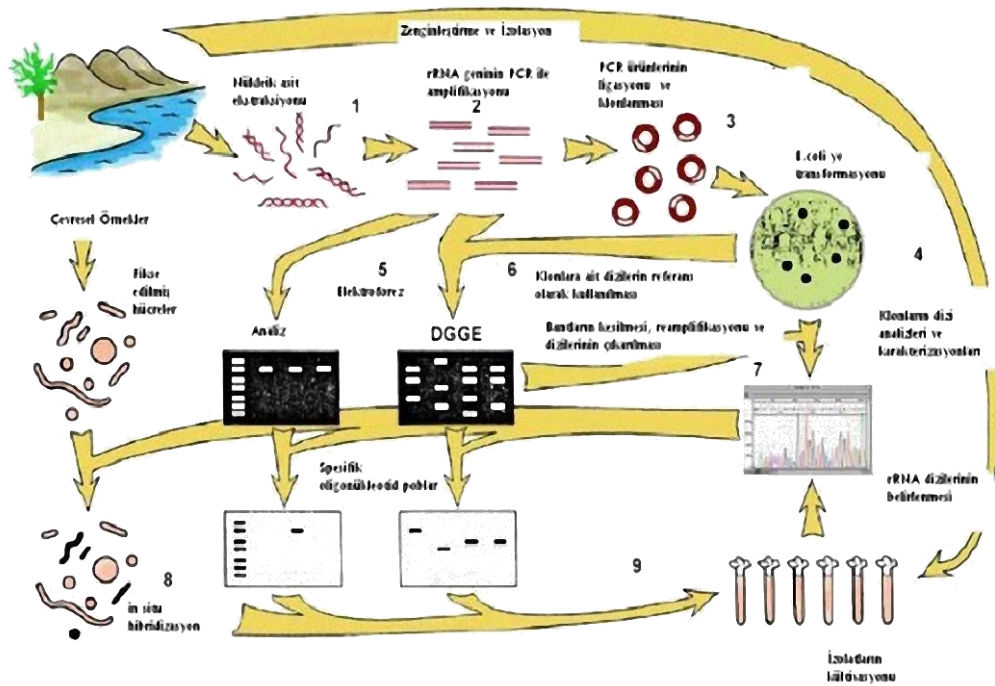
Uzun yıllar boyunca mikroorganizmalar üzerine çalışmalar ve analizler bunların saf kültürlerinin eldesine bağlıydı. Bu genel durum kültür edilemeyen çok farklı organizmaların da o habitatlarda bulunduğunu gösteren çeşitli çalışmalarla aşılmaya başlanmıştır. Bu çalışmalar kültüre alma tekniklerinden bağımsız olarak çalışılan çevrede mevcut olan organizmaları açığa çıkarabilmekteydi (Aman et. al., 1995).

Olsen ve arkadaşlarının çalışması ile çevresel örneklerden elde edilen rRNA dizileri o çevrenin çeşitliliğinin ortaya konmasında bir araç olarak kullanılmıştır. Daha sonraki yıllarda Head ve arkadaşları (1998) bu yöndeki çalışmalara hız vermişlerdir ve rRNA giderek artan bir şekilde mikrobiyal komünite analizlerinde kullanılır hale gelmiştir (Olsen et al., 1986; Head et al., 1998).

Moleküler mikrobiyal ekoloji çalışmalarını bir adım daha öne götüren diğer teknik ise PCR olmuştur. Çevresel örneklerin rRNA amplifikasyonlarını takiben dizi analizlemeleri komünite analizlerine hız kazandırmıştır. Grup spesifik primerlerin bulunmasıyla yöntem giderek daha başarılı hale gelmiştir. 16S rRNA'nın çevresel

örnekten doğrudan amplifikasyonla eldesinden sonra bunların gen kütüphanesi oluşturulup otomatik dizi analizleme ile yeni tip mikroorganizmalar bulunabilmiştir (Benlloch et al., 2001).

Aşağıdaki şekilde prokaryotik çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılan temel molekül teknikler özetlenmektedir. Burada verilen teknikler genel olarak “rRNA yaklaşımı” olarak bilinmektedir. rRNA yaklaşımı gibi kültürden bağımsız yöntemlerle karşılaştırıldığında kültüre bağlı yöntemlerle mikroorganizmaların küçük bir kısmı (<5%) belirlenebilmektedir. rRNA yaklaşımı biyoçeşitliliğin ortaya çıkarılmasında bir kilometre taşı olmuştur. Ancak canlı organizmaların metabolik özellikleri hakkındaki bilgiler bu yöntemle tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle organizmaların biyoteknolojik uygulamaları ile ilgili çalışmalarda organizmanın kültürel olarak üretilmesi gerekli ve zorunludur (Head et. al., 1998) (Şekil 2.17).



Şekil 2.17. rRNA yaklaşımı (Head et al., 1998).

2.10.1.1. 16S klon kütüphanesi oluşturma

16S klon kütüphanesi oluşturma mikrobiyal çeşitliliği belirlemede biraz zaman almasına rağmen önemli ve oldukça geçerli bir yöntemdir. Aşamaları; mikroorganizma izolasyonu olmaksızın doğrudan nükleik asit ekstraksiyonu, 16S rRNA'yı kodlayan genlerin bakteri ve arkeler için evrensel primerler kullanarak PCR ile amplifikasyonu, PCR ürünlerinin kompetan *E.coli*'ye transformasyonu, vektörün bulunduğu transforme olmuş klonların seçimi (şekilde beyaz koloniler), plazmid DNA'nın ekstraksiyonu, klonlanmış genin dizilimi, klon kütüphanesi oluşturma, dizi analizi sonuçlarından filogenetik bağlantının ARB, SeqLab, PAUP, PHYLIP gibi programlarla belirlenmesi şeklinde sıralanabilir. Doğruluğunun yüksek olması ve henüz kültüre ve identifiye edilmemiş organizmaların identifikasyonuna olanak tanıdığı için oldukça avantajlıdır. Çok zaman harcanması ve yorucu olması, toprak ve sedimentlerle çalışıldığında DNA ekstraksiyonunun zor olması, kantitatif olmaması, olması gerekenden daha fazla klon dizilenebilmesi dezavantajları arasında sayılabilir (Kirk et al., 2004).

2.10.1.2. Amplifiye edilmiş ribozomal DNA restriksiyon analizi (ARDRA)

Amplifiye edilmiş ribozomal DNA restriksiyon (ARDRA) olarak isimlendirilen teknik 16S rRNA bölgesinin PCR ile amplifiye edilmiş ürünlerinin restriksiyon enzimleri kullanılarak kesimine dayanmaktadır. İşlem sonunda elde edilen fragmentler jelde elektroforeze tabi tutularak gözlenirler. Bu yöntem ile ortaya çıkarılmış olan profillere göre, çok kısa zaman içerisinde çok fazla izolata ya da klona ait, genotipi yansıtan, karakteristik bantlar belirlenerek bunların analiz edilmesi sağlanabilmektedir. Özellikle çevresel örneklerden gen kütüphanesi kurularak yapılan çalışmalarda, gen çeşitliliğini kısa sürede gözler önüne süren bir tekniktir (Liu et al., 1997; Tiedje et al., 1999).

2.10.1.3. Denatüre edici jel elektroforezi (DGGE) ve sıcaklık gradientli jel elektroforezi (TGGE)

DGGE ve TGGE mikrobiyal çeşitlilik çalışmalarında benzer metotlardır. Teorik olarak DGGE aynı uzunlukta olan fakat farklı baz dizilimlerine sahip DNA fragmentlerinin ayrımını yaparken TGGE, DGGE ile aynı prensibi temel almasına

rağmen gradient olarak kimyasal denatürant yerine sıcaklık kullanır. DGGE ve TGGE'nin avantajları güvenilir, tekrarlanabilir, hızlı, ucuz, çoklu örneklerin analizine olanak sağlayan, mikrobiyal popülasyondaki değişimlerin takibini mümkün kılan yöntemlerdir. Komünite yapısı hakkında fikir edinilebilir ve bantların tek tek dizi analizinden sonra ya da spesifik oligonükleotit problemlerle hibridizasyonundan sonra tür kimliklerinin ortaya çıkarılmasını sağlayabilmektedir. Bu yöntemler teorik olarak 1 baz farklılığı olan küçük DNA fragmentlerinin “meltin” davranışlarındaki farklılığı tespit edebilecek potansiyelindedir (Muyzer et al., 1993; Muyzer, 1999; Miller et al., 1999).

DGGE'de ayırım, doğrusal olarak artan miktarda formamid ve üre gibi DNA denatürantı içeren poliakrilamid jel içindeki çift iplikli kısmen denatüre olmuş DNA molekülünün elektroforetik hareketine dayanmaktadır. Benzer denatürasyon sıcaklıklarında baz çiftleri açılır. Domainlerdeki dizilim farklılıkları denatürasyon sıcaklığının farklılık göstermesine neden olmaktadır. Belirli fragmentlerdeki dizilim farklılıkları denatüre edici gradient jellerde farklı pozisyonlarda göç olayının sonlanmasına neden olur. DGGE primerlerinden biri 40 baz uzunluğunda GC'ce zengin yapay bir kuyruk taşır. Yüksek sıcaklık melting domaini olarak iş gören bu dizinin DNA fragmentine eklenmesi ile dizilim varyansı %100'e kadar çıkabilmektedir. Başlangıçta ürünler moleküler büyüklüklerine göre ayrılırlar. Jel içinde ilerledikçe giderek artan denatüre edici koşullara maruz kalırlar. PCR ürünleri bir noktaya geldiklerinde çift iplikli DNA'da ayrılmalar başlar. Bu “melting” olayı dizinin uzunluğuna, GC içeriğine ve nükleotit dizisine bağlıdır (Muyzer et al., 1999).

Mikrobiyal popülasyonların çeşitliliğini basit ve hızlı göstermesi, ekosistemdeki dominant türleri saptanmasının kolay olması, çok sayıda (klonlamadan daha fazla) örneğin analizi için kullanılması avantajları arasında sayılırken temsili DNA'nın ekstraksiyonu ve amplifikasyonunun zor olabilmesi, PCR sonrası DNA kopyasının farklı olabilmesi ve bunun da bant yoğunluğunu değiştirebilmesi, belirlenen bant sayısının her zaman mikroorganizma kompozisyonunu tam yansıtmaması, bantlarının sekanslarının kısa DNA fragmentlerine sahip olması gibi dezavantajları da olabilmektedir (Tiedje et al., 1999).

2.10.1.4.Rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD)

Genetik markırların identifikasyonu ve çeşitli taksonomik seviyelerde organizmal genetik çeşitliliğin belirlenmesi için basit ve hızlı bir teknik olan RAPD'in temel prensibi ilgili olan türe ait genomik DNA üzerinde rasgele seçilmiş, tek bir 9–10 bp'lik oligonükleotidin düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfi olarak bağlanarak PCR ile çoğaltma yapmasıdır. Bunun devamında elde edilen PCR ürünü standart jel elektroforezinde yürütülür ve çoğaltma ürünleri bantlar halinde gözlemlenerek incelenir. Polimorfik bantların yüzdesi genetik çeşitliliği belirlemede kullanılır. Basit ve hızlı olması avantaj sağlarken kısa primerler düşük tekrarlarla sonuçlanması dezavantaj olarak söylenebilir (Kirk et al., 2004).

2.10.1.5.Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (AFLP)

AFLP'ler genetik çeşitliliğin hızlı taranmasında PCR temelli markırlardır. Bu yöntemin kilit noktası, genom boyunca rasgele dağılmış birçok farklı DNA bölgelerinin eş zamanlı taranmasına olanak sağlanmasıdır. AFLP markırları bireyler, populasyonlar ve türler arasındaki genetik çeşitliliği değerlendirmede kullanışlıdır. AFLP–PCR ürünlerinin en büyük dezavantajlarından biri homolog markırların (allelere) tanımlanmasındaki zorluktur. Heterozigot analizi gibi alelik durumun belirlenmesini gerektirdiğinden yöntem sınırlanabilmektedir. Fakat hızlılığı ve güvenilirliği avantajdır. AFLP'ler mikrobiyal ekolojistler ve evrim biyologları için güçlü bir katkıdır (Kirk et al., 2004).

2.10.1.6.Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) ve terminal restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (T–RFLP)

Bir DNA sekansını kullanarak mikrobiyal komünite çeşitliliğini değerlendirmede kullanılan kültürden bağımsız bir yöntemdir. Tek baz değişikliklerini veya farklı büyüklükte minisatellitleri belirleyebilen bir tekniktir. Restriksiyon endonükleazlarla DNA'nın farklı büyüklüklerdeki fragmentlere ayrılarak incelenmesine dayanmaktadır. Genotipleme, polimorfizm çalışmalarında yaygın şekilde kullanılmaktadır. Farklı uzunluktaki parçalar agaroz ya da poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak değerlendirilir. T–RFLP aynı prensibe dayanır ancak PCR

primeri floresan bir boya ile etiketlenir. T-RFLP parmak izleri mikrobiyal çeşitlilikte mekansal ve zamansal değişikliklerin takibi için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Kirk et al., 2004).

Terminal restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (T-RFLP) RFLP'nin bazı sınırlamaları üzerinde durarak bu teknikle aynı prensipleri takip ederken kullanılan PCR primerleri TET (4,7,2V,7V-tetrachloro-6-carboxyfluorescein) veya 6-FAM (phosphoramidite fluorochrome 5-carboxyfluorescein) gibi floresan boyalarla işaretlenmiştir (Tiedje et al., 1999). Bu da işaretlenmiş terminal restiksiyon parçalarının belirlenmesine imkan tanır (Liu et al., 1997). Görülebilen her bant, tek bir taksonomik birim ya da ribotipi temsil ettiği için bu teknik, çeşitlilik ile ilgili önemli bilgiler verme açısından avantajlıdır (Tiedje et al., 1999). Bant profilleri ortamdaki tür zenginliği ve benzerliği hakkında da bilgiler sunar (Liu et al., 1997). Bu yöntem/işlem bir çok habitatta bulunabilecek mikrobiyal çeşitliliği otomize tayin etmeye yarar (Osborn et al., 2000). Osborn ve arkadaşları (2000) tekniğin tekrarlanabilirliğini test etmişler ve bant profillerinin yüksek oranda tekrarlanabilir olduğunu bulmuştur. T-RFLP, sadece DNA ekstraksiyonu ve PCR sorunları tarafından değil aynı zamanda evrensel primerlerin seçiminden dolayı da sekteye uğrayabilir. Mevcut primerlerin hiç biri ökaryotik, bakteriyel ya da arkeal domainden tüm diziyi çoğaltamaz. Bununla birlikte bu primerler, var olan 16S rRNA, 18S rRNA veya ITS veri tabanlarına dayanır bu nedenle her zaman bir örnekteki doğru mikrobiyal çeşitliliği temsil etmeyebilir (Liu et al., 1997). Sonuç olarak elde edilen T-RF sekanslarının filogenetik tanımlanması 16S rRNA gen sekanslarının T-RFLP veri tabanları ile gerçekleştirilir. Bu veri tabanları Ribosomal Database Project II: <http://rdp8.cme.msu.edu/html/TAP-trflp.html>; Microbial Community Analysis: <http://mica.ibest.uidaho.edu/> şeklindedir. Farklı restriksiyon enzimleri farklı komünite parmak izleri üretecektir (Dunbar et al., 2000). Bu nedenle en az iki ya da dört farklı enzimin kullanılması önemlidir (Tiedje et al., 1999). Herhangi bir PCR bazlı yöntem gibi T-RFLP de doğru çeşitliliğin daha da altında tahmin sağlayabilir çünkü sadece sayısal olarak dominant türlerin belirlenmesini sağlayabilmektedir. Bunun dışında farklı türler farklı gen kopya sayısına sahip olabilecektir ve bu da yanlış sonuçlara götürebilcektir (Liu et al., 1997). Restriksiyon enzimleri tarafından tamamlanmamış kesim çeşitliliğin daha fazla gözükmesine neden

olabilir (Osborn et al., 2000). Tüm bu sınırlamalara rağmen otomize olduğundan bir çok araştırmacının mikrobiyal çeşitliliğin taranmasında tercih ettiği bir yöntemdir (Osborn et al., 2000). Bu tekniği yetersiz bulan araştırmacılar da vardır (Dunbar et al., 2000). Dunbar et al. (2000) farklı örnekler arasındaki ilişkiyi karşılaştırma açısından mükemmel bir yöntem olduğunu vurgulamıştır. Bakteriyel komünitelerdeki mekansal ve sıcaklık açısından değişiklikleri ölçmek (Lukow et al., 2000), kompleks komüniteleri çalışmak (Moeseneder et al., 1999), popülasyonları belirlemek ve gözlemlemek (Tiedje et al., 1999) için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Tiedje et al. (1999) spesifik ribotipleri takip etme açısından T-RFLP'nin DGGE'den 5 kez daha başarılı olduğunu bildirmiştir. T-RFLP, Fe-As açısından zengin AMD suyunda (Bruneel et al., 2006, 2008), piritçe zengin bölgelerden (Bruneel et al., 2005, Bryan et al., 2006; Tan et al., 2009) mikroorganizmaların çeşitliliğinin çalışılmasında kullanılmıştır.

2.10.1.7.Otomize ribozomal genler arası alan analizi (ARISA) ve ribozomal genler arası alan analizi (RISA)

DNA temelli komünite parmak izi yöntemi olan ARISA yüksek rezolüsyona ve tekrarlanabilirliğe sahiptir. RISA, 16S ve 23S rRNA genleri arasındaki ribozomal intergenik bölgelerin uzunluk polimorfizmine dayanır. Kodlanmayan ribozomal internal korunmuş bölgeler; yakın türlerde bile boyut ve nükleotit sekansları açısından değişkenlik gösterir ve yöntem karakterizasyonda ve sınıflandırmada kullanılmaktadır (Fisher and Triplett, 1999).

2.10.1.8.Tek iplik konformasyonel polimorfizm (SSCP)

PCR ile çoğaltılmış rRNA ve rDNA moleküllerinin ayrılmasına dayanan bu yöntem mikrobiyal komünitelerin yapısını ve dinamiğini analiz etmede başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Orita et al., 1989).

Yöntem; DNA sekansındaki farklılıklardan dolayı tek iplikli DNA'nın moleküller arası katlanmalarına dayanır. Gradyent jelleri için GC kuyruğuna sahip primerler gerektirmez. Ancak bu yöntemin de dezavantajları mevcuttur. Tek iplikli PCR amplifikasyonlarının konformasyonundan daha fazla veya birçok operonun

varlığından dolayı tek bir bakteri türünde fazla sayıda bant görülmesi bunlar arasında sayılabilir (Tiedje et al., 1999).

2.10.1.9. Değişken alanlı jel elektroforezi (PFGE)

Bu yöntemde mikrobiyal hücre plağı eritilmiş agarozla karıştırılarak hazırlanmakta, agaroz plakları tamponda yıkanıp restriksiyon endonükleazlarla kesilmektedir. Kesilmiş plaklar agaroz jele eklenir, daha önceden belirlenmiş aralıklarla akım polaritesini değiştirerek elektroforez gerçekleştirilmektedir. 10–800 kb boyutundaki büyük fragmentlerde bile değişken akımlı elektroforezde iyi bir çözünürlük elde edilebilir. Bu bant örnekleri dijital olarak kaydedilip seçilen mikroorganizmaların PFGE kütüphanesinde referans suşlarla karşılaştırılabilir. Bu yöntem *At. ferrooxidans* türlerinin filogenetik heterojenliği (Karavaiko et al., 2003), *Acidithiobacillus*, *Thiomonas* ve *Leptospirillum* cinsinin taksonomik tanımlanması (Amils et al., 1998), Rio Tinto'nun demir gradienti boyunca *Leptosprilli* dağılımı çalışmalarında kullanılmıştır (Garcia–Moyano et al., 2008).

2.10.1.10. Rep–PCR

Bu çeşitlilik analiz yönteminde tekrarlayan konsensus dizilere komplementer primerler kullanarak ayırım yapılmaktadır. Bu tekrarlanan elementler gen dışı palindromik dizilerdir. Bu bölgeler korunmuş olup önemli protein/DNA etkileşim bölgeleridir. Farklı tekrarlayan bölgelerin amplifikasyonu çeşitli boyutta DNA fragmenti oluşturur ve bu bantlar karşılaştırılabilir (Rademaker and de Bruijn, 1997). Rep–PCR'da en çok kullanılan yöntemler Rep–PCR (primer setleri Rep1R–I ve Rep2–I), ERIC–PCR (primer setleri ERIC1R and ERIC2), ERIC2–PCR (primer ERIC2), BOX–PCR (primer BOX A1R), ve (GTG)₅–PCR [primer GTG₅]'dir. Selenka–Pobell ve arkadaşları *Thiobacilli*'nin taksonomik kategorizasyonu için hızlı bir tanımlama bildirmiş ve burada BOX–PCR ve ERIC2–PCR kullanmıştır (Selenka–Pobell et al., 1998). Bu yöntem biyolojik zenginleştirme mikrobiyal komünitelerini belirlemek için de kullanılmıştır (Selenska–Pobell, 2001; Ni et al., 2008). Ancak bu yöntemin istatistiksel olarak değerlendirilmesi zordur.

2.10.1.11. Real time PCR

Bu yöntem, amplifikasyon döngüleri ile hedef DNA sekanslarını birikimini gerçek zamanlı göstermektedir. Konvansiyonel PCR'da çoğaltılmış PCR ürünü agaroz jel elektroforezle karakterize edilmektedir. Real time PCR'da amplicon konsantrasyonu SYBR Green I gibi DNA bağlayan boyalar ve/veya floresan etiketli oligonükleotit primerler kullanılarak gerçek zamanlı belirlenebilmektedir. Bu boya her döngüde ampliconlara bağlanmaktadır. Floresans sinyal, amplicon konsantrasyonunun gerçek zamanlı indikatörüdür. Bu yöntemin avantajları, reaksiyonlar kapalı bir tüpte gerçekleştiği için ilk sıcaklık kopya sayılarını doğru ölçme ve kontaminasyonu önlemedir. Bu yöntem sayesinde çevresel örneklerden mikroorganizmaların kültürden bağımsız kantitatif analizleri gerçekleştirilebilmektedir (Zhang and Fang, 2006). DNA bağlayan boya olan SYBR Green I'in spesifitesinin zayıf olması da dezavantaj olarak değerlendirilebilmektedir. Saf kültürlerde AMD mikroorganizmalarının sayılarının belirlenmesinde real time PCR yöntemi kullanılmıştır (Zammit et al., 2008; Kock and Schippers, 2006, 2008; Kock et al., 2007, Liu et al., 2006).

2.10.1.12. Fluoresan in situ hibridizasyon (FISH)

Spesifik problemlerin kullanılarak gerçekleştirilen nükleik asit hibridizasyonu, PCR uygulanmaksızın, moleküler mikrobiyal ekolojide önemli bir kalitatif yöntemdir. FISH yöntemi biyofilmlerdeki mikroorganizmaların dağılımını çalışmada da başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. rRNA hedefli problemlerle yapılan, ön kültüre işlemi gerektirmeyen, epifluoresans ve konfokal lazer tarama mikroskobu kullanılarak ya da flow sitometri yöntemleri ile karışık mikroorganizma topluluklarının değerlendirilmesini sağlayan bir yöntemdir (Bond et al., 2001). Polinükleotit DNA problemleri ile ya da spesifik oligonükleotit problemlerle yapılabilmektedir. İdentifikasyon, komünite analizleri, popülasyonların zamansal ve mekansal dinamiklerinin araştırılmasında kullanılabilir. Yöntem temelde hibridizasyon süresince 16S rRNA kopyasını içeren her bir ribozomun boyanmasına dayanmaktadır. Ancak düşük ribozom içeriğine sahip hücrelerin standart FISH protokolu ile belirlenmesini sınırlayabilmektedir. Bu hücreler yavaş büyüyen hücreler ya da besinsel azlığa maruz kalmış hücreler olabilir. Bunların üstesinden gelmek için FISH yöntemi tyramine sinyal

amplifikasyon tekniği ile birleştirilebilir ya da standart protokolde çalışılan organizma grubuna özgü değişiklikler yapılıp yöntem optimize edilebilir. Sekanslar yüksek kopya sayısına sahip olmazsa FISH yönteminin hassasiyeti azalabilmektedir (Kirk et al., 2004).

FISH protokolunde hücreleri doğal formuna yakın Şekilde tutmak için mikroorganizmaların fiksasyonu yapılır. Geçirgen hale gelen hücre duvarından prob hücreye girer, uygun sıcaklıkta spesifik problemlerin hibridizasyonu sağlanır, bağlanmamış problemlerin yıkama ile uzaklaştırılması sağlanır. Genellikle 16s rRNA'ya spesifik floresan etiketli problemler kullanılır. Kalitatif ve kantitatif analiz mümkündür. Hibridizasyon sonrası flow sitometri, floresan mikroskopu ya da konfokal mikroskop ile değerlendirilebilir (Kirk et al., 2004).

FISH yönteminin avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Gerekli problemler varsa çok hızlı ve basit bir yöntem olan FISH kültüre edilmeden mikroorganizmaların direk görüntülenmesini ve sayılmasını sağlar. Ayrıca yüksek uzmanlık gerektirmez. Ekosistem hakkında ön bilgi gerektirmesi, belirlenecek organizmanın rRNA sekansının bilinmesinin gerekliliği, spesifik prob dizaynının bazen mümkün olmaması, yeni bir prob için hibridizasyon dizaynı ve optimizasyonunun gerekmesi, manuel sayımın öznel olabilmesi, agregatların yapısal analizi, konfokal mikroskop ve resim analiz gerektirmesi gibi yöntemle ilgili sınırlamalar vardır (Kirk et al., 2004).

2.10.2. AMD'lerin etkiledikleri vrelerde yer alan prokaryotların fonksiyonları ile ilişkilendirmesini ortaya çıkaran teknolojiler

2.10.2.1. Mikroarray

Hücrelerdeki hemen hemen tüm değişimler mRNA yapılarındaki değişikliklerle oluşmaktadır. Diğer yandan, vreysel faktörlerin değişimleri de hücrelerde gen ekspresyonlarında değişikliklere neden olmaktadır. Genlerin ekspresyon paternlerini bilmek fonksiyonları hakkında önemli bilgiler verir. Genler ve gen ürünleri arasındaki etkileşimi anlamak için; genomdaki, binlerce–onbinlerce genin ekspresyon değişimlerini analiz etmek gereklidir. DNA ipi, gen çipi ya da biyoip gibi popüler tanımlarla da anılan DNA mikroarray'i cam, plastik veya silikon ip gibi katı bir yzeeye

tutturularak sıralı bir şekilde (array) oluşturulmuş mikroskobik DNA spotlarıdır. DNA mikroarrayleri, üzerinde her biri belirli bir gen için prob niteliği taşıyan, çok fazla sayıda DNA nükleotid dizisi bulunan birer mikroskop lamı gibi düşünülebilir (Greene and Voordouw, 2003; Bagwell and Lovell, 2000; Cho et al., 2001). 3 önemli AMD bakterisinin kompozisyonu, yapısı, dinamikleri ve fonksiyonel aktivitelerinin gösterilmesi için 50 mer'lik oligonükleotid mikroarrayi geliştirilmiştir. Bunun için 1072 prob dizayn edilmiştir (Yin et al., 2007). Garrido et al. (2008), 15–23 nükleotid temelli prokaryotik asidofil mikroarrayi geliştirmiştir. Bu array, temsili, bilinen tüm AMD bakteri ve arkelerini hedeflemiştir. Bu yaklaşım AMD sistemlerinde metabolik olarak aktif prokaryotların ve çeşitliliğinin belirlenmesine olana vermiştir. Bu teknik hızlı ve spesifik olmasına rağmen yakın türlerle problemlerin çapraz hibridizasyonundan dolayı tek spotlar için hibridizasyon yoğunluğunda varyasyon ve hedef oligoprobun sekonder yapısından dolayı yanlış sonuçlar, spot yoğunluğundan dolayı sterik engel gibi dezavantajlara sahiptir (Gentry et al., 2006).

2.10.2.2. Metagenomikler

Metagenomikler kültürden bağımsız yaklaşımlar olup sadece çevredeki mikrobiyal çeşitliliğini çalışmakla kalmayıp aynı zamanda ekosistemi düzenlemede mikroorganizmaların spesifik rollerini ilişkilendirmeye de yardımcı olmaktadır (Handelsman, 2004). Metagenomiklerde çevresel örnekten DNA ekstraksiyonu, saflaştırılması, boyut ayrımı ve metagenomik kütüphanelerinin geliştirilmesi için vektörle komponent hücrelere klonlama gerçekleştirilir. Metagenomik kütüphaneleri, hedef çevrede mikroorganizmaların metabolik fonksiyonların tanımlanması açısından fonksiyonel olarak da taranabilir. Metagenomik sekans–temelli yaklaşım ilk kez Tyson ve arkadaşları (2004) tarafından kullanılmış ve Iron Dağı'ndaki AMD'deki prokaryotik çeşitlilik ve ekofizyolojisi ortaya çıkarılmıştır. Sekanslar, en dominant organizmaların (*Leptospirillum* grup II ve *Ferroplasma* grup II) tam genom sekanslarını açığa çıkarmıştır. Açık okuma çerçevesi analizi bu çevrelerde bu mikroorganizmalarını yaşamalarını sürdürmelerini sağlayan CO dehidrogenaz ve format hidrojen lizaz gibi enzimlerin varlığını göstermiştir (Tyson et al., 2005). AMD biyofilm komünitelerinin üç farklı kütüphanesinin metagenomik sekansları, 12 tane bakteriyel ve arkeal tam

genomlarının yeniden yapılandırmasına imkan tanımıştır (Denef et al., 2010). Goltsman ve arkadaşları (2009), AMD ortamında karbon fiksasyonu ve yeni bir demir oksidasyon yol izi tanımlayabilmişlerdir.

2.10.2.3. Metaproteomikler

Metaproteomikler, çevresel örnekten elde edilen tüm proteinleri çalışmak için kullanılan bir yaklaşımdır. Metagenomiklerin aksine proteinler, metaproteomiklerde biyomarker olarak kullanılmaktadır. Metaproteomik analiz stratejileri 2 tipte incelenebilir (Wilmes and Bond, 2006). İlk stratejide, proteinler çevresel örnekten protein ekstrakte edilir. Çevresel örnekten protein ekstrakte edilir, iki boyutlu jel elektroforezinde izoelektrik noktası ve moleküler ağırlık temelli proteinler ayrılıp protein spotları peptidlere ayrılır ve peptidler matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrometrisi ile peptidlerin identifikasyonu gerçekleştirilir. İkinci stratejide, protein peptidlere sindirimi, 2 boyutlu nano sıvı kromatografisi kullanılarak ayrımı ve kütle spektrometresi ile peptidlerin tanımlanması yapılabilmektedir. Ram ve arkadaşları (2005) ikinci strateji sayesinde Iron Dağı'nda AMD üzerinde büyüyen asidofilik biyofilmden proteinleri ekstrakte etmişler ve 2000'den fazla proteini tanımlamışlardır. Proteinlerin %50'si dominant olan *Leptospirillum* grup II'dendir. Şaperon, tiyoredoksin, peroksiredoksin, rubreritirin, katalaz gibi en çok bulunan proteinler AMD'deki organizmaların yaşamalarını sağlarlar. Iron Dağı'nda yaptıkları proteomik çalışmasında Goltsman ve arkadaşları (2009) pirüvat ferredoksin oksidoredüktaz ve *Leptospirillum* grup II ve III'te karbon fiksasyonundan sorumlu diğer enzimleri tanımlamışlardır. Metaproteomikler, AMD ortamında mikrobiyal türlerin yeni fonksiyonel genlerini ve metabolik yol izlerini yakalamada mükemmel bir araç olmasına rağmen bu teknolojide analiz süresi ve duyarlılığının ve biyoinformatiğin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Keller and Hettrich, 2009).

2.11. Desülfürizasyon Sürecinde Uygulanabilecek Potansiyel Deneysel Tasarımlar

Deney tasarımı, bir süreçteki girdi faktörleri üzerine istenilen değişikliklerin sistematik bir şekilde yapılması ile cevap değişkeni üzerindeki değişkenliğin gözlenmesi ve yorumlanmasıdır. Deney tasarımları ile sonuç üzerinde en etkin girdi faktörlerini belirlemek, performans özelliğini hedef değere en yakın sonuca ulaştıracak şekilde girdi faktörlerinin seviyelerini belirlemek, kontrol edilmeyen girdi etmenlerinin sonuç üzerindeki etkisinin en az olacağı kontrol edilebilen girdi faktörleri kombinasyonunu oluşturmak, tüm faktör ve seviyelerin eş zamanlı deneye tabi tutulmak suretiyle optimizasyon sürecini kısaltmak mümkündür. Deney tasarımı sırasında kullanılan 3 ilke söz konusudur. Bunlar rassallaştırma, tekrarlama ve bloklama ilkeleridir (Çömlekçi, 2003). Rassallık, çevresel gelişmelerin belirli bir kurala ve düzene bağlı olmadan tesadüfi olarak oluşmasıdır. Deney tasarımı için rassallaştırmanın en önemli yolu bağımsız faktörlerin seviyelerinin her bir deney için rassal olarak atanmasıdır. Deneyle birinden fazla sayıda yapılmasıdır, tekrarlama deney hatasının ölçümünü sağlamak için gereklidir. Hata, tesadüfler ve değişkenliğe katkıda bulunabilecek diğer faktörler nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Belirli bir anlamlılık düzeyinde gerçekleştirilen istatistiksel anlamlılık testinin kesinliği arttırılmak isteniyorsa deneydeki tekrarlama sayısının artırılması gerekir. Bloklama bir deneyin hassasiyetini arttırmak için kullanılan bir teknik olup deney alanının bölümlere ayrılmasıdır. Burdaki temel düşünce, benzer deneysel birimlerin gruplara bölünmesidir (Çömlekçi, 2003).

Deney tasarımları genel olarak tesadüfi parselleri, tesadüfi blokları, latin karesi, tam faktöriyel ve kısmi faktöriyel deney tasarımları olmak üzere 5 ayrı grupta incelenebilir (Şanyılmaz, 2006).

2.11.1. Taguchi yöntemi

Taguchi yöntemi ile hedef değer etrafındaki değişkenlik azaltılması hedeflenmektedir. Bunun için, bu değişkenliğe sebep olan kontrol edilebilir faktörler tanımlanmalı ve kontrol edilemeyen faktörlerin etkisinin en az olacağı ürün ve süreci tasarlanmalıdır (Canıyılmaz, 2001).

Taguchi'nin kontrol edilebilen faktörlerin ve kontrol edilemeyen faktörlerin performans karakteristiği üzerindeki etkisini ölçmek için ortalama ve standart sapma ile birlikte kullanıldığı performans istatistiklerinden biri de S/N (işaret/gürültü) olarak adlandırılan performans istatistiğidir. Verilerin anlaşılabilirliğini kolaylaştırmak ve toplanabilirliğini sağlamak için ortalama yerine S/N oranı kullanılır. Böylece, ortalama ile standart sapma, aynı analiz tekniği ile analiz edilmiş olur. S/N oranı ortalamanın standart sapmaya oranı olarak tanımlanabilir (Taguchi et al., 2005). Bu değer kullanımı daha güvenli ve dengeli sonuçlar elde edilmesini sağlar (Taguchi and Wu, 1989). Ortalama dikkate alınmadığında varyans tek başına bir anlam taşımayacağından S/N oranı bulunurken dikkat edilmesi gereken nokta, ortalama ve evaryansın aynı anda kontrol edilmesidir (Çelik, 1993). Taguchi'nin performans karakteristiğinin olması istenilen durumlara göre geliştirdiği S/N oranları içinde en fazla kullanılanları şunlardır:

- a) Performans karakteristiğinin “hedef değer en küçük” olduğu durumlarda (gürültü, zararlı maddeler vb.). Bu tür problemlerde, performans karakteristiği y 'nin hedef değeri 0'dır.
- b) “Hedef değer en büyük”; (güç, mukavemet, % giderim vb.). Bu durumda y 'nin hedef değeri sonsuzdur.
- c) “Hedef değer en iyi” (elektrik voltajı, ürün boyutları vb.). Bu tür problemlerde y için belli bir hedef değer verilmiştir (Şanyılmaz, 2006).

Parametre tasarımı Taguchi yönteminin asıl aşamasıdır. Parametre tasarımında dikkat edilmesi gereken en önemli iki nokta robust tasarım ve ortogonal dizinler kavramlarıdır. Robust tasarım, performans karakteristiğinin, kontrol edilemeyen faktörlerdeki değişikliklerden etkilenmemesini sağlar. Robust tasarımla kontrol edilemeyen bir faktörün etkisi kontrol edilebilen başka bir faktörün ayarlanması ile azaltılmaktadır (Taguchi et al., 2005).

Genellikle deneysel çalışmalarda çok sayıda faktörler ve seviyeler bulunduğu için deneylerin gerçekleştirilmesi çok fazla zaman ve maliyet kaybına neden olmaktadır. Taguchi yöntemi bir tür kesirli faktöriyel tasarımdır. Deneylerin tüm

kombinasyonlarının denenmesi yerine ortogonal dizinleri kullanarak sadece bir kısmının yapılması ile, en iyi performans karakteristiği değerini veren faktör seviyelerinin bulunabileceğini ifade eder. Ortogonal dizinler, faktör seviyelerini teker teker değiştirmek yerine eş zamanlı olarak değiştirme yaparak deney sayısını azaltır (Canıyılmaz, 2001).

Ortogonal dizinler $L_a(b^c)$ şeklinde gösterilir. Burada ortogonal dizinler latin kare tasarımından türetildiği için L latin kare tasarımını temsil eder. “a” deneylerin sayısını, “b” her kolondaki seviye sayısını, “c” ise faktör sayısını ifade etmektedir. Yapılan deney tasarımına göre genellikle 2, 3 ve 4 seviyeli ortogonal dizinler kullanılmaktadır. En çok kullanılan ortogonal dizinler L_9 , L_{16} , L_{25} olabilmektedir (Taguchi et al., 2005).

Varyans analizi yöntemi, test edilen parça gruplarının ortalama performansları arasındaki farklılığı ortaya koymak için kullanılan istatistiksel bir yöntemdir. Varyans analizi toplam değişkenliği bileşenlerine ayıran matematiksel bir tekniktir, serbestlik derecesi, kareler toplamı ve varyans gibi değerlerin hesaplanması ile bulunur (Canıyılmaz, 2001). Serbestlik derecesi, bir sonuca varabilmek için yapılması gereken bağımsız karşılaştırmaların sayısıdır (Bayrak, 1996).

BÖLÜM 3

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasallar Sigma Aldrich, Fluka ve Merck'ten temin edilmiştir. Moleküler biyoloji çalışmalarında kullanılan kimyasal, enzim ve kitler Invitrogen, Fermentas MBI, New England Biolabs, Boline, Biobasic, Beckman Coulter, Promega ve Sigma firmalarından temin edilmiştir.

3.1.2. Çalışmada kullanılan cihazlar

Çalışmada kullanılan laboratuvar cihazları Çizelge 3.1'de listelenmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışma süresince kullanılan cihazlar

Kullanılan Cihaz	Markası (modeli)
Otoklav	Hirayama, Japonya
Thermal cycler	Techne, Applied Biosystems
pH Metre	WTW, Almanya
Jel Dökümantasyon sistemi	Uvitec, UK
Saf su cihazı	Mes Mp Multipure
Mikrosantrifüj	Centurion Scientific K3 series, UK
Yatay jel elektroforezi	Clever Scientific, UK
Elektroforez için güç kaynağı	Clever Scientific, UK
-85 °C derin dondurucu	Dairei, Japonya
Laminar air flow	Teknomar-Chemocell LRCX, TR
Mikroskop	Olympus
Flourosesans mikroskobu	Leica DM6000B
Sıcak su banyosu	Memmert, Almanya
Faz kontrast mikroskobu	Leitz Labolux
Stereo mikroskop	Wild M3Z
DGGE sistemi	Ingeny IPU-S

Çizelge 3.1. (devamı) Çalışma süresince kullanılan cihazlar

Kullanılan Cihaz	Markası (modeli)
Etüv	Binder, USA
Elektronik tartı	Sartorius, Almanya
Çalkalamalı inkübatör	Edmund Bühler, Johanna Otto GmbH, Almanya
Isıtmalı manyetik karıştırıcı	Heidolph, Almanya
UV-visible spektrofotometre	Schimadzu, Japonya
Pipet seti	Nichipet, Eppendorf, Biohit
Hibridizasyon fırını	Biometra OV3
Vorteks	IKA MS2 minishaker
Genetik Analiz Sistemi	Beckman Coulter CEQ8000
Elektrokimyasal analizör	Gamry PC3/600 potentiostat/galvanostat/ZRA sistem (Wilmington, ABD)
Fourier Transform Infrared Spectroscopy	Bruker Tensor 27
Termogravimetrik analizör/DTA	Perkin Elmer–Diamond
Taramalı elektron mikroskobu	Jeol 5600 LV
Kalorimetre	IKA C4000A
ICP–AES	Perkin Elmer 3100
Minor element analizör (XRF)	Thermo-ARL
Kalorimetre cihazı	IKA500, TGA500
Elementel (C, H, N) analizör	TGA
Kül, nem, uçucu madde ölçüm cihazı	TGA700
Kar–buz makinası	Scotsman AF80
Major element analizör (ICP-OES)	Perkin Elmer
XRD	Rigaku-Geigerflex
Ultrasonik banyo cihazı	Bandelin Sonarex
GPS cihazı	Garmin GPS-12
Arazi tipi analiz cihazı	WTW

3.1.3. Çalışmada kullanılan besiyerleri

Çalışmada kullanılan tüm besiyerlerinin içerikleri izleyen metinde verilmiştir.

3.1.3.1. İnorganik demir ortamı (iFeo)

Çözelti A

Heterotrofik bazal tuz çözeltisi (50X)

20 mL

İz element çözeltisi (1000X)	1 mL
------------------------------	------

Distile su	720 mL
------------	--------

2 ayrı şişeye bölünerek pH 2,5'a ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Çözelti B

Agaroz (Tip I)	4,8 g
----------------	-------

Distile su	250 mL
------------	--------

B çözeltisi; A çözeltisinden ayrı olarak, 2 ayrı şişeye bölünmek suretiyle 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Çözelti C

Demir sülfat (1 M, 10 mL) çözeltisi, H₂SO₄ ile pH 2,0'ye ayarlandıktan sonra filtre ile steril edilmiştir.

Sterilizasyon sonrası A, B ve C çözeltileri 50 °C'ye kadar soğutulmuş ve karıştırılmıştır. A çözeltisinin bölüdüğü şişelerden birine 1 mL *Acidiphilium* SJH aktif kültürü eklenmiş ve bu alt tabaka besiyerini oluşturmuştur, üst tabaka besiyeri ise steril olarak bırakılmış ve alt tabaka besiyerinin üzerine dökülmüş ve tamamen donmaya bırakılmıştır (Johnson, 1995; Hallberg and Johnson, 2003). Agarla katılaştırılmış katı ortamlarda zayıf büyüeyebilen ya da hiç büyümeyen asidofillerin izolasyonunda agaroz katılaştırıcı ajan olarak kullanılmıştır (Norris and Ingledew, 1992). Ayrıca overlay tekniğinde alt katmanda yer alan heterotrof asidofil izolat "*Acidiphilium* SJH" üst katmanda izole edilebilecek asidofil bakterilere toksik olan maddeleri ortamdan uzaklaştırarak daha iyi gelişimine olanak sağlamıştır (Hallberg and Johnson, 2003).

3.1.3.2. Kükürt ortamı (FeSo) (g/L)

Çözelti A

Bazal tuz çözeltisi (10X)	100 mL
İz element çözeltisi (1000X)	1 mL
Tripton soya brot	0,25 g
Distile su	585 mL

2 ayrı şişeye bölünerek pH 2.5'a ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Çözelti B (g/L)

Agaroz (Tip I)	4,8 g
Distile su	255 mL

B çözeltisi; A çözeltisinden ayrı olarak, 2 ayrı şişeye bölünmek suretiyle 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Çözelti C

Demir sülfat (1 M, 10 mL) çözeltisi, H₂SO₄ ile pH 2,0'ye ayarlandıktan sonra filtre ile steril edilmiştir.

Çözelti D

Potasyum tetrasyonat (0.1 M, 10 mL) filtre ile steril edilmiştir.

Sterilizasyon sonrası A ve B çözeltileri 50 °C'ye kadar soğutulmuş, C ve D çözeltileri ile birlikte karıştırılmıştır. A çözeltisinin bölüdüğü şişelerden birine 1 mL *Acidiphilium* SJH aktif kültürü eklenmiş ve bu alt tabaka besiyerini oluşturmuştur, üst tabaka besiyeri ise steril olarak bırakılmış ve alt tabaka besiyerinin üzerine dökülmüş ve tamamen donmaya bırakılmıştır (Johnson, 1995; Hallberg and Johnson, 2003).

3.1.3.3. Heterotrofik ortam (Yeo) (g/L)

Çözelti A

Heterotrofik bazal tuz çözeltisi (50X)	20 mL
İz element çözeltisi (1000X)	1 mL
Maya özütü	0,2 g
Distile su	720 mL

2 ayrı şişeye bölünerek pH 3'e ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Çözelti B (g/L)

Agaroz (Tip I)	4,8 g
Distile su	250 mL

B çözeltisi; A çözeltisinden ayrı olarak, 2 ayrı şişeye bölünmek suretiyle 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Çözelti C

Demir sülfat (1 M, 10 mL) çözeltisi, H₂SO₄ ile pH 2,0'ye ayarlandıktan sonra filtre ile steril edilmiştir.

Sterilizasyon sonrası A, B ve C çözeltileri 50 °C'ye kadar soğutulmuş ve karıştırılmıştır. A çözeltisinin bölüdüğü şişelerden birine 1 mL *Acidocella* PFBC aktif kültürü eklenmiş ve bu alt tabaka besiyerini oluşturmuştur, üst tabaka besiyeri ise steril olarak bırakılmış ve alt tabaka besiyerinin üzerine dökülmüş ve tamamen donmaya bırakılmıştır (Johnson, 1995; Hallberg and Johnson, 2003). Overlay katı besiyeri farklı şekillerde modifiye edilmiştir, bu bağlamda alt tabakada *Acidiphilium* SJH'den ziyade *Acidocella aromatica*'nın PFBC suşu kullanılmıştır. Bu asidofilik heterotrof organik asitleri katabolize etmede yetenekli olmasına rağmen glikoz, gliserol ve maya özütü gibi genel olarak kullanılan mikrobiyal substratlardan yararlanamamaktadır. Bu nedenle, eklenen organik substratlar ortamda PFBC suşu tarafından kullanılmamakta aynı zamanda da olası toksisite tehlikesinden de korunmuş olunur. Bu modifiye edilmiş yaklaşım, birçok ekstrem ve ılımlı heterotroflardan asidofilleri (*Acidobacterium* ve

Acidisphaera spp. vb.) izole ve kültüre edilmesinde başarılı bir şekilde kullanılabilir (Sen and Johnson, 1999; Hallberg and Johnson, 2003; 2005).

3.1.3.4. Demir–tripton soya broth ortam (FeTSBo) (g/L)

Çözelti A

Bazal tuz çözeltisi (10X)	100 mL
İz element çözeltisi (1000X)	1 mL
Trypton soya brot	0,25 g
Distile su	610 mL

2 ayrı şişeye bölünerek pH 2,5'a ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Çözelti B (g/L)

Agaroz (Tip I)	4,8 g
Distile su	250 mL

B çözeltisi; A çözeltisinden ayrı olarak, 2 ayrı şişeye bölünmek suretiyle 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Çözelti C

Demir sülfat (1 M, 10 mL) çözeltisi, H₂SO₄ ile pH 2,0'ye ayarlandıktan sonra filtre ile steril edilmiştir.

50 °C'ye kadar soğutulan sterilizasyon sonrası A ve B filtre ile steril edilmiş C çözeltileri ile karıştırılmıştır ve petrilere dökülmüştür (Johnson, 1995; Hallberg and Johnson, 2003).

3.1.3.5. *Acidiphilium* SJH aşılama besiyeri (100 mL)

Galaktoz	10 mM
----------	-------

Tripton soya brot	%0,025
Bazal tuz çözeltisi (10X)	10 mL

pH 2,5'a ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Filtre ile steril edilmiş stok potasyum tetratiyonat çözeltisinden çözeltide 2,5 mM, demir sülfat çözeltisinden ise 25 mM olacak şekilde eklenmiştir (Johnson, 1995).

3.1.3.6. Acidocella PFBC aşılama besiyeri (100 mL)

Heterotrofik bazal tuz çözeltisi (50X)	2 mL
İz element çözeltisi (1000X)	0,1 mL

pH 3'e ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Sonrasında filtre ile steril edilmiş fruktoz çözeltisinden çözeltide 5 mM, demir sülfat çözeltisinden ise 0,1 mM olacak şekilde eklenmiştir (Johnson, 1995).

3.1.3.7. Luria Bertani (LB) Besiyeri (g/L)

NaCl	10
Maya özütü	5
Tripton	10

Distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. pH 7,2'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Katı besiyerinin hazırlanması %2 agar ilavesi ile yapılmıştır (Dyall-Smith, 2004).

3.1.3.8. SOC besiyeri (100 mL)

Bacto®-tryptone	2 g
Bacto®-yeast extract	0,5 g

NaCl (1 M)	1 mL
1M KCl	0,25 mL
2M Mg ⁺² stok (filtre ile steril edilmiş)	1 mL
2M glukoz (filtre ile steril edilmiş)	1 mL

Tüm bileşenler karıştırılarak distile su ile 100 mL'ye tamamlanmış ve pH 7.0'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. 2M Mg⁺² stok çözeltisi için 20,33 g MgCl₂ 6H₂O ile 24.65g MgSO₄ 7H₂O maddeleri 100 mL' distile su eklenmiş ve filtre ile steril edilmiştir. Besiyerinin katı olarak hazırlanması gerektiğinde aynı içerik ayrıca litrede 15 g agar içermiştir.

3.1.3.9. Desülfürizasyon besiyeri (100 mL)

Basal tuz çözeltisi (10X)	10 mL
Trypton soya brot	0,01 g
İz element çözeltisi	0,1 mL
Distile su	89 mL

Derişik H₂SO₄ ile besiyerinin pH 2,5'a ayarlanıp otoklavlandıktan sonra filtre ile steril edilmiş 1 M FeSO₄ stok çözeltisinden 2,5 mL ve mikron düzeyinde öğütülmüş ve ayrıca steril edilmiş kömürden ilave edilmiştir.

3.1.4. **Çalışmada kullanılan çözeltiler**

3.1.4.1. Dilüsyon ortamı

Heterotrofik bazal tuz çözeltisi	10 mL
İz element çözeltisi	0,5 mL
Distile su	490 mL

1 M H₂SO₄ ile pH 2,60'a ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Hallberg & Johnson, 2003).

3.1.4.2. 50X heterotrofik bazal tuz çözeltisi (g/L)

Na ₂ SO ₄ .10H ₂ O	7,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	22,5
KCl	2,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	25
KH ₂ PO ₄	2,5
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0,7

121 °C'de 15 dakika otoklavlanıp steril edilmiştir (Hallberg & Johnson, 2003).

3.1.4.3. Bazal tuz çözeltisi (g/L)

(NH ₄) ₂ SO ₄	12,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	5

121 °C'de 15 dakika otoklavlanıp steril edilmiştir (Hallberg & Johnson, 2003).

3.1.4.4. İz element çözeltisi (g/L 0.01 M H₂SO₄'te)

ZnSO ₄ .7H ₂ O	10
CuSO ₄ .5H ₂ O	1
Cr ₂ (SO ₄) ₃ .15H ₂ O	0,5

MnSO ₄ .4H ₂ O	1
CoSO ₄ .7H ₂ O	1
H ₃ BO ₃	0,6
NaMoO ₄ .4H ₂ O	0,5
NiSO ₄ .6H ₂ O	1
Na ₂ SeO ₄ .10H ₂ O	1
Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O	1
NaVO ₃	1

121 °C’de 15 dakika otoklavlanıp steril edilmiştir (Hallberg & Johnson, 2003).

3.1.4.5. TAE 50X (g/L)

Tris base	242
Asetik asit	57,1 mL
EDTA (0.5 M pH 8)	100 mL

Distile su ile 1 litreye tamamlanmış, pH 8’e ayarlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır (Sambrook vd. 1989).

3.1.4.6. TBE 5X (g/L)

Tris base	54
Borik asit	27,5
EDTA (0.5 M pH 8)	20 mL

Distile su ile 1 litreye tamamlanmış, pH 8'e ayarlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır (Sambrook vd. 1989).

3.1.4.7. PBS 10X (g/L)

NaCl	80
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	11,5
KCl	2
KH ₂ PO ₄	2

Distile su ile 1 litreye tamamlanıp pH 7,2'e ayarlanmış, 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiş ve oda sıcaklığında saklanmıştır (Sambrook vd., 1989).

3.1.4.8. Mackintosh çözeltisi (g/L)

(NH ₄) ₂ SO ₄	0,132
KH ₂ PO ₄	0,027
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,053
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,147

pH 1,8'e ayarlandıktan sonra filtre ile steril edilmiştir (Mackintosh, 1978).

3.1.4.9. Lizozim stok çözeltisi (10 mg/mL)

Lizozim	100 mg
EDTA (0,5 M)	1 mL
Tris-HCl (1M)	1 mL

Steril distile H ₂ O	8 mL
---------------------------------	------

Filtre ile sterilize edilerek kullanılmıştır. -20 °C'lik derin dondurucuda saklanmıştır (Sambrook vd., 1989).

3.1.4.10. %80'lik DGGE stok solusyonu

Üre	13,45 g
Deiyonize Formamid	12,8 mL
Akrilamid/Bisakrilamid (%30)	8 mL
TAE (20X)	2 mL

mQ su ile 30 mL'ye tamamlanıp +4 °C'de saklanmıştır (Muyzer, 1999).

3.1.4.11. %0'lık DGGE stok solusyonu

Akrilamid/Bisakrilamid (%30)	8 mL
TAE (20X)	2 mL

mQ su ile 30 mL'ye tamamlanmış, buzdolabında +4 °C'de saklanmıştır (Muyzer, 1999).

3.1.4.12. %10 amonyum persülfat çözeltisi (g/mL)

Amonyum persülfat	0,1 g
Distile su	1 mL

Çözelti taze hazırlanır (Sambrook vd. 1989).

3.1.4.13. %10 SDS çözeltisi

Sodyumdodesilsülfat (SDS)	10 g
Distile su	100 mL

Hazırlandıktan sonra oda sıcaklığında saklanmıştır (Sambrook vd. 1989).

3.1.4.14. In situ hibridizasyon tamponu

NaCl (5 M)	360 µL
Tris-HCl (1 M)	40 µL
Formamide	700 µL
mQ su	900 µL
SDS (%10)	2 µL

Hazırlanıp buz üzerinde korunur (Anton, 1999).

3.1.4.15. FISH için yıkama tamponu

Tris-HCl (1 M pH 8)	1 mL
NaCl (5 M)	700 µL
EDTA (0.5 M)	500 µL

mQ su ile 50 mL'ye tamamlanır (Anton 1999).

3.1.4.16. X-gal çözeltisi

5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside	100 mg
--	--------

N,N'-dimethylformamide 2 mL

Çözelti hazırlandıktan sonra alüminyum folyo ile kaplanmış güneş ışığından korunmuştur, -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.4.17. IPTG çözeltisi (0.1 M)

IPTG 1,2 g

DNA-az ve RNA-az içermeyen su 50 mL

Bu çözelti filtre ile steril edilmiş ve -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.5. Moleküler çalışmalarda kullanılan primer ve oligonükleotit problemler

Çalışmada kullanılan primer ve oligonükleotid problemler Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. İzolatların moleküler tanımlama çalışmalarında kullanılan primer ve oligonükleotid problemler

Primer (ya da probun) adı	Spesifik olduğu grup	Primer (ya da probun) dizisi (5'-3')	Referans
20F	Archaea	AGAGTTTGATC(AC)TGGCTCAG	Orphan et al. 2000
27F	Bacteria	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Lane, 1991
1387R	Bacteria	GGGCGG(AT)GTGTACAAGGC	Marchesi et al. 1998
915R	Archaea	GTGCTCCCCGCAATTCT	De Long 1992
341F	Bacteria	CCTACGGGAGGCAGCAG	Muyzer et al., 1993
907R	Evrensel	CCGTCAATTCTTTGAGTTT	Muyzer et. al., 1993
341F(GC)	Bacteria	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCC GTCCCGCCGCCCCGCCCCGCT ACGGGAGGCAGCAG	Muyzer et al., 1993
907R(GC)	Evrensel	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCC GTCCCGCCGCCCCGCCCCGCGT CAATTCTTTGAGTTT	Muyzer et al., 1993
Arc915	Archaea	GTGCTCCCCGCAATTCT	Amann et al., 1990

Çizelge 3.2. (devamı) İzolatların moleküler tanımlama çalışmalarında kullanılan primer ve oligonükleotid problemler

Primer (ya da probun) adı	Spesifik olduğu grup	Primer (ya da probun) dizisi (5'-3')	Referans
Eub338	Bacteria	GCTCCCTCCCGTAGGAGT	Amann et al., 1995
LF581	<i>Leptospirillum</i> sp.	CGGCCTTTCACCAAAGAC	Bond et al., 2001
THIO1	<i>Thiobacillus</i> sp.	GCGCTTTCTGGGGTCTGC	Bond et al., 2001

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Çalışma alanlarının özellikleri ve su örneklerinin alınması

Örnekleme alanlarının belirlenmesinde hedef organizmaların yaşayabileceği en uygun fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip alanlar seçilmiştir. Bu amaçla ülkemizde aktif olan madenlerin drenaj sahaları ile birlikte artık aktivitenin durduğu maden alanlarındaki maden drenaj havuzları da araştırılmıştır. Örneklem yerleri olarak Balıkesir ve Çanakkale civarındaki asidik maden drenajları seçilmiştir.

Örnekleme alanlarından 2011 Nisan ayında örnekler alınmıştır. Yapılan örneklemler + 4 °C’de muhafaza edilerek en kısa sürede laboratuvara getirilerek analizlerine başlanmıştır. Tez kapsamında çalışılan örneklem noktaları aşağıda verilmiştir. Örnekleme alanlarına ait enlem ve boylamları belirten koordinat değerleri Garmin GPS-12 model GPS cihazı ile belirlenmiştir. Örneklerin sıcaklık, pH ve çözülmüş oksijen değerleri WTW arazi tipi analiz cihazı kullanılarak örnekleme anında belirlenmiştir.

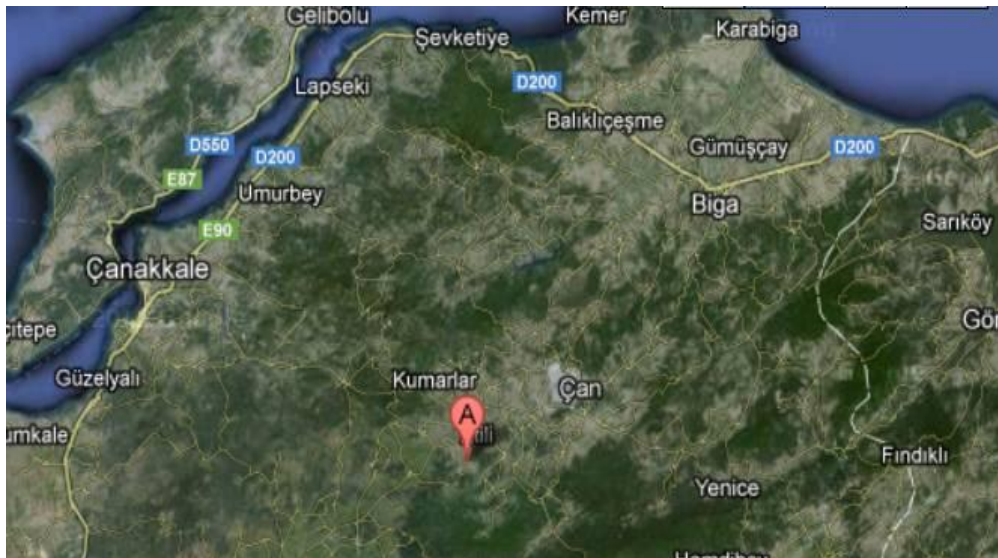
Bu örneklem noktaları;

- I. Çan- Keçiağılı köyü civarında bulunan kömür maden drenaj gölü (Çan AMD)
- II. Balya kurşun maden ocağı civarında bulunan metal maden drenaj gölü (Balya AMD)

Örneklem noktalarından kompozit numuneler alınmıştır. Asidofilik organizmaların izolasyonu için asidik çevrelerden su örnekleri steril vidalı kapaklı şişelere alınmıştır.

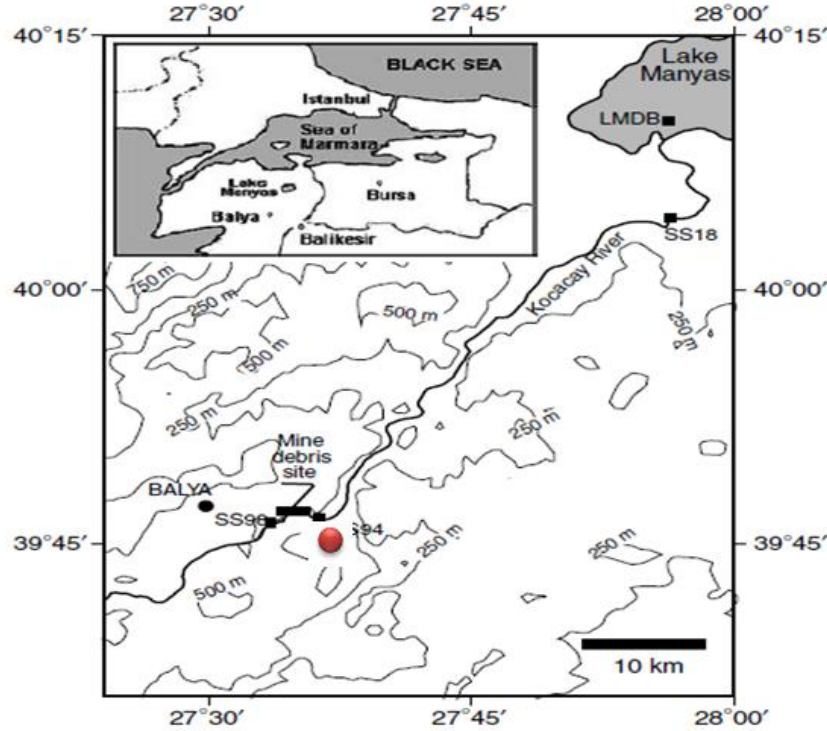
Çanakkale’nin Çan ilçesi sınırları içerisinde yer alan maden işletmelerinden bazıları faaliyetlerini zaman içerisinde sonlandırmış, bazıları ise faaliyetlerini halen sürdürmektedir. Daha kısa periyotlu faaliyetlerde bulunan küçük ve orta ölçekli maden işletmeleri faaliyetleri sona erdikten sonra genellikle herhangi bir iyileştirme çalışması gerçekleştirilmeden işletme sahalarını terk etmektedir. Bunun sonucu doğal yapısı ve topografyası bozulan bu alanlarda büyük çukurlar oluşmaktadır. Özellikle yüksek

kükürt içerikli linyit kömürünün çıkartılması işlemi sonrasında oluşan maden çukurlarına yüzeysel drenajın boşalması ve de yeraltı suyunun sızması sonucu suni göller meydana gelmiştir. Oluşan göl suları buldukları ortam nedeniyle zaman içerisinde pirit oksidasyonuna bağlı olarak asidik özellikler kazanarak asit maden göllerine dönüşmüştür (Yücel et al., 2012). Çanakkale ili Çan havzasında yer alan sözü geçen linyit sahası, 1960'li yıllarda işletilmeye başlanılmış, yaklaşık 45 yıl işletildikten sonra günün ekonomik koşulları ve rezervin azalması nedeniyle, günümüzde terk edilmiştir. Çalışma alanı olarak seçilen bu linyit sahasında, sülfür mineralleri bakımından zengin kaya malzemeleri bulunmaktadır. AMD oluşumunda, madencilik faaliyetleri sırasında sülfür minerallerinin oksijen ve su ile teması oldukça önemli olmaktadır. Çan havzası linyit sahasında bulunan kaya birimlerinin yaklaşık elli yıldır sözkonusu fiziksel ve kimyasal bozunma süreçlerine maruz kaldıkları bilinmektedir. Bu göllerden biri olan ve bu tez çalışmasında örneklem yeri olarak seçilen Keçiyağlı Köyü civarında bulunan asidik maden drenajlarının bulunduğu arazilerde yakın zamana kadar linyit çıkarma işlemi yapılmıştır. Ancak, 2005'ten beri maden ocağı kapalı vaziyettedir. Çan AMD yerleşiminin uydu görünümü Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1 Çan AMD'si yerleşiminin uydu görünümü (<http://www.geographic.org> sitesinden alıntıdır)

Diğer asidik maden drenajı ise Balıkesir'in Balya ilçesinde işletilen kurşun ve çinko maden ocaklarının civarında bulunmaktadır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Balya AMD'sinin haritadaki yerleşimi (Budakoglu and Pratt, 2005).

Kocacay Nehri ilçenin en önemli akarsuyu olup maden sahasının da yakınından geçerek Manyas Gölü'ne dökülmektedir. Çalışma alanında tipik iç Ege Bölgesi iklimi görülmektedir. 1839 yılından sonra Fransızlar tarafından işletilen Balya Pb–Zn madeni 1940 yılında terk edilmiştir. İşletim süresi boyunca önemli oranda maden atığı ve flotasyon ürünü malzeme Kocacay Nehri'nin bir kolu olan Sarısu Deresi ve bunu besleyen yan derelerin taşkın yataklarında depolanmıştır. Atıkların yüzeysel su kaynağının hemen yanına hiçbir önlem alınmaksızın depolanması bölgenin yüzeysel ve yeraltı sularına olumsuz etkilere neden olmaktadır. Sahada maden atıkları kaynaklı, ciddi bir ağır metal kirliliği olduğu tespit edilmiştir (Şimşek et al., 2012). 2005 yılında maden yeniden işletilmeye karar verilmiş ve ön hazırlık çalışmalarına başlanmıştır. Bölgede yapılan çalışmalara göre maden sahası ve çevresinde yaklaşık olarak 2.000.000 ton maden atığının yer aldığı belirtilmektedir. Bu atıklar Sarısu Deresi'nin kıyısında iki ayrı noktada kütleli olarak, farklı kesimlerde ise küçük öbekler halinde durmaktadır.

Bu iki atık sahası dere yatağında yer almakta olup, dere suyu ile sürekli temas halinde bulunmaktadır. Dere ile olan etkileşimi sonucu önemli oranda kirleticinin taşınarak Manyas Gölü gibi su kaynaklarına zarar verdiği belirtilmektedir (Aykol et al., 2003).

Seçilen örneklem yerlerinden olan Çan ve Balya AMD'lerine ait Nisan ayı görüntüsü Şekil 3.3 ve 3.4'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3 Çan asidik maden drenajı (2011–Nisan ayı örneklem yeri)



Şekil 3.4 Balya asidik maden drenajı (2011–Nisan ayı örneklem yeri)

Farklı zamanlarda alınan su örneklerinde bulunan metal miktarları ICP–AES (Perkin Elmer 3100) cihazında ölçülmüştür.

3.2.2. Mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesine yönelik komünite analizleri

3.2.1’de belirtildiği biçimde alınan ve laboratuara getirilen örneklerdeki mikrobiyal komünitenin belirlenmesi için iki ayrı strateji izlenmiştir. Bunlar; kültüre bağlı ve kültürden bağımsız tekniklerdir.

3.2.2.1.Kültüre bağlı yöntemler

i) Asidofil mikroorganizmaların izolasyonu ve sayımı

Asidofil mikroorganizmalar için toplamda 4 farklı izolasyon ortamı kullanılmıştır. Bu besiyerleri çift tabakalı (o) hazırlanmış olup; inorganik demir (iFeo), kükürt (FeSo), heterotrofik (Yeo) ve demir–tripton soya brot ortamı (FeTSBo) şeklindedir. Besiyerlerinin içerikleri 2.1.1 bölümünde verilmiştir. Katı besiyerleri izolasyon için 30 °C’de inkübasyona bırakılmış ve 10. günden itibaren farklı morfoloji gösteren koloniler taze besiyerlerine ekilmiştir.

İzolasyon amaçlı su örneklerinden yapılan doğrudan çizgi ekimlerin yanısıra çevresel su örneklerine yakın bir pH’da bir dilüsyon ortamı (pH 2,6) hazırlanıp her iki su örneği de 10^{-4} ’e kadar dilüe edilmiştir. Su örneklerinin dilüe edilmemiş ve 10^{-2} ile 10^{-4} dilüsyonlarından 100 µL, iFeo, FeSo ve Yeo katı besiyerlerine ekim yapılmış ve 2 hafta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda petrilerdeki koloniler stereo mikroskop altında sayılmıştır.

İzolatların hücre morfolojisi ve hareket yeteneklerinin belirlenmesinde faz kontrast mikroskop (Leitz Labolux, Zenicke kondansör ve objektif mercekli), koloni morfolojisinin belirlenmesinde ise Stereo mikroskop (Wild M3Z) kullanılmıştır.

Kültüre bağlı yöntemlerin uygulanmasına eş zamanlı olarak kültürden bağımsız yöntemler de eşlik etmiştir. Özellikle T–RFLP’den elde edilen bilgi ışığında çalışma süresince kullanılan besiyerleri dışında başka besiyerinin de kullanılması gereği ortaya çıkmıştır. Bu nedenle ayrıca FeTSB katı besiyeri de izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

ii) İzolatların moleküler identifikasyonu

Stereo mikroskop altında elde edilen saf izolatlardan tek koloni alınarak 20 µL lizis tamponu (%0,25 SDS, 0,05M NaOH) içinde resüspanse edilmiş, reaksiyon tüpü 95 °C'de 15 dakika bekletilmiş ve sonrasında 1:5 oranında ultra saf su ile dilüe edilmiştir. Bu lizise uğratılmış bakteri kolonisi, kurulacak PCR'da kalıp DNA olarak kullanılmıştır. PCR için kullanılan primerler 27F ve 1387R olmuştur. Amplifiye edilen DNA; tek koloniye ait DNA olduğu için PCR ürününün saflaştırılmasına ihtiyaç duyulmamıştır. DNA; HaeIII, CfoI ve AluI restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. PCR koşulları ile restriksiyon enzimleri ile kesim koşulları ve Terminal Restriksiyon Fragment Analizi ve değerlendirilmesi 3.2.2.2.3'de detaylı olarak anlatılmıştır. Bangor Asidofil Araştırma Grubu–Bangor Acidophile Research Team (BART)'ın T–RFLP veri tabanında elde edilen tek pike ait tek nükleotit sayısı değerlendirilmiş ve izolatın potansiyel olarak hangi tür olabileceği tahmin edilmiştir. Bu sonuçlar ışığında T–RFLP analizi ile farklı pik veren izolatlar moleküler identifikasyona tabi tutulmuşlardır. Moleküler identifikasyon için ise Beckman Coulter GenomaLab TM DTCS Quick Start Kiti kullanılmış ve kitin önerdiği şartlar doğrultusunda reaksiyon hazırlanmıştır.

PCR ürünlerinin saflaştırılmasından sonra 16S gen bölgesinin dizilenmesi amacıyla Beckman CEQ 8000 DNA dizi analiz cihazı kullanılmıştır. Dizileme işlem için Beckman Coulter GenomaLab TM DTCS Quick Start Kiti kullanılmıştır. Kitin önerdiği şartlar doğrultusunda reaksiyona 0.65 µL primer (27F, 1387R), 1.35 µL DEPC'li su, 2 µL kalıp ve 6 µL Beckman dizi analiz mixi eklenmiştir. PCR reaksiyon koşulları ise 30 döngü olacak şekilde 96 °C'de 20 s., 50 °C'de 20 s., 60 °C'de 4 dk.'dır.

Dizi analizi PCR sonrasında bağlanmamış primer ve dNTP'lerin reaksiyondan uzaklaştırılması için 4 µL stop solusyonu (3 M NaOAc pH:5.2, 100 mM EDTA pH:8, glikojen, DNase–RNase free su) reaksiyona eklenmiştir. Karışım üzerine PCR reaksiyonu kadar manyetik boncuk (Beckman Coulter Agencourt Clean SEQ) eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. 55 µL %73'lük isoproponal tüplere eklenmiş ve 10–15 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu esnada boncukların çökmemesi için karışım karıştırılmıştır. Süre bitiminde tüpler magnete yerleştirilmiş ve 3–5 dk bekleme süresi ardından, supernatant kısmı dikkatlice alınmış ve atılmıştır. Magnetteki tüplere 200 µL

%73'lük isoproponaldan eklenmiş ve 3 dk beklenmiştir. Süre bitiminde supernatant alınmış ve yine 200 µL %73'lük isoproponal magnetteki boncuk içeren tüplere ilave edilmiştir. 3 dk beklendikten sonra tüpler alınmış ve 10–20 dk oda sıcaklığında boncukların kuruması sağlanmıştır. Kuruyan boncuklara 40 µL Sample Loading Solution (SLS) eklenmiş ve boncukların tamamen çözünmesi sağlanmıştır. SLS ile çözünen örnekler tekrar magnete alınarak 5 dk beklenmiş ve 35 µL supernatant dizi analizi plağına koyulmuştur. Örneklerin cihazda analizi boyunca uçmaması için örneklerin üzerine mineral yağı damlatılmıştır. Ayrımın gerçekleştirilmesi için başka bir plağa seperasyon çözeltisi (GenomaLab™ Separation Çözelti), sistemim çalışması için gerekli olan seperasyon jeli (GenomaLab™ Separation Gel LPAI) ve hazırlanan örnekler Beckman CEQ 8000 DNA dizi analiz cihazı kapiller sistemine verilmiştir. İzolatların dizi analizi sonrası gen analizleri NCBI “National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov)” veritabanındaki BLAST (Altschul et al., 1997) programı ile gerçekleştirilmiştir. Böylece dizi analizinde elde edilen dizilerin filogenetik benzerlikleri ortaya koyulmuştur.

3.2.2.2. Kültürden bağımsız komünite analizleri

DNA ekstraksiyonu için su örnekleri membran filtrasyona tabi tutulmuş ve 0,45 µm por çapına sahip GTTP tipi filtreler doygunluğa ulaşana dek su örneği filtreden geçirilmiştir. Ekstraksiyon için de bu filtre örnekleri kullanılmıştır. Su örneklerinden DNA ekstraksiyonu Cifuentes et al. (2000) ve Nogales et al. (1999)'a göre bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir: Kısaca su örneği filtre edildikten sonra makasla küçük parçalar halinde kesilerek, 600 µL ekstraksiyon tamponunda (100 mM Tris–HCl pH:8, 100 mM EDTA) resüspanse edilmiş ve 6 µL lizozim (3 mg/mL) eklenerek 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında %10 SDS (60 µL), 9 µL proteinaz K (150 µg/mL) eklenmiş ve bu karışım 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda 120 µL 5 M NaCl eklenmiş ve ters–düz çevrilerek resüspanse edilmiştir. 90 µL CTAB (%10 CTAB, 0.7M NaCl) resüspanse karışıma eklenmiş ve 10 dakika 65°C'lik su banyosuna alınmıştır. Karışım su banyosundan alınarak 1–2 dakika sıvı azotta bekletilmiştir. Donan tüp yeniden 65°C'lik su banyosunda bekletilerek çözünmesi sağlanmıştır ve sonra yine sıvı azot işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem en

az 3 kez tekrarlandıktan sonra 900 µL Fenol:Kloroform:İsoamilalkol (25:24:1) karışıma eklenmiş ve 5 dakika 4 °C’de 13.000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstteki sıvı faz alınmış ve alınan miktar kadar Fenol:Kloroform:İsoamilalkol (25:24:1) sıvı faza eklenmiştir. Bu işlem protein ara fazı indirgenene kadar devam ettirilmiştir. Sonrasında 80 µL sodyum asetat (3M pH:4.8), 480 µL isopropanol, 8 µL MgCl₂ (1M) eklenmiş ve 30 dakika 13.000 rpm’de 4°C’de santrifüj edilmiştir. Supernatant atıldıktan sonra -20 °C’de bekletilmiş olan %70’lik alkolden 100 µL pelet üzerine eklenmiştir. 15 dakika 13.000 rpm’de 4 °C’de santrifüj edilmiştir. Alkol pipet ile uzaklaştırıldıktan ve pelet oda sıcaklığında kurutulduktan sonra 50 µL DEPC ile pelet resüspanse edilmiştir (Cifuentes et al., 1999; Nogales et al., 2000). DNA varlığını kontrol etmek için 2 µL örnek %0.8’lik agaroz jele yüklenmiş ve 1X TAE tamponda yürütülmüştür. İncelenecek nükleik asitin tipine göre jellerde 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) ya da Hind III ile kesilmiş Lambda DNA fragmentleri marker olarak kullanılmıştır. Çukurlara 5 µL örnek ve 1 µL jel yükleme boyası olacak şekilde yükleme yapılmıştır. Tüm jellerde DNA’nın gözlenebilmesi amacıyla jeller, 0.5 µg/µL konsantrasyonlu etidyum bromid solusyonları içinde 15 dakika bekletildikten sonra 10 dakika kadar da distile su içerisinde tutulmuşlar ve 312 nm dalga boyunda UV veren transilluminatörler yardımıyla gözlenmişlerdir. Jel fotoğrafları Uvitec Jel Dökümantasyon sistemi ile ya da dijital Kodak kamera ile (Digi Doc) elde edilmiştir. DNA ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C’de saklanmıştır.

DNA ekstraksiyonu için alternatif bir yöntem daha kullanılmıştır. Bunun için su örneklerinin filtreleri küçük parçalar halinde kesilmiş ve MOBIO Toprak İzolasyon kitinin tüplerine konulmuştur. DNA izolasyonu “UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit” ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapılmıştır. Bu kitin prensibi, örneğin homojenizasyonu, mekanik ve fiziksel yöntemlerle hücrelerin lizisi, tüm DNA’ların silika membran tarafından tutunması ve DNA’ların yıkanarak membrandan elüsyonuna dayanmaktadır (<http://www.mobio.com/images/custom/file/protocol/12224>, MoBio Laboratories, ABD).

i) Fluoresan in situ hibridizasyon (FISH)

FISH; Archaea, Bacteria domainlerine özgü ve *Thiobacillus* sp. ile *Leptospirillum* sp. cinsine spesifik problarla gerçekleştirilmiştir. Problarla ilgili ayrıntılı bilgi 2.1.3 kısmında verilmiştir. Bunun için fiksasyon amacıyla, 1 mL, 3 mL, 5 mL ve 10 mL su örneği %4 Formaldehit (Fluka) içeren minimal Mackintosh ortamında 4 °C'de 1 gece fikse edilmiştir (Mackintosh, 1978). Mackintosh ortamının kullanılmasının nedeni, düşük pH'da çevresel su örneğinde bulunabilecek ağır metallerin çözünebilirliğini sağlamaktır. Sonrasında 10 mL Mackintosh çözeltisi ardından da filtrenin yıkanması amacı ile 10 mL 1X steril PBS eklenerek karışım 0,2 µm por çaplı GTTP Isopore (Millipore) filtreden geçirilmiştir. Filtreler yıkandıktan sonra hibridizasyon işlemine kadar muhafaza edilmek üzere -20 °C'ye konulmuştur. Fiksasyon işleminin sonrasında hibridizasyon için filtrenin küçük bir kısmı kullanılmıştır. Hibridizasyon tamponunun 18 µL'sine ve 2 µL prob eklenerek elde edilen karışım filtre üzerine pipetlenmiştir. Geriye kalan hibridizasyon tamponu hibridize edilecek filtrelerin yerleştirildiği falkon tüplerinin içini nemli tutmak ve formamid buharı oluşturmak amacı ile kullanılmıştır. Lam üzerinde hibridizasyon çözeltisi içeren filtre parçaları yatay şekilde önceden 46 °C'ye getirilmiş hibridizasyon fırınında (Biometra OV3) 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında filtreler önceden 48 °C'de ısıtılmış yıkama solusyonu içerisine alınarak 15 dakika 48 °C bekletilmiştir. Bu süre sonrasında filtreler kurutma kağıdı üzerine alınarak havada kurumaya bırakılmıştır (Amann ve ark. 1995; Anton ve ark. 1999). AMD örneklerindeki toplam mikroorganizma sayısını belirlemek için ortamdaki tüm DNA'ları boyama özelliğindeki DAPI boyaması uygulanmıştır. DAPI boyaması için filtre parçasına 25 µL DAPI boyası pipetlenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Aynı filtre parçası önce saf alkol ile sonrasında mQ su ile 10 saniye yıkanmıştır. Yıkanmış filtrenin havada kurumaya sağlandıktan sonra, lam üzerindeki filtre üzerine citifluor damlatılmış ve lamelle kapatılmıştır. Preparatın incelenmesi epifluoresan mikroskopta (Leica DM6000B) 100X'lik objektifte gerçekleştirilmiştir (Amann ve ark. 1995; Anton ve ark. 1999; Aman ve ark. 2000).

ii) Denatüre edici gradient jel elektroforezi (DGGE)

DGGE analizi için 16S rRNA geninin amplifikasyonu için “GC clamp” adı verilen yaklaşık 40 nükleotidlik bir diziyi 5’ uçlarında içeren özel primerler kullanılmıştır (Muyzer ve ark., 1993). Archaeal 16S rRNA geni amplifikasyonları için 344F–GC ve 907R olarak adlandırılmış olan primerler, Bacteria örnekleri için de 341F–GC ve 907R primerleri kullanılmıştır. Primerlerle ilgili ayrıntılı bilgi 2.1.3 kısmında verilmiştir. Her bir reaksiyonda kalıp DNA olarak filtrelerden yapılan DNA ekstraksiyonu sonucu elde edilen nükleik asitler hem kendileri hem de 10^{-1} dilüsyonları denenerak kullanılmıştır. Archaea ve Bacteria spesifik primerlerle filtrelerden elde edilmiş toplam çevresel DNA’nın kalıp olarak kullanıldığı amplifikasyon reaksiyonlarıyla elde edilen ürünlerin analizi için agaroz jelde görüntüleme yapılmıştır. Saflaştırma için Promega Wizard SV gel and PCR Clean-up system saflaştırma kiti kullanılmıştır. Bunun için pozitif PCR tüpleri büyük taraklı agaroz jelle yüklenerek 95 V’da 50 dakika yürütülmüş daha sonra da UV ışığı altında jeller kesilmiş ve Ependorfteki örnekler için her 10 mg jel için 10 µL membran binding solution eklenmiş tüp hafifçe vorteksenerek karıştırıldıktan sonra 60 °C’de 5–15 dakika (agaroz tamamen eriyinceye kadar) su banyosunda inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda eriyen jel içeriği kolonlu toplama tüpüne transfer edilmiş ve “toplama tüpü” içine yerleştirilmiş ve saflaştırma protokolü takip edilmiştir. En sonunda 50 µL nükleaz içermeyen su mini kolona eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 16000xg’de 1 dakika santrifüj edilmiştir, mini kolonlar atılarak saflaştırılmış olan örnek –20 °C’de muhafaza edilmiştir. Bu ürünler yeterince konsantre edilmiş ve yapılacak olan poliakrilamid jelle yüklemeye hazır hale getirilmiştir.

DGGE işlemi için Ingeny firmasının IPU–S modeli DGGE sistemi kullanılmıştır. Elektroforez sistemi 1 mm’lik poliakrilamid jellerin oluşumuna izin veren “spacer” lar kullanılarak uygun şekilde hazırlanmış ve sızdırmaz hale getirilmiştir. Sonrasında %0’lık ve %80’lik DGGE stok solüsyonları hazırlanmış ve gradient oluşturucu düzenek yardımıyla solüsyonların gradient jeli oluşturacak şekilde karıştırılması sağlanmıştır. Jelin artan konsantrasyonda üre ve formamid gradientine sahip olması sağlanmıştır. Denatüre edici gradient jellerinde denatürant konsantrasyonu

%40'dan %70'e kadar artacak şekilde ayarlanmıştır. Polimerize edici ajanlar da eklendikten sonra sistemde alt kısımda yer alan gradient jel ve bunun üzerine denatürant içermeyen yükleme jeli dökülmüş ve çukur oluşumunu sağlayan tarak bu jel içine yerleştirilerek polimerizasyon için en az 4 saat bekletilmiştir. Polimerizasyon sonrasında elektroforez tankı 1X TAE tamponu ile doldurulmuştur. Daha önceden Low mass DNA ladder marker kullanılarak DGGE PCR ürünlerindeki DNA konsantrasyonu belirlenmiş 500 ng'a karşılık gelecek miktarda örnek, 4 µL jel yükleme boyası ile karıştırılarak çukurlara yüklenmiş ve tampon sıcaklığı 60 °C'ye ulaştığında sisteme 5 V/cm akım 1 gece boyunca uygulanmıştır. Elektroforez sonrasında poliakrilamid jel etidyum bromür solüsyonu (1 µg/mL) ile 1.5 saat boyandıktan sonra yaklaşık 2 saat distile su içine yıkanmış ve transilluminatörde UV ışığı ile gözlenmiştir. Jellerde farklı konumlardaki bantlar UV ışığı altında steril bisturi yardımıyla jelden kesilerek steril ependorf tüpleri içine alınmışlardır. Bunların üzerine 40 µL mQ su eklenerek 1 gece 4 °C'de inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon sonrası elüt edilmiş olan DNA, DGGE primerleri ile tekrar amplifiye edilmesi için kalıp olarak kullanılmıştır.

iii) Terminal restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi

Her iki AMD su örneğinde bulunan prokaryotik komünitenin anlaşılması için gerçekleştirilen kültürden bağımsız bu yöntemde çevresel örneklerden ekstrakte edilen toplam DNA uygun primerler kullanılarak PCR reaksiyonu ile çoğaltılmıştır. Bakteriler için floresan işaretli 27F ileri ve 1387R geri primer, arkeler için ise floresan işaretli 20F ileri ve 915R geri primer kullanılmıştır. Archaea ve Bacteria üyelerinin 16S rRNA genlerinin amplifikasyonları için uygulanan reaksiyon bileşenleri ve şartları aşağıdaki gibidir (Okibe et al., 2003).

PCR bileşenleri

5X renksiz tampon	4 µL
dNTPs (2 mM)	2 µL
MgCl ₂	2 µL
İleri primer (bakterisi için 27F, arke için 20F)	0,4 µL

Geri primer (bakteri için 1387R, arke için 915R)	0,4 µL
DMSO	0,4 µL
GoTaq Hot Start enzim	0,2 µL
Ultra saf su	9,6 µL
Kalıp DNA	1 µL

PCR koşulları (16S PCR bakteri)

95 °C 5 dakika (Denatürasyon),

95 °C 30 saniye

55 °C 1 dakika

72 °C 1 dakika 30 saniye

Bu şekilde 30 döngü,

72 °C 10 dakika

4 °C Süresiz

PCR koşulları (16S PCR arke)

95 °C 5 dakika (Denatürasyon),

95 °C 30 saniye

62 °C 30 saniye

72 °C 1 dakika 30 saniye

Bu şekilde 35 döngü,

72 °C 10 dakika

4 °C Süresiz

Tüm çalışmalar boyunca hem pozitif hem de negatif kontrol reaksiyonları hazırlanmıştır. *Acidiphilium acidiphilium* DNA'sı Eubacteria için, *Ferroplasma acidiphilium* DNA'sı Archaea için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif kontroller DNA içermeyen reaksiyon karışımları ile oluşturulmuştur. Elde edilen PCR ürünleri %0.7'lik agaroz jellerde (0.5X TBE çözeltisinde) gözlenmişlerdir (Anton ve ark. 1999). Elde edilen PCR ürünleri SureClean çözeltisi kullanılarak saflaştırılmış ve konsantre edilmiştir. Bakteriyel ve arkeal PCR ürünleri 3 ayrı restriksiyon endonükleaz enzimi (HaeIII, CfoI ve AluI) ile kesilmiştir (Marsh, 1999). Reaksiyon koşullar aşağıdaki gibidir:

HaeIII (CfoI veya AluI)	1 µL
Tampon C (HaeIII için), tampon B (CfoI ve AluI için)	1 µL
Bovin serum albümin (1/10)	1 µL
Saflaştırılmış DNA	1 µL
Ultra saf su	6 µL

Toplam hacmi 10 µL olan reaksiyon tüpleri 37 °C'de 1 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmiş ürünlerin 1 µL'si 29 µL örnek yükleme çözeltisi ile birlikte 96 kuyucuklu plate'e hava kabarcığı oluşturmadan konulmuş ve karıştırılmıştır. Örnek yükleme çözeltisi, florokrom D1 ile etiketlenmiş 600 baz çifti boyutunda markır (Beckman Coulter) içermektedir. Bu örneklerin üzeri mineral yağla kaplanmış ve diğer 96 kuyucuklu plate'e de seperasyon tamponu konulmuştur. Elektroforez için hazırlanan terminal restriksiyon fragmentleri Beckman Coulter CEQ8000 Genetik Analiz Sistemi kullanılarak kapiller elektroforez ile ayrıştırılmıştır. Fragment analizi sonucunda oluşan fragment uzunlukları Beckman Coulter CEQ8000 yazılımında (CEQ 8000 Genetic Analysis System version 9.0.25 Fragment Version 2.3.4) değerlendirilmiştir. PCR ürünlerinin enzimatik kesimden elde edilen herbir kesilmiş parçası, mikrobiyal toplulukta tek bir popülasyonu göstermektedir.

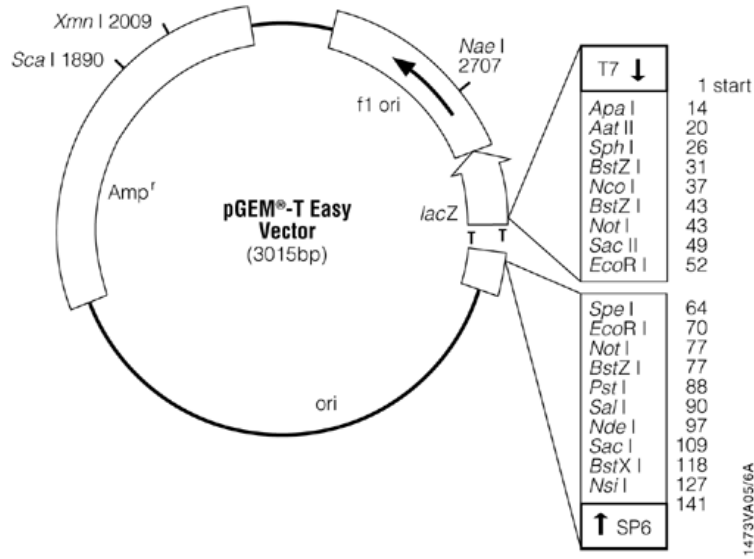
Elektroferogram olarak bilinen T–RFLP profili, kapiller elektroforez çıktısı yoğunluk piklerini göstermektedir. Elektroferogramda X aksisi fragmentlerin boyutunu, Y aksisi ise her fragmentin floresan yoğunluğunu göstermektedir. T–RFLP profilinde her pik, orijinal örnekte bir genetik varyantı temsil etmektedir, pikin yüksekliği ya da alanı spesifik komünitedeki rölatif bolluğu göstermektedir. T–RF pikleri ile ilgili veriler Microsoft Excel programına aktarılmış ve bu programda istatistiksel analizler yapmak suretiyle gerekli hesaplamalar sonrasında komüniteyi oluşturan taksonlar BART’ın T–RFLP veri tabanı kullanılarak değerlendirilmiştir.

iv) 16S klonlama deneyleri

Saflaştırılmış PCR ürünlerinin pGEM–T vektör sistem II (Promega)’e ligasyonu kitte belirtilen talimatlara göre yapılmıştır. pGEM–T easy vektörün haritası Şekil 3.7’de verilmiştir. Buna göre 10 µL toplam hacme; 1 µL rapid ligasyon tamponu (2X), 1 µL pGEM T vektör (5ng/µL), ve 1 µL T4 DNA ligaz (0.3U/ µL) eklenmiştir. Kontrol reaksiyonu kontrol DNA (0.8ng/µL) içermiştir. Eklenecek DNA miktarı aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanmıştır (<http://www.promega.com>). Bu formülden yola çıkarak DNA:insert oranının 3:1 olması sağlanmıştır.

$$\frac{\text{Vektör miktarı (ng)} \times \text{DNA fragmentinin büyüklüğü(kb)}}{\text{Vektörün Büyüklüğü(kb)}} \times \text{DNA} : \text{Vektör} = \text{DNA miktarı (ng/ µL)}$$

Ependorflara koyulan ligasyon reaksiyonları +4 °C’de bir gece inkubasyona bırakılmıştır. Ligasyon etkinliğinin değerlendirilmesi için kitte sağlanan kontrol DNA fragmenti (4ng/ µL) 1 µL pGEM–T kullanılarak aynı şartlarda ligasyona bırakılmıştır. Aynı zamanda negatif kontrol olarak DNA içermeyen bir ligasyon reaksiyonu da ortamda denenmiştir (<http://www.promega.com>).



Şekil 3.5. pGEM–T easy vektör haritası

İnkübasyonu takiben kompetent hücelere (*E.coli* DH5α suşu) transformasyon gerçekleştirilmiştir. Transformasyon pGEM–T vektör sistem II’de belirtilen prosedür modifiye edilerek yapılmıştır. Belirtilen prosedüre göre işlem basamakları şöyledir: Her ligasyon reaksiyonu için 2 adet ampisilinli LB Agar petri hazırlanmıştır. LB besiyeri otoklavla steril edildikten sonra 50 °C civarına kadar soğuması beklendikten sonra 100 mg/ml ampisilin stoğundan, son konsantrasyonu 100 µg/mL olacak şekilde eklenmiştir. Köpürmeyecek şekilde karıştırıldıktan sonra bek alevi yanında petri kaplarına dökülerek polimerleşmesi beklenmiştir. Ampisilinli agar petrilere bek alevi yanında X–Gal (%4 ve 0,1M) stok solusyonundan 20 µL konularak steril bir drigalski spatülü yardımıyla yayılmıştır. Kompetan hüceler –80 °C’den çıkarılarak buza koyulmuş ve 5 dakika hücrelerin çözünmesi beklenmiştir. Transformasyon tüpüne 50–100ng plazmit DNA olacak şekilde 5 µL ligasyon reaksiyonundan konulmuştur. Kompetan hücrelerden de 200 µL eklenmiştir. Yavaş bir pipetaj ile tüpün içindekilerin karışması sağlandıktan sonra 30 dakika buzda inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler 42 °C’ye ayarlanmış su banyosunda 45–50 saniye çalkalanmadan tutularak ısı şokuna tabi tutulduktan sonra tekrar 2 dakika buzda bekletilmiştir. Bu sürenin bitiminde, önceden 37 °C’ye ılıtılmış olan LB besiyerinden 400 µL eklenmiştir. 1 saat 37 °C’de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda transformasyon kültürünün 100 µL’si petrilere yayılmıştır. 15–20 dakika petrilere kültürü emmesi beklenmiştir. Daha sonra

petriler 37 °C'deki inkübatörde hücrelerin büyümesi için 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 100 kadar beyaz renkli koloni yeni bir LB agar besiyerine ekilmiş, inkübasyondan sonra 4 °C'de beklenip mavi renge dönüşüp dönüşmediği takip edilmiştir (<http://www.promega.com>). Sonra bu beyaz kolonilerden rasgele 10 tanesi seçilip 27F ve 1387R primer setleri ile koloni PCR reaksiyonu kurulmuştur. Klonlardaki 16S rRNA geni için elde edilen PCR ürünlerinin restriksiyon analizleri için MspI ve HaeIII enzimleri kullanılmıştır. Kesim reaksiyon bileşenleri; 7 µL PCR ürünü; 0,5 µL HaeIII; 0,5 µL MspI; 1 µL Tampon C; 1 µL BSA olmuştur. Kesim reaksiyonu 37 °C'de 2 saat süresince sürdürülmüştür. TBE tamponu ile hazırlanan yüksek dansiteli %2'lik agaroz jele kesim ürünleri yüklenmiş, marker olarak 1 kb ve 100 bp marker'ları kullanılmış, 60 mV'ta 3 saat yürütülmüştür. Elde edilen farklı paternlere sahip klonlar ampisilin içeren LB sıvı ortamına transfer edilmiş ve 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası bu sıvı kültürlerden Strataprep plazmid izolasyon kitinin yönergeleri doğrultusunda plazmid ekstraksiyonu yapılmıştır (<http://www.chem-agilent.com/pdf/strata/400761.pdf>). Bu plazmidler dizi analizine gönderilmiştir, dizi analizinde kullanılan primer setleri T7F ve SP6R olmuştur.

3.2.3. Biyodesülfürizasyon deneyleri

Tez çalışması kapsamında kullanılan kömür örneği üzerinde kömür petrografisi, XRD toz difraktogram çekimleri gerçekleştirilmiş ve ICP-OES ve XRF (Thermo-ARL) ile element içerikleri belirlenmiştir. ICP-OES ile gerçekleştirilen esas ve eser element analizi de önem arz etmektedir. Numuneler 105 °C'de kurutulmuştur. Numuneler 550 °C'de külleştirilmiş ve TS ISO 11466'ya göre çözündürülerek ICP-OES cihazına verilmiştir. Kömür örneğinin bazı major element (Na_2O , MgO , Al_2O_3 , SiO_2 , K_2O , P_2O_5 , CaO , TiO_2 , SO_3 , Fe_2O_3 , MnO) ve minör elementleri (As, Ba, Cr, Cu, Mo, Pb, Rb, Sr, Th, U, V, Y, Zn) değerlendirilmiştir.

Kömürde bulunan eser elementler, kömürleşme sırasında farklı aşamalarda kömürün bünyesine girebilmektedir. Eser elementlerin çoğu kömürdeki minerallerle hem de organik madde ile birliktelik gösterebilmektedir (Finkelman, 1994). Özellikle, kömürde bulunan 25 adet element, çevre ve sağlık açısından duyarlı elementler olarak

belirlenmektedir (Finkelman and Gross, 1999). Bu elementlerden bazıları olan Sb, As, Be, Hg, F, Cd, Cl, Co, Cr, Pb, Mn, Ni, Se ve U, 1990 Amerika Temiz Hava Kanununa göre, potansiyel tehlikeli hava kirleticiler olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla bu analiz de desülfürizasyona uğratılan kömürün başlangıçtaki kalitesini belirlemeye yöneliktir.

Bu kömür örneğinin XRD toz ve kil difraktogramları yardımı ile mineralleri tanımlanmıştır. Kömür petrografisi çalışmaları; kömürü oluşturan bileşenlerin tanımlanması, kömür oluşumunun geliştiği ortamın koşullarının ve kömür kullanım alanlarının (örneğin koklaştırmada ve sıvılaştırmada) tanımlanması hakkında önemli bilgiler vermektedir. Ayrıca petrografik veriler, yeraltı maden ocaklarında kömür damarlarının korelasyonunda kullanılmaktadır. (Karayığit, 1989).

Petrografik analiz için kömür örneğinin parlatma briketi hazırlanmıştır. Bu analizlerde kullanılan kömürün partikül boyutu +38–106 μm 'dir. Örnek, epofiks ve sertleştirici kullanılarak parlatma briketleri hazırlanmış ve bu briketler M.T.A.'da bulunan parlatma cihazında, uygulanan yöntemler kullanılarak parlatılmıştır.

Gerçekleştirilecek optimizasyonda diğer tüm parametreler (pH, inokulum miktarı, pulp yoğunluğu, kömür partikül boyutu, inkübasyon süresi) aynı anda birbirleri ile kombine edilerek deneysel tasarım sayesinde ortogonal array deney seti oluşturularak çalışılmıştır

Gerçekleştirilecek optimizasyona uygun ortogonal dizinler, kontrol edilebilen faktörlerin serbestlik derecelerinin toplamına göre seçilmiştir. Her faktörün serbestlik derecesi, faktör seviye sayısının bir eksigidir. Bu durumda toplam serbestlik derecesi, Çizelge 3.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3 Toplam serbestlik derecesi

Simge	Faktörler	Serbestlik derecesi
A	pH	2-1=1
B	Kömür partikül boyutu	2-1=1
C	Pulp yoğunluğu	2-1=1
D	İnokulum miktarı	2-1=1
E	İnkübasyon süresi	2-1=1
	Toplam serbestlik derecesi	5

Toplam serbestlik derecesi en fazla seçilecek ortogonal dizinin deneme sayısından 1 eksik olması ya da o değere eşit olması gerekir. Bu durumda “ $V_t \leq a-1$ ” eşitliğinden deneme sayısı 5 veya 5’den büyük en küçük değere sahip olan ortogonal dizin seçilmiştir. Bütün seviyeleri 4 olan ve deneme sayısı 5’den büyük, en küçük ortogonal dizin $L_{16}(4^5)$ olmuştur. Optimizasyona uygun ortogonal dizin seçildikten sonra, faktörler arasında herhangi bir etkileşim olmadığından dolayı bütün faktörler herhangi bir sütuna atanmışlardır. Taguchi yaklaşımı ile optimum seviyelerin tahmin edilmesinden sonra, ANOVA analizleri yapılarak sonuç üzerinde etkisi olan parametrelerin yüzde dağılımları belirlenmiştir. Optimizasyon işleminin son adımı ise doğrulama deneylerinin yapılması ve optimizasyon işleminin doğruluğunun test edilmesi olmuştur.

Oluşturulan deney setinde yer alan her bir denemenin toplam kükürt giderim sonuçlarına bakılmış ve değerlendirilmiştir (Çizelge 3.4). Hazırlanan besiyerlerine öğütülmüş kömür ilave edilerek inokulasyonlar gerçekleştirilip çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kaba filtrasyon işlemi ile kömürler alınarak %10 HCl çözeltisi ile 15 dakika yıkanarak ortamda oluşabilecek jarositlerden uzaklaştırılması sağlanmıştır. Daha sonra da distile su ile yıkanıp 45 °C’de kurumaya bırakılıp toplam kükürt miktarları ölçülmüştür. Toplam kükürt analizleri Eltra CS580 marka kükürt analizörü ile yapılmıştır. ASTM 4239 standardı dikkate alınarak infrared absorpsiyon belirleme süreci ile yüksek sıcaklıkta yakma yöntemine göre toplam kükürt oranları belirlenmiştir. Bu sonuçlar, çalışılan bakteri biyokütlesi ile muamele edilmemiş olan kömürün kükürt oranı baz alınarak karşılaştırılmış ve kükürt giderimi saptanmıştır. Kükürt ölçümü yapılmadan önce cihaz sertifikalı referans maddelerle kalibre edilmiştir. bu yöntemde kömür oksijen altında 1350 °C’de yakılmış ve kömürdeki kükürt SO_2 ’ye dönüştürülmüştür. Nem ve partiküller magnezyum perklorat ile doldurulmuş tuzaklar aracılığı ile uzaklaştırılmıştır. SO_2 ’nin bulunduğu bir hücreden geçirilen gaz akışı IR absorpsiyon belirleyicisi ile ölçülmüştür. Belirlenen SO_2 ’den de toplam kükürt tespit edilmiştir (ASTM, 2004).

Çizelge 3.4. Biyodesülfürizasyon optimizasyon çalışmalarında kullanılan deney setleri

Deney no	pH (A)	Kömür partikül boyutu (μm) (B)	İnokulum miktarı (mL)(C)	Pulp yoğunluğu (%) (D)	İnkübasyon süresi (hafta) (E)
1	2	-38	1	%1	1
2	2	-106+38	2	%2	2
3	2	-250+106	3	%5	3
4	2	-500+250	5	%10	4
5	2,5	-38	2	%5	4
6	2,5	-106+38	1	%10	3
7	2,5	-250+106	5	%1	2
8	2,5	-500+250	3	%2	1
9	3	-38	3	%10	2
10	3	-106+38	5	%5	1
11	3	-250+106	1	%2	4
12	3	-500+250	2	%1	3
13	3,5	-38	5	%2	3
14	3,5	-106+38	3	%1	4
15	3,5	-250+106	2	%10	1
16	3,5	-500+250	1	%5	2

3.2.3.1. Seçilen izolatın farklı kömür örnekleri kullanılarak biyodesülfürizasyon etkinliğinin belirlenmesi

Elde edilen izolatın ülkemizde bulunan düşük kaliteli linyit kömürleri başta olmak üzere farklı örnekler üzerindeki etkinliğinin belirlenmesi gelecekte potansiyel uygulamalar açısından önemli olacaktır. Bu düşünce ile, etkin izolatın, kükürt içeriği ve mineralojik özellikleri farklı olan kömürlerde, kükürt giderimine etkisi araştırılmıştır. Bunlar Artvin'den antrasit örneği, Çan linyiti, Mihalıçık'ın farklı bir rezervinden

alınan kömür, Tunçbilek linyit kömürü, yüksek pirit ve kalori değerine sahip Gediz linyiti olmuştur. Buralardan sağlanan kömürler etkin izolat ile muamele edilmiştir. Bu esnada erlendeki tampon miktarı 100 mL, kömür miktarı 1 g, ortam sıcaklığı 30 °C, ortam pH'sı 2.5, kömür partikül boyutu +250–500 µm, inkübasyon süresi 15 gün olarak sabit tutulmuştur. Burada kullanılan koşullar 3.2.3'de belirtilen deneysel çalışmalardan elde edilen koşullardır. İnkübasyon sonucunda kömürler yıkanıp toplam kükürt miktarları 3.2.3.'te belirtildiği biçimde ölçülmüştür.

3.2.4. Etkin izolatın metabolik özellikleri ile desülfürizasyon sürecinin ilişkilendirilmesi

3.2.4.1. Kömürün biyodesülfürizasyon öncesi ve sonrası fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR) spektroskopisi

Kömürde desülfürizasyon sonrası oluşabilecek değişimleri gözlemlemek amacı ile FTIR analizi yapılmıştır. Kömür örnekleri potasyum bromür (KBr) ile %1 oranında karıştırılarak (1 mg kuru kömür örneği ve 100 mg KBr) preslenmiş ve disk haline getirilmiştir. Diskin FTIR spektrumu 400–4000 cm⁻¹ bölgesinde alınmıştır. FTIR spektroskopisi Bruker Tensor 27 kullanılarak yapılmıştır.

3.2.4.2. SEM analizleri

Kömürde desülfürizasyon sonrası partiküllerin yüzeyinde oluşabilecek değişimleri gözlemlemek amacı ile taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi JEOL 5600 LV ile yapılmıştır.

3.2.4.3. Desülfürizasyonda sürecinde Fe⁺² oksidasyonunun belirlenmesi

Desülfürizasyon sürecinde görev alan mikroorganizmaların sahip oldukları metabolik özellikleri gereği Fe⁺² oksidasyonu yapabilmeleri de beklenmektedir. Bu nedenle desülfürizasyon sürecinde kükürt oksidasyonunun yanı sıra Fe⁺² oksidasyonu

da takip edilmiştir. Fe^{+2} oksidasyonu iki yolla izlenmiştir. Bunlar: dönüşümlü voltametri ve ferrozin yöntemidir.

i) Ferrozin Yöntemi

Etkin izolat ile Mihaliçcık linyit kömürünün muamelesi sonrası görülen değişiklikler ferrozin yöntemi ile gösterilmiştir. Stookey tarafından 1970 yılında, iki değerlikli demir ile menekşe mor renkte kararlı kompleksler oluşturan ferrozin, Fe^{+2} analizlerinde kullanılmaktadır. Çözelti içerisinde Fe^{+3} de bulunursa ferrozinle etkileşime girip renkli kompleksler oluşturabilir. İndirgeyici kimyasal ve bir tampon çözelti yardımıyla Fe^{+3} 'ün Fe^{+2} 'ye indirgenmesi ve çözeltide Fe^{+2} – ferrozin kompleksinin artırılması söz konusudur (Viollier et al., 2000). Ferrozin, Fe^{+2} tayinlerinde, nanomolar konsantrasyonlarda bile doğru ve hassas sonuçlar vermektedir (King et al., 1991). Fe^{+2} ölçümleri için kullanılması uygun görülen ferrozin 562 nm dalga boyundaki ışıkta maksimum absorpsiyon değeri vermektedir. İki değerlikli demir ile ferrozin kompleks oluşturduğunda menekşe mor renkli bir çözelti elde edilir (Viollier et al., 2000). Ferrozin Fe^{+2} ile birleşerek 562 nm dalga boyunda en yüksek absorpsiyon vermektedir. Bu kimyasal, Fe^{+2} 'ye has bir kimyasaldır. İndirgeyici bir kimyasal kullanılmasıyla çözeltideki toplam demir miktarının da bulunmasına katkısı olmaktadır (Sarradin et al., 2005). Bu yöntem kapsamında kullanılan çözeltileri, 0,01 M ferrozin çözeltisi (0,1 M amonyum asetat çözeltisi ile hazırlanmış), tampon çözeltisi olarak 5M amonyum asetat (%28–30'luk amonyum hidroksit ile pH 9.5'a ayarlanmış), indirgeyici ajan olarak 1,4M hidroksilamin hidroklorürdür (2 M HCl'de çözülmüş). Örnek içindeki Fe^{+2} miktarına bağlı olarak karışım mor bir renk almaktadır. Karışımdan geçen ışık şiddeti Fe^{+2} miktarına bağlı olarak düşmekte, bunun sonucunda da fotodiyottan elde edilen elektrik sinyali azalmaktadır. Bunun için cihaz ile ölçüme başlamadan önce, konsantrasyonu bilinen Fe^{+2} çözeltileri hazırlanmıştır. Standart çözelti olarak 100 mg Fe^{+2} /L 0,5 M HCl'de çözülmüş, belirli oranlarda dilüsyon yapılarak (0; 2,5; 5,0; 7,5 ve 10 mg Fe^{+2} /L) hazırlanmış ve standart eğri hazırlanmıştır. İlk olarak içerisinde Fe^{+2} olmayan kör ile ölçüm yapılarak daha sonra artan Fe^{+2} konsantrasyonları içeren çözeltiler hazırlanıp ölçüme devam edilmiştir. Standart kalibrasyon çözeltileri kullanılarak elde edilen kalibrasyon grafiği üzerinde, ölçülen ışık

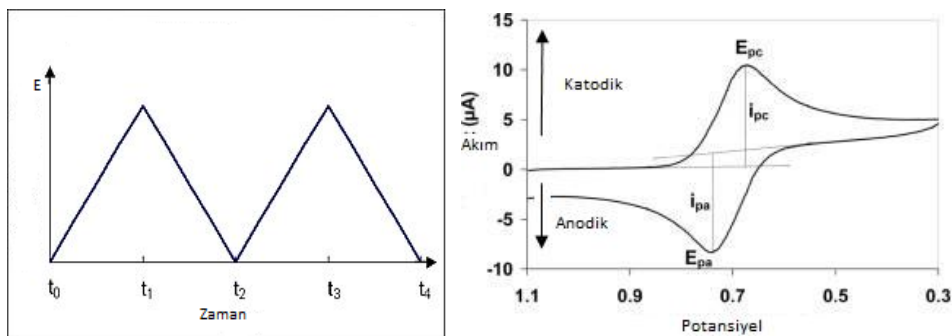
şiddetlerinden yararlanılarak desülfürizasyonda kullanılan besiyerinin bakteriyel işlem öncesi ve sonrası ortamda bulunan toplam demir ve Fe^{+2} miktarları tespit edilmiştir.

Toplam demir ölçüm yönteminde, asidifiye örnek en az bir gece bekletilmiştir. Spektrofotometre küvetine öncelikle 750 μ L ultra saf ya da deiyonize su, 100 μ L örnek (ya da standart), 150 μ L indirgeyici ajan konulmuş ve 30 dakika beklenmiştir. Sonrasında 100 μ L ferrozin ve 150 μ L tampon çözeltilen konulmuştur. 2–3 dakika beklendikten sonra spektrofotometrede 562 nm’de ölçüm yapılmıştır.

Fe^{+2} ölçüm yönteminde ise, 750 μ L ultra saf ya da deiyonize su, 100 μ L ferrozin ve 150 μ L tampon çözelti karıştırılmış ve bu karışımdan 1 mL alınarak 100 μ L örnek (Ya da standart) eklenmiş, 2–3 dakika beklendikten sonra 562 nm’de ölçülmüştür.

ii) Desülfürizasyon kültüründe dönüşümlü voltametri ölçümleri

Bu yöntemde durağan bir çalışma elektrodu ile karşılaştırma elektrodu arasında doğrusal olarak değişen bir gerilim uygulanarak çalışma elektrodu ile karşıt elektrot arasında oluşan akım kaydedilmiştir. Dönüşümlü voltametride çalışma elektroduna uygulanan gerilim programı elde edilen cevap eğrileri Şekil 3.7’de gösterilmiştir (Şahin, 2000; Nicholson, 1964).



Şekil 3.6 a) Dönüşümlü voltametride çalışma elektroduna uygulanan gerilim programı, b) bu gerilim taramasına karşı gözlenen akım değişimi (Hür, 2005).

Çalışma elektroduna uygulanan gerilim, elektroaktif maddenin yükseltgenme (veya indirgenme) gerilimine ulaşınca elektrot yüzeyini çevreleyen difüzyon

tabakasındaki maddenin çok hızlı tüketilmesi akımda hızlı bir artışa neden olur. Bunun sonucunda çözültiden elektrot yüzeyine doğru difüzyonla kütle aktarımı başlar. Difüzyonla kütle aktarım hızı, elektron aktarım hızı ile yarışmadığından tepe noktasından sonra akımda üstel bir düşüş gözlenir ve bir pik elde edilir (Şekil 3.7b).

Gerilim taraması ters yöne çevrildiğinde ise ileri yöndeki gerilim taraması sırasında oluşan ürününün yeniden yükseltgenmesi veya indirgenmesi nedeni ile bir geri pik gözlenir. Dönüşümlü voltametri de cevabın pik olarak gözlenmesi, durağan elektrot kullanılmasının bir sonucudur. İleri ve geri yöndeki tarama ardarda durmadan tekrarlandığında çok döngülü dönüşümlü voltamogramlar elde edilir. Dönüşümlü voltamogramların ayrıntılı incelenmesi ile bir sistemin hangi gerilimlerde ve kaç adımda indirgenip yükseltgenebileceğini, elektrokimyasal olarak tersinir olup olmadığını anlamak mümkündür (Hür, 2005). Elektrokimyasal sentez ve kapasitör çalışmaları Gamry PC3/600 potentiostat/galvanostat/ZRA system (Wilmington, USA) ile yapılarak, elde edilen sonuçlar bilgisayarda kayıt edilmiştir. Çalışma elektrodu, sulu ortamda yapılan deneylerde sırasıyla etil alkol ve aseton karışımı kullanılarak, Bandelin Sonarex marka ultrasonik banyo cihazı ile temizlenmiştir. Elektrodun $0,157 \text{ cm}^2$ 'lik yüzey alanı çözelti ile temas edecek şekilde hücre içine yerleştirilmiştir. Her iki ortamda da karşıt elektrot olarak Pt tel kullanılırken, referans elektrot olarak sulu ortamda Ag/AgCl, susuz ortamda ise yalancı (pseudo) Ag tel kullanılmıştır. Çalışmalarda verilen tüm gerilim değerleri, bu referans elektrotlara göredir. Desülfürizasyon işlemine tabi tutulmayan ve tutulmuş çözelti örnekleri $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$ çifti için -300 mV ile $+1100 \text{ mV}$ gerilim aralığında 50 mV/s tarama hızı ile E-logI eğrileri elde edilmiştir.

3.2.4.4. Kömürün kalori, emisyon değerlerindeki değişimin belirlenmesi

Kalori değeri ASTM 5865'te anlatılan yöntem takip edilerek Leco TGA500 marka cihazı ile ölçülmüştür. Kükürt emisyon değeri (EV); kükürt içeriğinin megajoule cinsinden kalori değerine bölünmesi ile elde edilir. EV'nin yüksek değeri, çevresel etkinin fazla olduğunu gösterir (Aller et al., 2001).

3.2.4.5. Kömür kalitesini etkileyebilecek parametrelerin desülfürizasyon öncesi ve sonrası ölçümleri

Kömürün içerdiği piritik, sülfatik ve organik kükürt (ASTM 2492) ile külde kükürt miktarları ASTM 5016 yöntemi takip edilerek yapılmıştır (ASTM, 2004).

Kömürün sahip olduğu toplam nem, uçucu madde, kül ve sabit karbon ASTM 7582 yöntemi takip edilerek Leco TGA701 cihazında yapılmıştır (ASTM, 2004).

Kömürün içerdiği C, H ve N elementleri ASTM 5291’de önerilen yöntem takip edilerek yapılmıştır (ASTM, 2004).

3.2.4.6. TGA/DTA

Termogravimetrik analizler farklı sıcaklıklarda izotermal olarak TGA/DTA cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yüksek sıcaklık korozyon davranışı zamanın fonksiyonu olarak ağırlık derişimini ölçen yüksek sıcaklık termogravimetrik terazi kullanımı ile karakterize edilmiştir. 25–30 mg ağırlığında, –100 µm boyutundaki kömür numuneleri 10 °C/dk hızla ısıtılmış ve izotermal olarak 800 °C sıcaklığında, 50 cm³/dk akış hızında azot gazı ve kuru hava karışımına maruz bırakılmıştır. İşlem sıcaklıkları ve gaz karışımı bileşimi Marinov ve arkadaşlarının çalışmaları referans alınarak belirlenmiştir (Marinov et al., 2010).

BÖLÜM 4

4. BULGULAR

4.1. Örneklem Yerleri ve Alınan AMD Örneklerinin Metal Analizleri

Çalışılan örneklem yerleri Çizelge 4.1’de koordinatları ve bazı özellikleri ile birlikte belirtilmiştir. Ayrıca su örneklerinin belli dönemlere ait metal analizleri Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Çalışılan örneklem yerlerinin bazı özellikleri

Örneklem Noktası	N (Kuzey)	E (Doğu)	pH	Çözünmüş oksijen (mg/L)	Sıcaklık (°C)
Çan AMD	N 39° 56. 824’	E 26° 52.348’	2,85	4,94	14,1
Balya AMD	N 39° 45. 814’	E 27° 35. 564’	2,75	4,75	14,8

Çizelge 4.2 Çevresel AMD örneklerinin metal analizleri

Metal adı	Çan AMD (2011 Nisan)	Balya AMD (2011 Nisan)
Toplam demir (mg/L)	95,38	296,50
Sülfat (g/L)	3,48	3,25
Çinko(mg/L)	4,516	421,6
Mangan (mg/L)	27,61	60,5
Bakır (mg/L)	206,5	15,04
Nikel (mg/L)	0,515	0,345

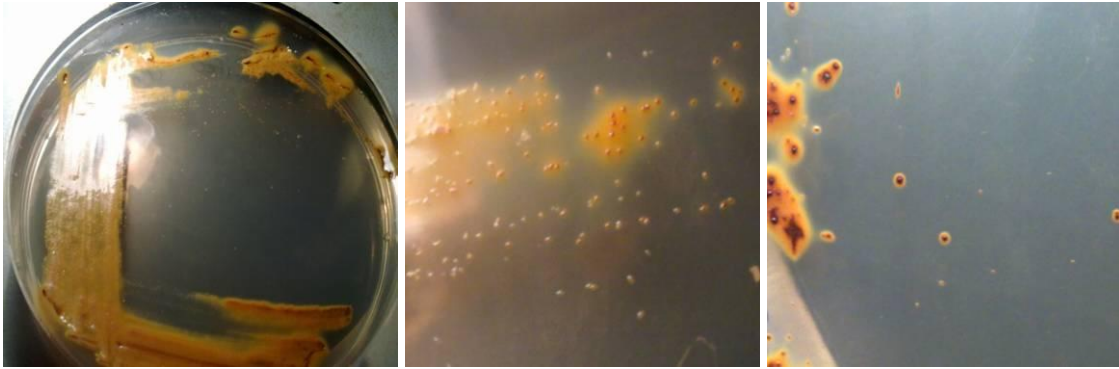
Çizelge 4.2 (devamı) Çevresel AMD örneklerinin metal analizleri

Metal adı	Çan AMD (2012 Nisan)	Balya AMD (2012 Nisan)
Krom (mg/L)	71	0,135
Kobalt (mg/L)	1,777	0,415
Kadmiyum (µg/L)	<11,3	6,174
Kurşun (µg/L)	<9,4	0,015
Magnezyum (mg/L)	75,11	124,3
Aluminyum (mg/L)	152,2	92,70
Vanadyum (µg/L)	<17,0	<17,0
Molibden (µg/L)	<10,7	<10,7

4.2. AMD Örneklerinden Asidofil Bakteri İzolasyonları

İzolasyon çalışmaları için kültüre bağlı klasik izolasyon yöntemleri ile kültürden bağımsız yöntemler eş zamanlı olarak yapılmıştır.

AMD'lerden alınan su örneklerinden izolasyon çalışmalarında standart olarak 3 farklı besiyeri kullanılmıştır. Bu besiyerleri demir okside eden asidofil bakterileri izole etmek amacı ile overlay demir ortamı (~pH 2,5), demir ve kükürt okside eden bakterileri izole etmek amacı ile overlay demir-kükürt ortamı (~pH 2,5) ve heterotrofik asidofilleri izole etmek için maya özütü katı ortamı (~pH 3) kullanılmıştır. 1 hafta sonrasında izolasyon petrilerinde görülen renk ve koloni morfoloji açısından farklı olduğu düşünülen izolatlar taze besi ortamlarına ekilerek saflaştırılmışlardır. Şekil 4.1, farklı renk ve koloni morfolojisine sahip bazı izolatların katı besiyerindeki görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.1 Farklı koloni morfoloji görünümüne sahip izolatlara örnekler

Alınan örneklerdeki toplam canlı bakteri sayısı (cfu/mL) Çizelge 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.3 Örneklerdeki canlı bakteri sayısı (cfu/mL)

	iFe ₀ besiyerinde gelişen koloni sayısı cfu/mL)	FeS ₀ besiyerinde gelişen koloni sayısı cfu/mL)	Ye ₀ (pH 3) besiyerinde gelişen koloni sayısı cfu/mL)
Balya AMD	$6,6 \times 10^3$	$6,4 \times 10^3$	Sayılamayacak kadar çok
Çan AMD	$4,9 \times 10^2$	40	Sayılamayacak kadar çok

Çizelge 4.4 Balya, Çizelge 4.5 ise Çan AMD’inden izole edilen izolatların morfolojik görünümünü vermektedir. Bu çizelgede elde edilen izolatların hangi besiyeri kullanılarak izole edildiği, izolatın morfolojik tanımlanması, makroskobik büyüme yoğunluğu, büyütülmüş makroskobik görünümü de yer almaktadır.

Çizelge 4.4 Balya AMD'sinden izole edilen izolatların morfolojik görünümleri

İzolatin bulunduğu orijinal çevresel örnek petrisi	İzolat adı	İzolatin tanımlanması	Makroskobik büyüme yoğunluğu ^a	T-RF sonucu (varsa)	Büyütülmüş makroskobik görünümü (Pasajdan sonra)
FeS _o	PA-1	Beyaz ve mukoid	+++	<i>At. ferrivorans</i> NO-37 ile eşleşmiştir.	Beyaz mukoid tek koloniler mevcut, demir oksidasyonu şeklinde büyüme mevcut
FeS _o	PA-2	Turuncu, kabarık, merkezinde ferrik demir bulunan koloniler mevcut	+++	-	İlerleyen zamanlarda beyaz mukoid koloniler oluşturmakta, demir oksidasyonu şeklinde büyüme mevcut
FeS _o	PA-3	Açık turuncu, oval koloniler	+++	-	Demir oksidasyonu şeklinde büyüme mevcut
FeS _o	PA-4	Açık turuncu, üst kısmında beyaz mukoid yapı mevcut	+++	-	Demir oksidasyonu şeklinde büyüme mevcut
FeS _o	PA-5	Açık sarı (beyazımsı)	+	<i>At. ferrivorans</i> NO-37 ile eşleşmiştir.	Demir oksidasyonu şeklinde büyüme mevcut
FeS _o	PA-6	Açık sarı	+++	<i>At. ferrivorans</i> NO-37 ile eşleşmiştir.	Demir oksidasyonu şeklinde büyüme mevcut, mukoid ve kabarık olmak üzere 2 tip koloni gözlenmekte
FeS _o	PA-7	Koyu turuncu merkeze sahip koloniler mevcut	+++	<i>At. ferrivorans</i> NO-37 ile eşleşmiştir.	Demir oksidasyonu şeklinde büyüme ve çok küçük, koyu merkezli ve kabarık koloniler mevcut

Çizelge 4.4 (devamı) Balya AMD'sinden izole edilen izolatların morfolojik görünüşleri

İzolatin bulunduğu orijinal çevresel örnek petrisi	İzolat adı	İzolatin tanımlanması	Makroskobik büyüme yoğunluğu ^a	T-RF sonucu (varsa)	Büyütülmüş makroskobik görünümü (Pasajdan sonra)
FeSo	PA-8	PA-4'e benzer fakat tırtıklı koloniler	+	<i>At. ferrivorans</i> NO-37 ile eşleşmiştir.	Demir oksidasyonu şeklinde büyüme var, kelebek ve yuvarlak olmak üzere 2 ayrı şekilde koyu ferrik merkeze sahip koloniler mevcut, mikroskopta basil olarak görülüp farklı gelişme evrelerine ait olduğu düşünülmüştür
FeSo	PA-9	Açık turuncu, üst kısmı beyaz mukoid ve PA-4'e benzer koloniler	++	-	Demir oksidasyonu şeklinde büyüme var
FeSo	PA-10	Küçük, koyu merkezli koloniler mevcut	+	-	Demir oksidasyonu şeklinde büyüme var
FeSo	PA-11	Büyük koyu merkezli koloniler	++	<i>At. ferrivorans</i> NO-37 ile eşleşmiştir.	Demir oksidasyonu şeklinde büyüme var, yuvarlak, oval ve mukoid şekillerde koloniler oluşmuştur
FeSo	PA-12	Beyaz, parlak koloniler	+	-	Demir oksidasyonu şeklinde büyüme var
FeSo	PA-13	Beyaz ve mukoid koloniler	+++	-	Demir oksidasyonu şeklinde büyüme var

Çizelge 4.4 (devamı) Balya AMD'sinden izole edilen izolatların morfolojik görünüşleri

İzolatin bulunduğu orijinal çevresel örnek petrisi	İzolat adı	İzolatin tanımlanması	Makroskobik büyüme yoğunluğu ^a	T-RF sonucu (varsa)	Büyütülmüş makroskobik görünümü (Pasajdan sonra)
iFeo	PA-14	Turuncu, tuvarlak, ferrik demir merkezli koloniler	+	<i>At. ferrivorans</i> NO-37 ile eşleşmiştir.	Demir oksidasyonu şeklinde büyüme var, ferrik demir merkezli, yuvarlak ve oval şekilli 2 tipte koloni
iFeo	PA-15	Küçük, açık turuncu, parlak, yuvarlak	++	-	Demir oksidasyonu şeklinde büyüme var, ferrik demir merkezli, yuvarlak ve göz şekline benzer 2 tipte koloni
iFeo	PA-16	Çok küçük, yuvarlak, koyu turuncu, dışta halkasal açık turuncu, kabarık ve parlak kolonile	+	-	Merkezinde büyük ferrik demir birikimi gözlenmiştir
iFeo	PA-17	Çok küçük, koyu turuncu, şapkaya benzer şekilde koloni	+	<i>At. ferrivorans</i> NO-37 ile eşleşmiştir.	Yuvarlak ve oval 2 tipte parlak, merkezinde ferrik demir birikimi görünen koloniler
iFeo	PA-18	PA-17'ye benzer koloniler	-	-	Gözle görülebilir büyüme gözlenmemiştir
iFeo	PA-19	Büyük, koyu turuncu merkezli yuvarlak koloniler	+++	-	Demir oksidasyonu şeklinde büyüme var, büyük, koyu turuncu merkezli, oval daha mukoid ve yuvarlak, kabarık olmak üzere 2 farklı tipte koloni mevcut

Çizelge 4.4 (devamı) Balya AMD'sinden izole edilen izolatların morfolojik görünümleri

İzolatin bulunduğu orijinal çevresel örnek petrisi	İzolat adı	İzolatin tanımlanması	Makroskobik büyüme yoğunluğu ^a	T-RF sonucu (varsa)	Büyütülmüş makroskobik görünümü (Pasajdan sonra)
iFe ₀	PA-20	Küçük, beyazımsı açık turuncu, yuvarlak koloniler	+++	-	Demir oksidasyonu şeklinde büyüme var, ferrik demir merkezli, yuvarlak ve oval şekilli 2 tipte koloni
iFe ₀	PA-21	Uzun, çubuk şekilli, çevresi açık renkte merkezi turuncu koloniler	++	<i>At. ferrivorans</i> NO-37 ile eşleşmiştir.	Demir oksidasyonu şeklinde büyüme var, ferrik demir merkezli, yuvarlak ve oval şekilli 2 tipte koloni
iFe ₀	PA-22	Koyu turuncu koloniler	+	-	Çok çok küçük, yuvarlak, açık turuncu koloniler mevcut
iFe ₀	PA-23	Sarı ve mukoid koloniler	+	-	Gözle görülebilir bir büyüme gözlenmemiştir
FeS ₀	PA-24-CM K	Virgül şekilli, beyaz mukoid, ferrik demir merkezli koloniler	+++	<i>At. ferrivorans</i> NO-37 ile eşleşmiştir.	Demir oksidasyonu şeklinde büyüme var
Ye ₀ (pH3)	PA-25	Pembe koloniler	+++	-	Oval, parlak, mukoid, pembe koloniler mevcut
Ye ₀ (pH3)	PA-26	Beyaz koloniler	-	-	Gözle görülebilir bir büyüme gözlenmemiştir
Ye ₀ (pH3)	PA-27	PA-25'e benzer, oval koloniler	+++	<i>Acidiphilium</i> SJH ile eşleşmiştir	Küçük, parlak, pembe, kabarık koloniler mevcut
YE (pH3)	PA-H1	Beyaz, nispeten küçük koloniler	++	-	Tek koloni şeklinde büyümesi geç gerçekleşmiş, beyaz koloniler mevcut

Çizelge 4.4 (devamı) Balya AMD'sinden izole edilen izolatların morfolojik görünüşleri

İzolatin bulunduğu orijinal çevresel örnek petrisi	İzolat adı	İzolatin tanımlanması	Makroskobik büyüme yoğunluğu ^a	T-RF sonucu (varsa)	Büyütülmüş makroskobik görünümü (Pasajdan sonra)
YE (pH 3)	PA-H2	Pembe, eliptik koloniler	++	-	Parlak ve mat renkte 2 ayrı pembe koloni mevcut
YE (pH 3)	PA-H3	Krem renginde, daha büyük, kabarık koloniler	++	-	Parlak, yuvarlak ve mukoid olmak üzere 3 farklı tipte beyaz koloni mevcut
FeTSB	PA-38	Büyük, turuncu, yuvarlak koloniler, merkezi oldukça kırmızı	++	-	Akıntı sudan izole edilmiş KP-1 izolatına benzer görünümde olup ışık mikroskobu altında filamentli görünmüştür
FeTSB	PA-39	Daha küçük, <i>At. ferrivorans</i> kolonilerine benzer	+++	<i>Ferrimicrobium acidiphilium</i> T23 ile eşleşmiştir	Işık mikroskobu altında küçük basiller şeklinde görülmüştür
FeTSB	PA-45	Pembe, mukoid koloniler	+++	-	Işık mikroskobu altında filamentli yapılar şeklinde görülmüştür
FeTSB	PA-44	Beyaz koloniler	+++	-	Işık mikroskobu altında filamentli yapılar şeklinde görülmüştür

^a +++ oldukça iyi büyüme; ++ iyi büyüme; + zayıf büyüme (sadece ekim yapılan ilk başlangıç kısmında üreme mevcut)

Çizelge 4.5 Çan AMD'sinden izole edilen izolatların morfolojik görünüşleri

İzolatin bulunduğu orijinal çevresel örnek petrisi	İzolat adı	İzolatin tanımlanması	Makroskobik büyüme yoğunluğu ^a	T-RF sonucu (varsa)	Büyütülmüş makroskobik görünümü (Pasajdan sonra)
FeS ₀	PA-28	Beyaz koloniler	-	-	Gözle görülebilir büyüme gözlenmemiştir
iFe ₀	PA-29	Merkezlerinde koyu turuncu birikim gözlenen açık turuncu koloniler	++	<i>L. ferrooxidans</i> ile eşleşmiştir (gözlenen tüm farklı koloni tipleri)	Ferrik demir merkezli oval, yuvarlak, düzensiz şekilli farklı tipte koloniler
iFe ₀	PA-30	PA-29'a benzer yuvarlak koloniler	++	<i>L. ferrooxidans</i> ile eşleşmiştir	Demir oksidasyonu gözlenmiştir, büyük ve düzensiz kolonilerin çevresinde açık renkli halka görülmüştür
iFe ₀	PA-31	Büyük, turuncu, yuvarlak koloniler, merkezi oldukça kırmızı	+	-	Gözle görülebilir büyüme olup demir oksidasyonu gözlenmiştir, düzensiz koloniler mevcuttur
iFe ₀	PA-32	PA-28'e benzer oval koloniler	++	-	Gözle görülebilir demir oksidasyonu mevcut, büyük ferrik demir merkezli parlak ve mat 2 tipte koloni görülmüştür
YE ₀ (pH 3)	PA-33	Açık sarı koloniler mevcut	+	<i>Acidocella WJB</i> ile eşleşmiştir	Beyaz, düzensiz, parlak koloniler görülmüştür

Çizelge 4.5 (devamı) Çan AMD'inden izole edilen izolatların morfolojik görünümleri

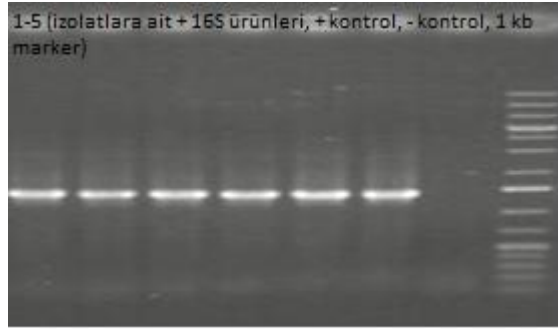
İzolatin bulunduğu orijinal çevresel örnek petrisi	İzolat adı	İzolatin tanımlanması	Makroskobik büyüme yoğunluğu ^a	T-RF sonucu (varsa)	Büyütülmüş makroskobik görünümü (Pasajdan sonra)
YE ₀ (pH 3)	PA-34	Koyu turuncu merkezli koloniler görülmüştür	-	-	Gözle görülür bir büyüme gözlenmemiştir
YE ₀ (pH 3)	PA-35	PA 31'e benzer fakat kenarları tırtıklı koloniler	++	-	Pembe, küçük, parlak ve nispeten daha büyük ve mat olmak üzere 2 farklı tipte koloni gözlemlenmiştir
YE ₀ (pH 3)	PA-36	Beyaz, parlak, yuvarlak koloniler	-	-	Gözle görülebilir büyüme gözlenmemiştir
YE (pH 3)	PA-H4	Çok küçük ve çok sayıda, şeffaf, beyaz koloniler	-	-	Gözle görülebilir büyüme gözlenmemiştir
YE (pH 3)	PA-H5	Koyu pembe-mor renkte koloniler	-	-	Gözle görülebilir büyüme gözlenmemiştir
YE (pH 3)	PA-H6	Büyük krem/grimsi koloniler	+	-	Gözle görülebilir büyüme var, ancak tek koloni görülmüştür
YE (pH 3)	PA-H7	Sarı, mukoid büyük koloniler	++	-	Küçük beyaz koloniler görülmüştür
YE (pH 3)	PA-H8	Düzensiz, nörona benzer, pembe merkezli koloniler	-	-	Gözle görülebilir büyüme gözlenmemiştir
YE (pH 3)	PA-H9	Büyük, koyu pembe, mukoid koloniler	-	-	Gözle görülebilir büyüme gözlenmemiştir
YE (pH 3)	PA-H10	Çok açık pembe, mukoid koloniler	-	-	Küçük beyaz koloniler görülmüştür

^a +++ oldukça iyi büyüme; ++ iyi büyüme; + zayıf büyüme (sadece ekim yapılan ilk başlangıç kısmında üreme mevcut)

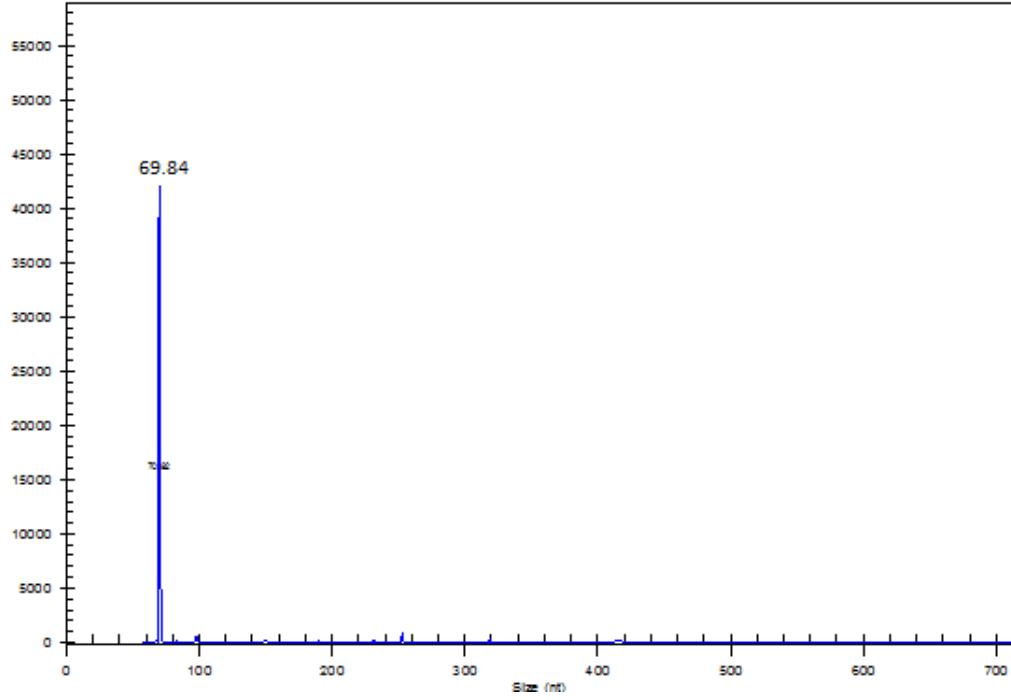
4.3. Çevresel Su Örneklerinin Kültür Bağımlı ve Kültür Bağımsız Prokaryotik Çeşitlilik Analizleri

4.3.1. İzolatların moleküler identifikasyonu

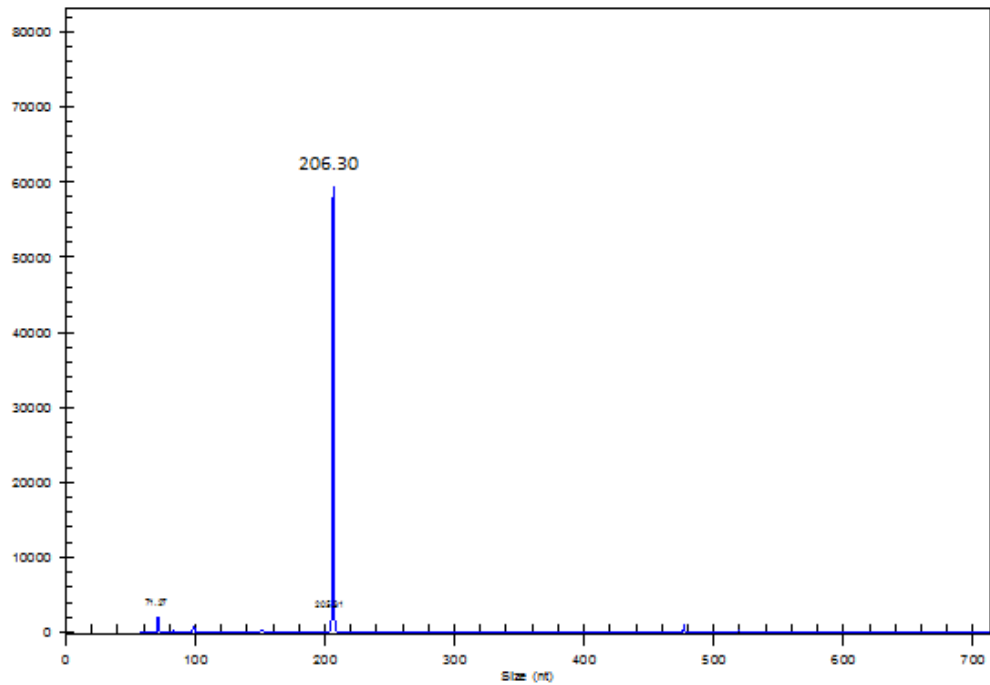
Balya ve Çan'dan alınan su örneklerinin kültüre alma işlemlerinde farklı besiyerlerinden elde edilen tek koloni örnekleri saflık kontrolleri de yapıldıktan sonra lizis edilip 27F(flouresanslı)-1387R primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR işlemi ile 16S rRNA geninin çoğaltılmasını takiben PCR ürünlerinin %0.7'lik agaroz jelde yürütülmesiyle elde edilen jel fotoğrafında yaklaşık 1350 bazlık ürün veren jel görüntüsü Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Saf koloni olduğu için PCR ürününün saflaştırılmasına ihtiyaç duyulmaksızın T-RFLP analizleri gerçekleştirilmiş ve tek T-RF piki görülmesi beklenmiştir. İzleyen metinde elde edilen izolatlardan bir tanesi olan PA-5'in T-RF pikleri verilmiştir. Buna göre Şekil 4.3, PA-5 izolatın 16S PCR ürününün HaeIII enzimi ile kesilerek elde edilen T-RF görüntüsüdür, Şekil 4.4 ise CfoI, Şekil 4.5 de AluI enzimi ile kesilerek elde edilen T-Rf elektroferogramlarıdır.



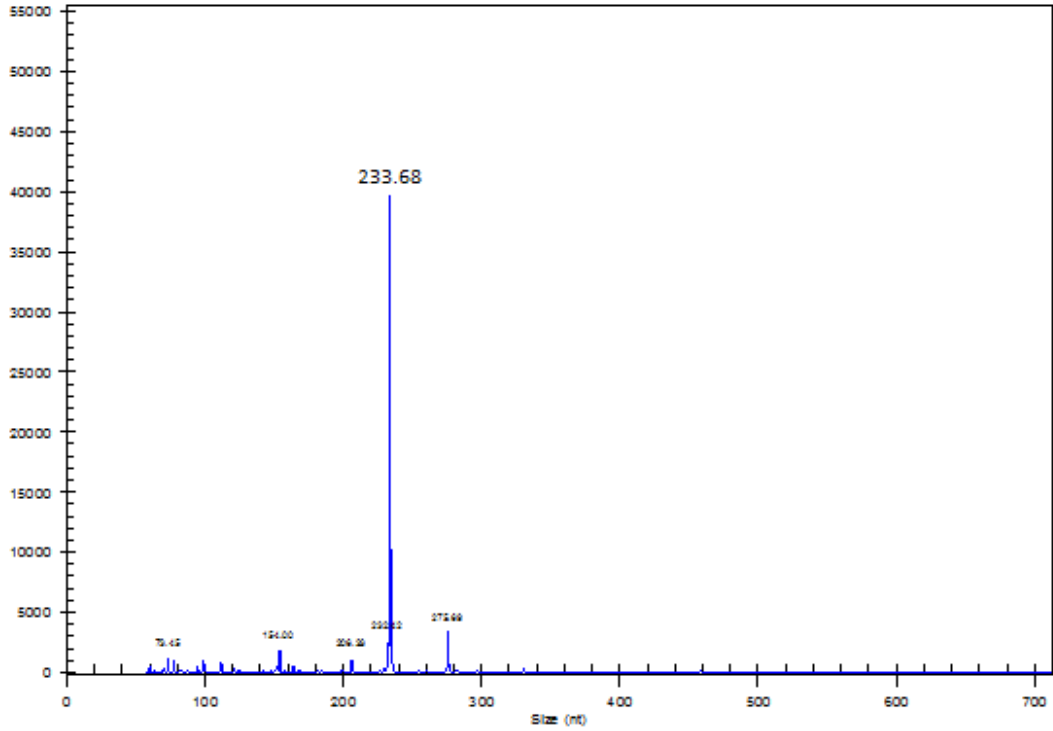
Şekil 4.2 Çevresel AMD örneklerinden elde edilen izolatların DNA amplifikasyonları sonucunda elde edilen 16S PCR ürünleri



Şekil 4.3 PA-5 izolatın 16S PCR ürününün HaeIII enzimi ile kesilerek elde edilen T-RF elektroferogramı



Şekil 4.4 PA-5 izolatın 16S PCR ürününün CfoI enzimi ile kesilerek elde edilen T-RF elektroferogramı



Şekil 4.5 PA-5 izolatın 16S PCR ürününün AluI enzimi ile kesilerek elde edilen T-RF elektroferogramı

T-RFLP analizi sonucunda tek pik olarak elde edilen kolonilerin aynı zamanda dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi sonuçlarının BLAST'ta karşılaştırılması ile NCBI'da eşleşen türler Çizelge 4.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6 Balya ve çan örneklerinden elde edilen Bacteria izolatlarının dizi analiz sonuçları

İzolat adı	Primer seti	Accession no	NCBI'de eşleşen tür	Benzerlik
PA-5	27F	CP002985.1	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> SS3, complete genome	% 100
PA-8	27F-1387R	CP002985.1	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> SS3, complete genome	% 100
PA-19	27F	HM769772.1	<i>Acidithiobacillus</i> sp. Mc9KA-2-4-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	% 99

Çizelge 4.6 (devamı) Balya ve Çan örneklerinden elde edilen Bacteria izolatlarının dizi analiz sonuçları

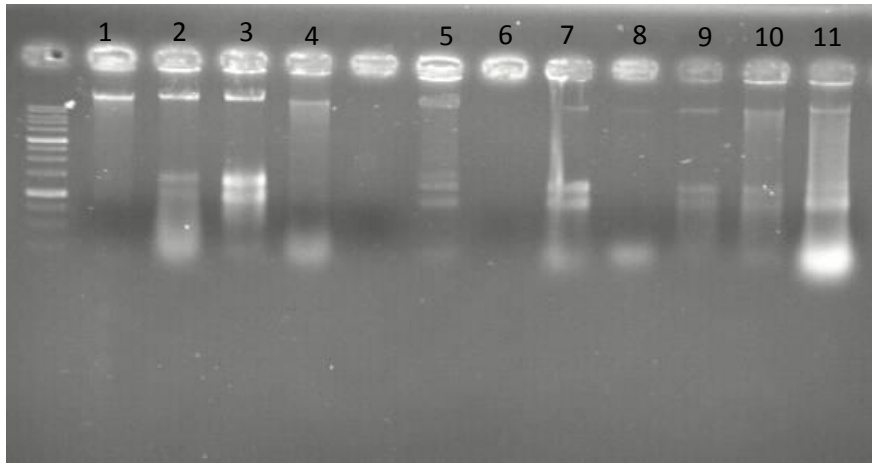
İzolat adı	Primer seti	Accession no	NCBI'de eşleşen tür	Benzerlik
PA-20	27F	CP002985.1	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> SS3, complete genome	%99
PA-32	27F	HM769765.1	<i>Leptospirillum</i> sp. Mc9KL-1-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%99
PA-34	27F	FN870338.1	<i>Acidobacteriaceae</i> bacterium YE3-D1-20 partial 16S rRNA gene, isolate YE3-D1-20	%100
PA-38	27F-1387R	GU168015	<i>Ferrimicrobium</i> sp. BGR 117	%99
PA-44	27F-1387R	HM769774.1	<i>Ferrimicrobium</i> sp. Mc9KI-1-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%98
PA-45	27F-1387R	AY495954.1	<i>Actinobacterium</i> WJ25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%98
PA-H2	27F	EF219138.1	<i>Acidobacteriaceae</i> bacterium Thars1 16S ribosomal RNA	%99
PA-H3	27F		<i>Acidiphilium</i> sp. CH3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%99
PA-H6	27F	HF558581.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone G15 enrichment_Nr8	%100
PA-H7	27F-1387R	AY766000.2	<i>Acidiphilium</i> sp. CCP3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%99

4.3.2. Kültürden bağımsız komünite analizleri

Çan AMD için 4 L, Balya AMD için 1 L su örneği filtre edildikten sonra UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kiti ile gerçekleştirilen DNA ekstraksiyonu ile elde edilen DNA örnekleri T-RFLP deneylerinde kullanılmıştır.

DNA ekstraksiyonu için kitten farklı olarak fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi de kullanılmıştır. 2 farklı yöntem kullanılmıştır. Bunun için 1 L'lik santrifüj

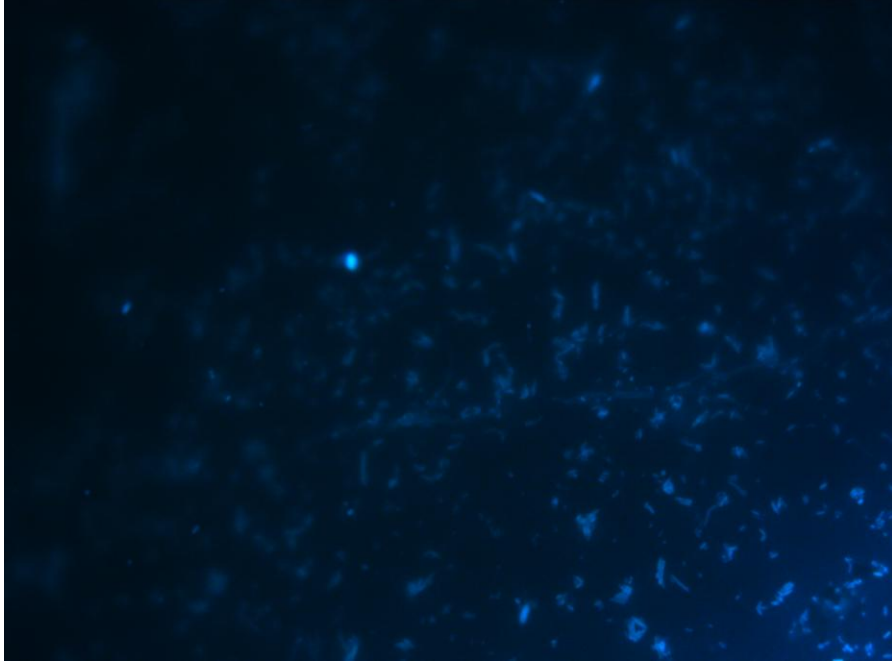
kaplarına 750 mL su örneği konmuş, 3000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Dikkatlice üstte kalan sıvı alınıp 850 mL’si membran filtrasyonla 0,22’lik milipor filtre ile filtre edilmiştir. Bu filtrenin yarısı 2.2.2.2’de anlatıldığı gibi DNA ekstraksiyonu amacı ile kullanılmıştır. Sonrasında örnek %1’lik agaroz jelde yürütülmüş ve pozitif sonuç gözlenmiştir. Bunun yanısıra filtrenin diğer yarısı da UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kiti ile DNA ekstraksiyonuna tabi tutulmuş ve agaroz jelde toplam DNA sonuçları gözlenmiştir. Ancak su örneğinden izole edilen DNA bandına göre toprak izolasyon kiti ile elde edilen DNA daha temiz görünmüştür. Çevresel örneklerin agaroz jelde total DNA görüntülerinin yanı sıra DSMZ kültür koleksiyonundan istenen referans kültürlerin de genomik DNA ekstraksiyonları aynı yöntemle gerçekleştirilmiş ve aynı jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.6)



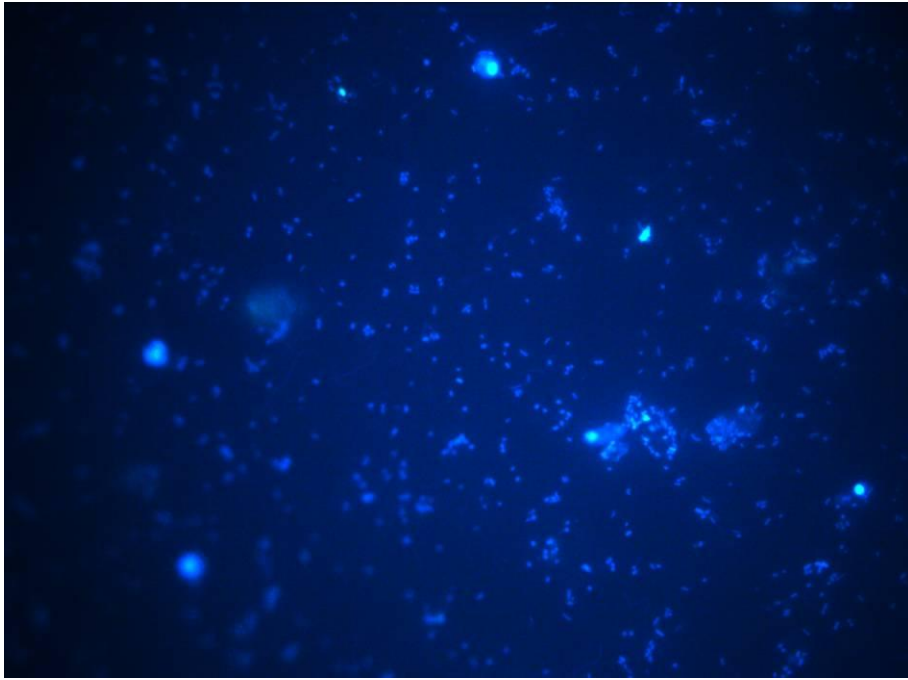
Şekil 4.6 Toplam DNA ekstraksiyonları sonucu elde edilen DNA’ların agaroz jelde görüntüleri (Çevresel su örnekleri–(1) Çan çevresel su örneği total DNA’sı (kit ile) (2) Çan çevresel su örneği total DNA’sı (fenol kloroform ekstraksiyon yöntemi ile), (3) Balya çevresel su örneği total DNA’sı (manuel yöntem ile) (4) Balya çevresel su örneği total DNA’sı (kit ile) (5) 1 kb marker referans kültürler (6) (–) kontrol, (7) *Sulfolobus* (8) *Thiobacillus*, (9) *Ferroplasma*, (10) *Leptospirillum* (11) *Acidiphilium*)

4.3.2.1. Flouresan in situ hibridizasyon

Balya ve Çan AMD Nisan ayı örneklerine Bacteria sayımını gerçekleştirmek için Eub338, Archaea sayımını gerçekleştirmek için Arc915 probları uygulanmıştır. İzleyen metinde bu problara ait floresan mikroskop görüntüleri ile DAPI boyamaları verilmiştir (Şekil 4.7a, b). Su örneklerindeki toplam hücre sayısı ise DAPI boyası ile gerçekleştirilmiştir.



(a)

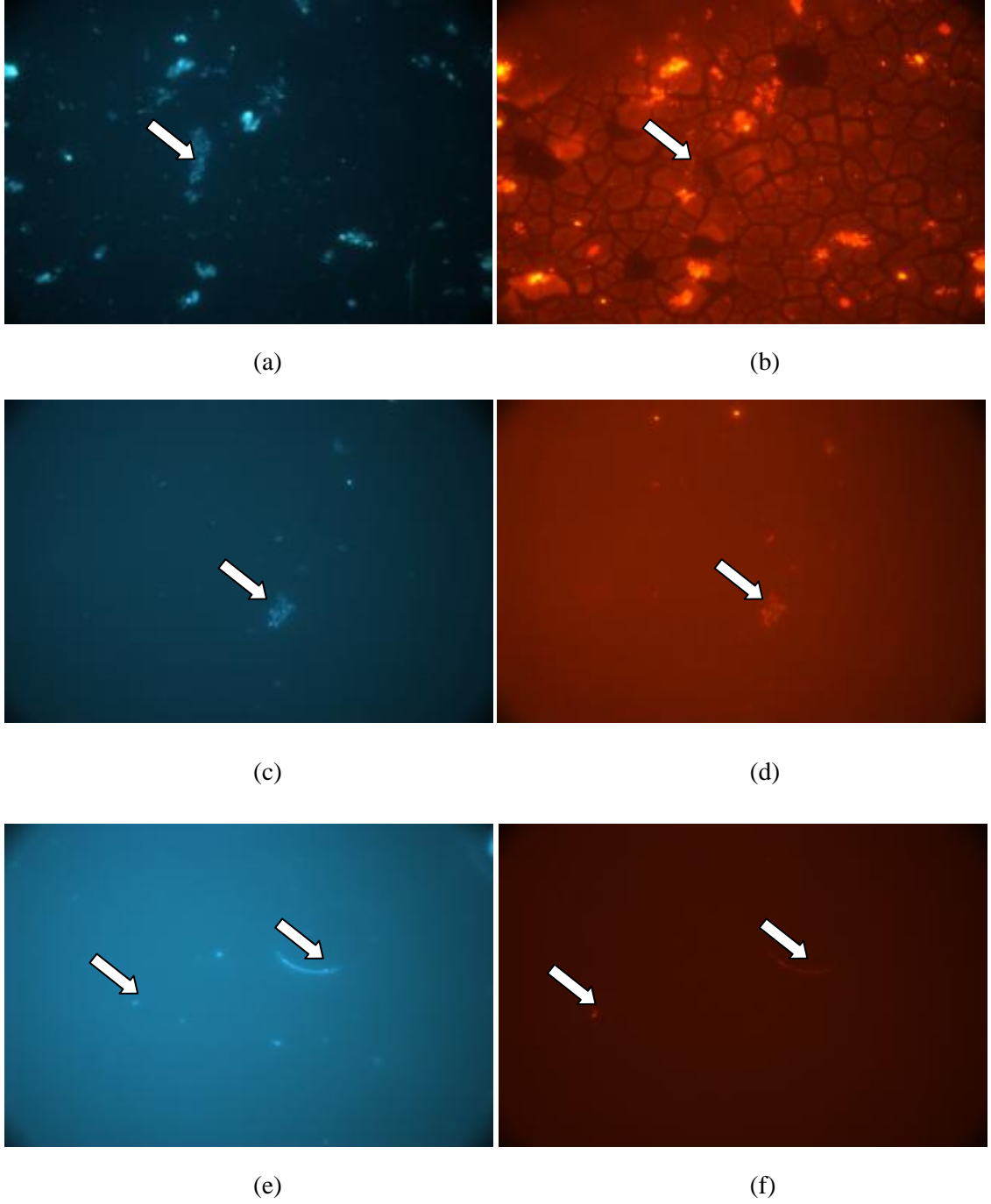


(b)

Şekil 4.7 (a) Çan AMD'sinin DAPI görüntüsü (5 mL'deki mikroorganizma sayısı)

(b) Balya AMD'sinin DAPI görüntüsü (5 mL'deki mikroorganizma sayısı)

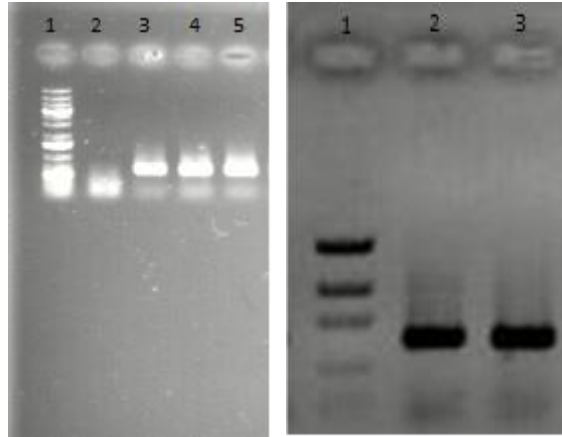
Fiksasyon amacıyla, 1 mL, 3 mL, 5 mL ve 10 mL su örneği %4 Formaldehit (Fluka) içeren minimal Mackintosh mediumunda fikse edilmiştir. Şekil 4.8, AMD örneklerine ait FISH görüntülerini göstermektedir.



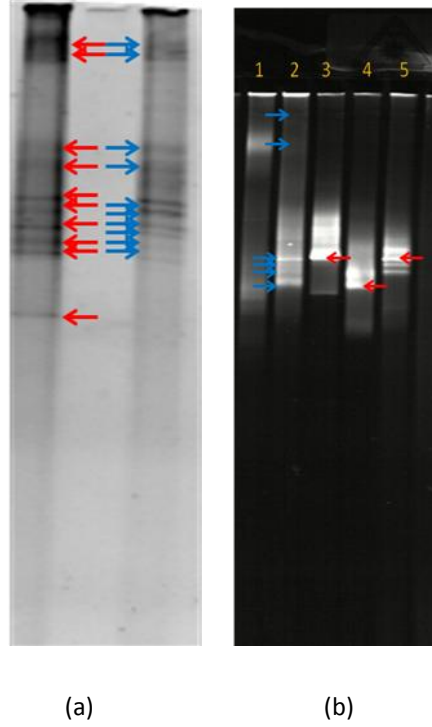
Şekil 4.8 AMD örneklerine ait FISH görüntüleri (a), (c), (e) DAPI boyama, (b) ve (d) bakteri probu ile FISH, (f) arke probu ile FISH görüntüsü

4.3.2.2. Denatüre edici jel elektroforezi (DGGE)

Balya ve Çan AMD 2011 Nisan ayı çevresel örneklerinden DGGE analizinin gerçekleştirilmesi için her iki örnekten elde edilen ortalama 500 bazlık 16S PCR ürünlerinin DGGE jeline yüklemek için yeterli olup olmadığını kontrol etmek için Low Mass DNA ladder (Invitrogen) eşliğinde DGGE jeline yüklenecek örnekler %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 4.9). 400–500 ng olacak şekilde DGGE jeline yüklenecek PCR ürün miktarı hesaplandıktan sonra denatüre edici gradient jel elektroforez sistemi hazırlanarak örneklerdeki popülasyonların çeşitlilikleri jel profilleri ile belirlenmiştir. Elde edilen profilde bakteriyel çeşitliliği oluşturan tür sayısı T-RFLP'de elde edilen sayılarla karşılaştırılmıştır. DGGE analizi sonucunda elde edilen profiller Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.9 Çevresel DNA'ların DGGE-PCR ürünleri. (a) 1) 1 kb marker 2) Çan AMD çevresel örnek, archaea 3) Çan AMD çevresel örnek, bacteria 4) Balya AMD çevresel örnek, archaea 5) Balya AMD çevresel örnek, bacteria (b) 1) Low mass DNA ladder 2) Çan AMD çevresel örnek 3) Balya AMD çevresel örnek

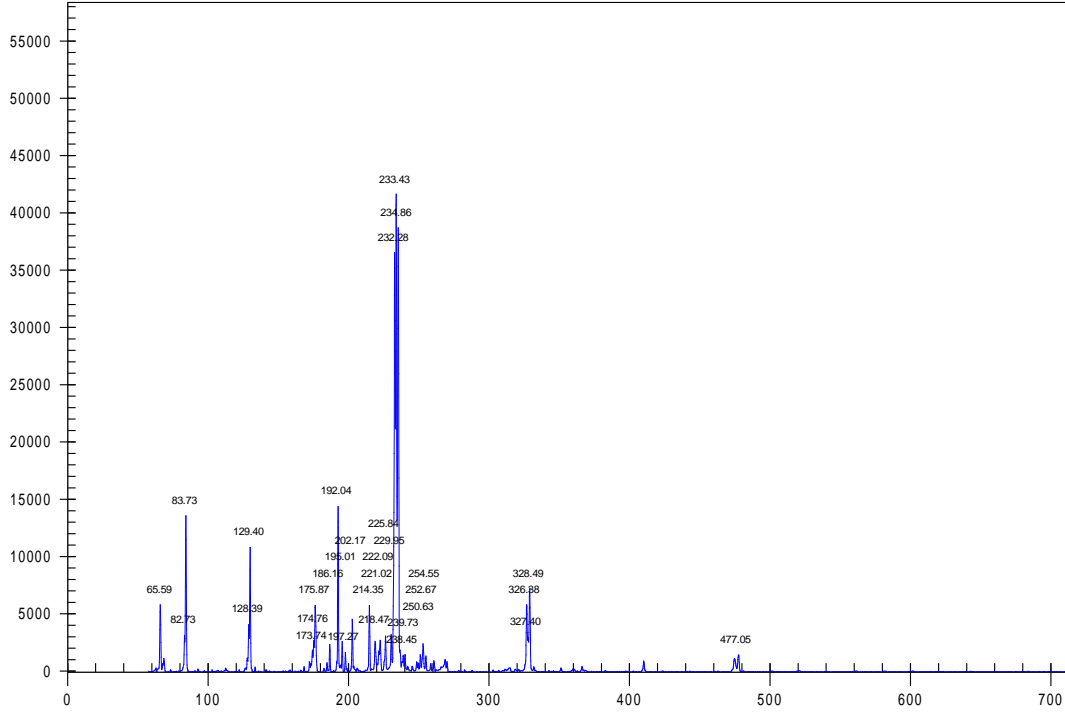


Şekil 4.10 Çan ve Balya çevresel örnekleri ile referans kültürlerin DGGE profilleri (a) Ağustos 2011 Çan (15 ml DGGE-PCR ürününden), 30 ml DGGE-PCR ürününden (b) 1) Mart 2012 Çan 2) Mart 2012 Balya 3) *Thiobacillus sp.* 4) *Acidiphilium sp.*, 5) *Leptospirillum sp.*

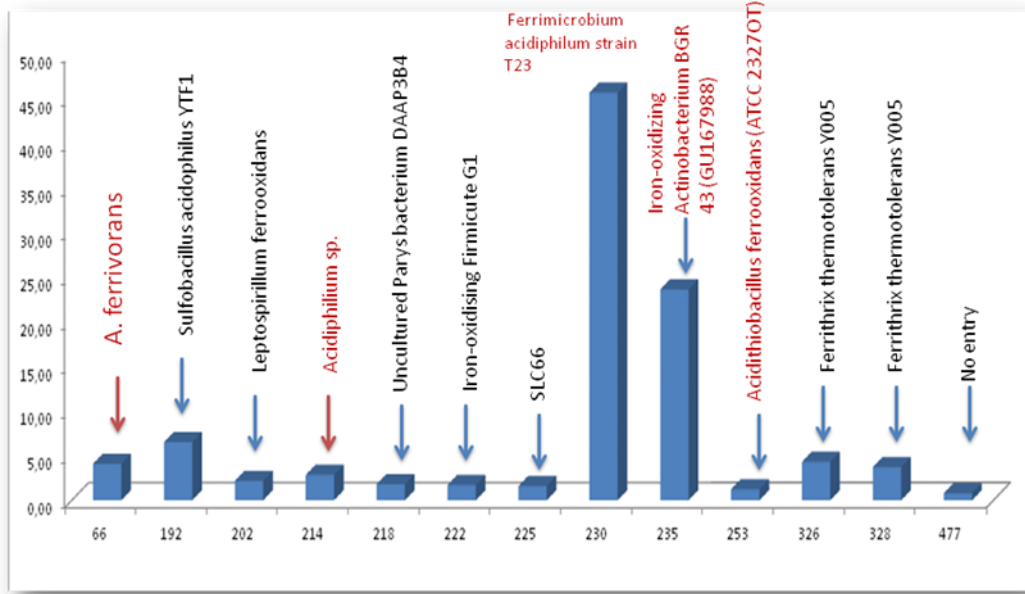
4.3.2.3. Terminal restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi

Balya ve Çan AMD 2012 Nisan ayı çevresel örneklerinden T-RFLP analizinin gerçekleştirilmesi için bakteriler için floresans etiketli 27 F ve 1387 R, arkeler içinse floresans etiketli 20F ve 915R primer çiftleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu kurulmuş, sonrasında bu PCR ürünleri HaeIII, CfoI ve AluI enzimleri ile kesilmiş, fragment analizine tabi tutulmuştur. Balya için Şekil 4.11, 4.13 ve 4.15; Çan için Şekil 4.17, 4.19 ve 4.21 bu restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra elde edilen elektroferogramların görüntülerini vermektedir. Balya için Şekil 4.12, 4.14 ve 4.16; Çan için Şekil 4.18, Şekil 4.20 ve Şekil 4.22 ise elektroferogramlardaki piklerin Excel programında düzenlenmesi sonucu elde edilen baz çiftleri ve bunların örnekte bolluk miktarını göstermektedir. Şekil 4.23– 4.28 arasındaki elektroferogram ve analizler Çan AMD'deki arke çeşitliliğinin göstergesidir. Bu grafiklerde X eksenini nükleotit olarak T-RF pikini, Y eksenini ise % toplam T-RF alanında T-RF bolluğunu işaret etmektedir. T-RFLP analizi için kullanılan boyut standardı 600 baz çifti olduğu için fragment

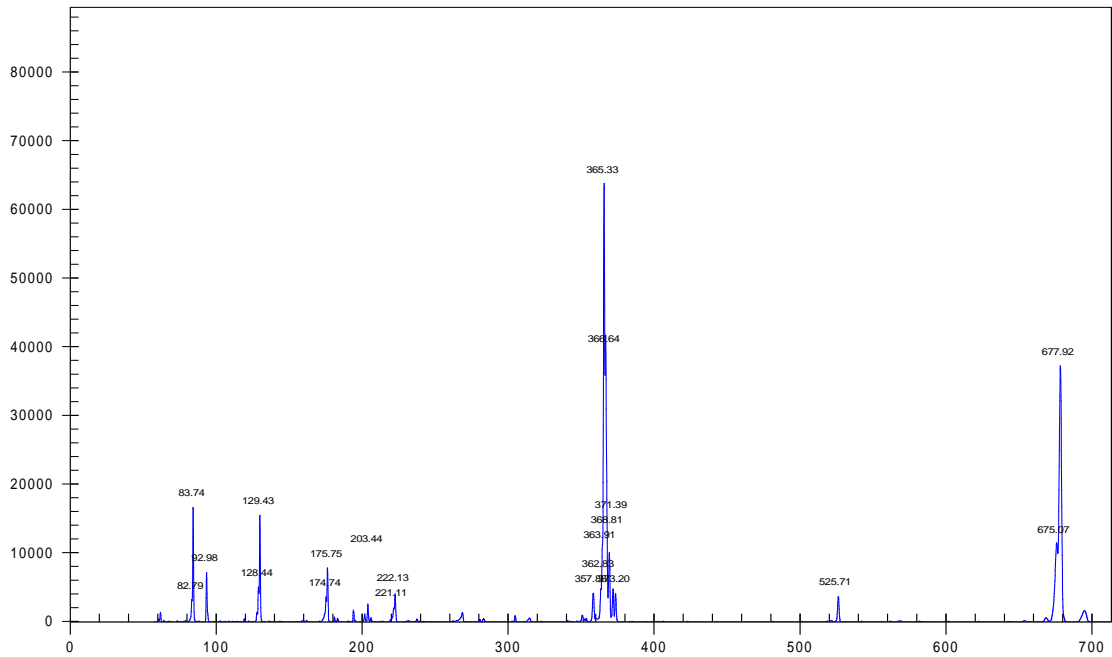
analizi sonucunda elektroferogramlarında bu kadar baz çiftine sahip olması beklenmiştir. Şekil 4.29, Balya ve Çan AMD'lerinin bakteriyel komünitelerinin T-RFLP analizleri açısından karşılaştırılmasını göstermektedir.



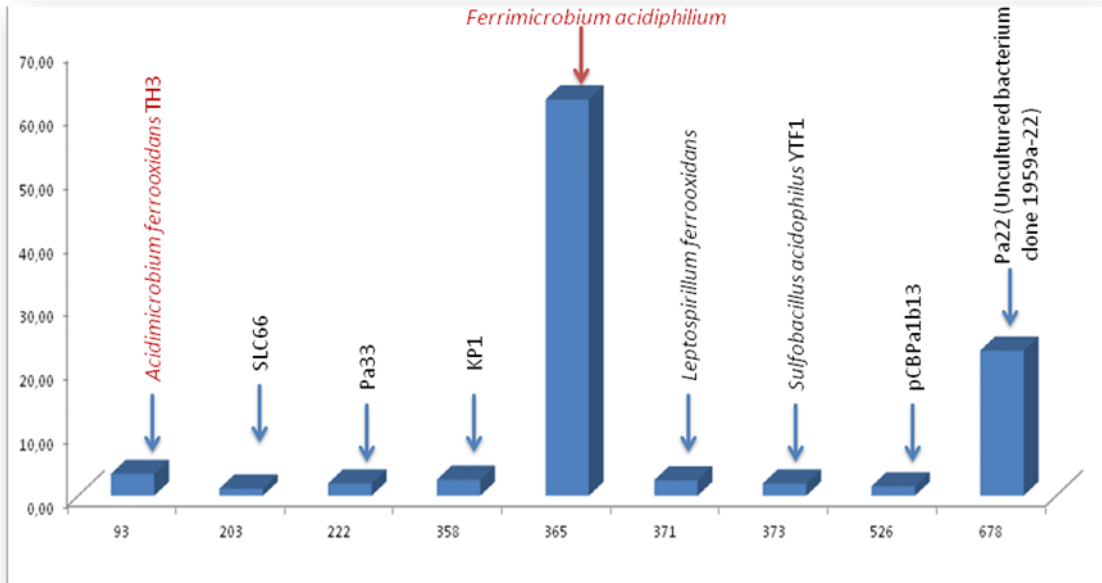
Şekil 4.11 Balya AMD'sinin bakteriyel komünitesinin T-RFLP elektroferogram profili (Hae III ile kesilmiş)



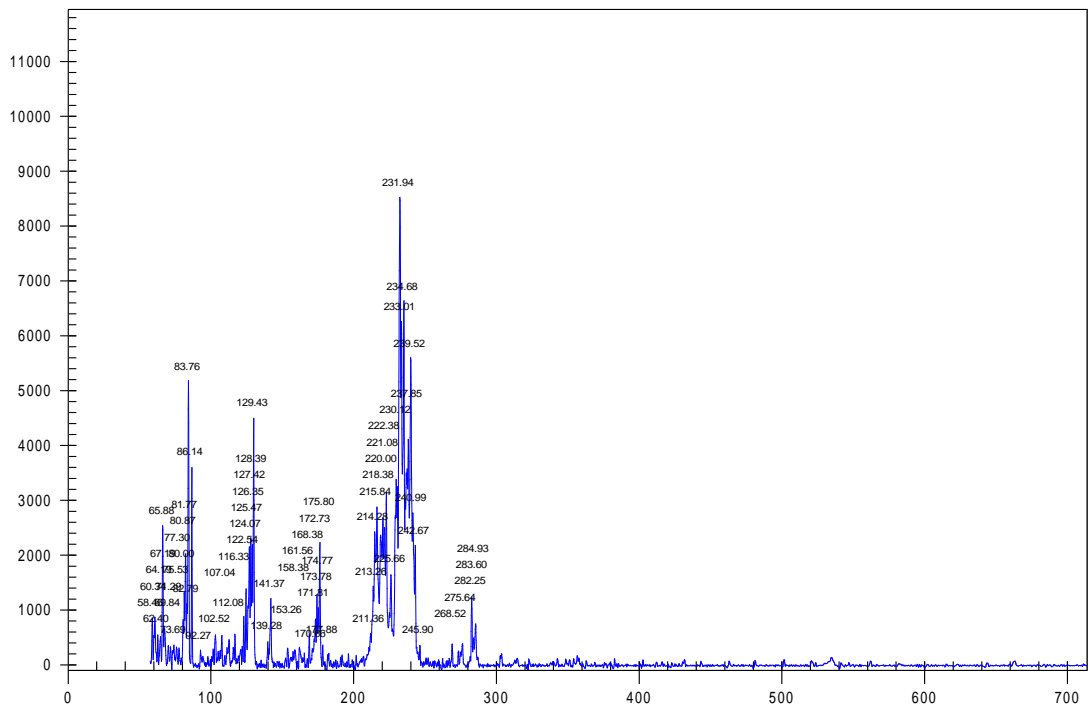
Şekil 4.12 Balya AMD'sinin bakteriyal komünitesinin T-RFLP analizi (Hae III ile kesilmiş)



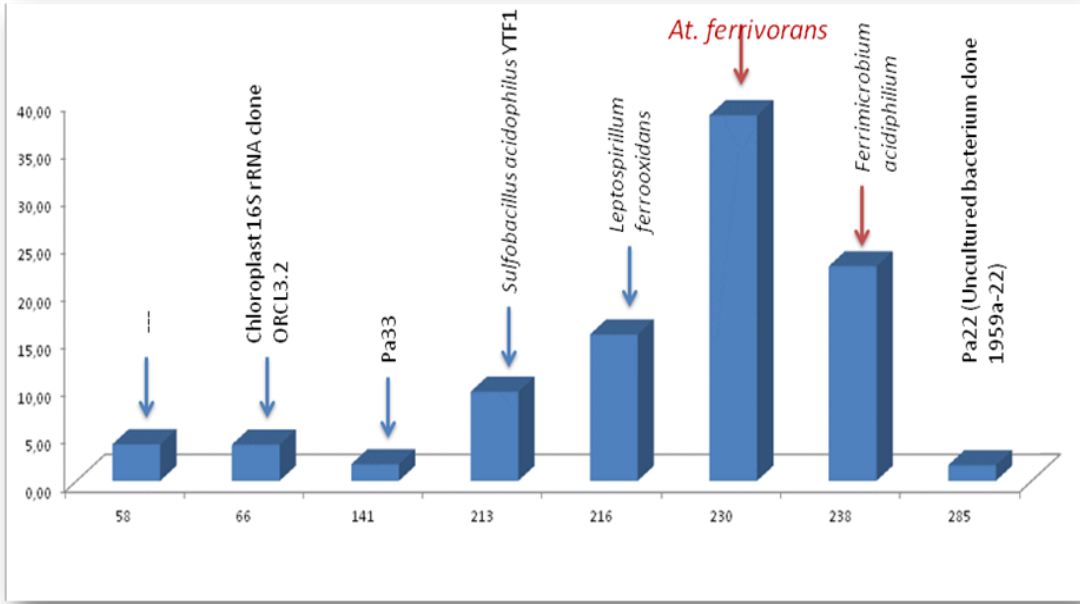
Şekil 4.13 Balya AMD'sinin bakteriyal komünitesinin T-RFLP elektroferogram profili (Cfo I ile kesilmiş)



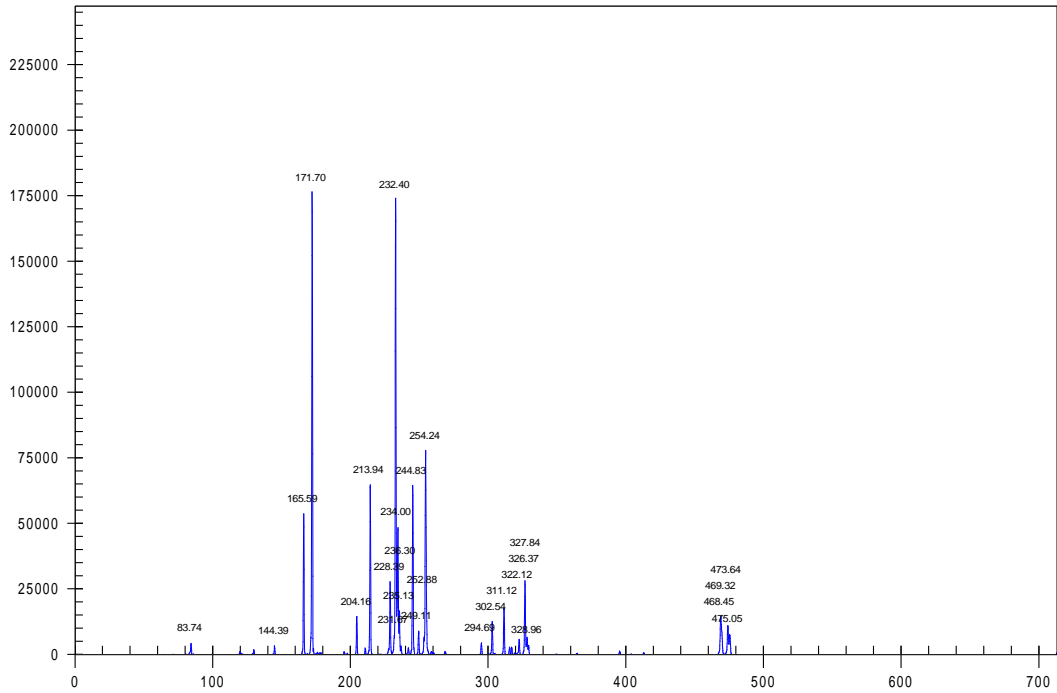
Şekil 4.14 Balya AMD'sinin bakteriyal komünitesinin T-RFLP analizi (CfoI ile kesilmiş)



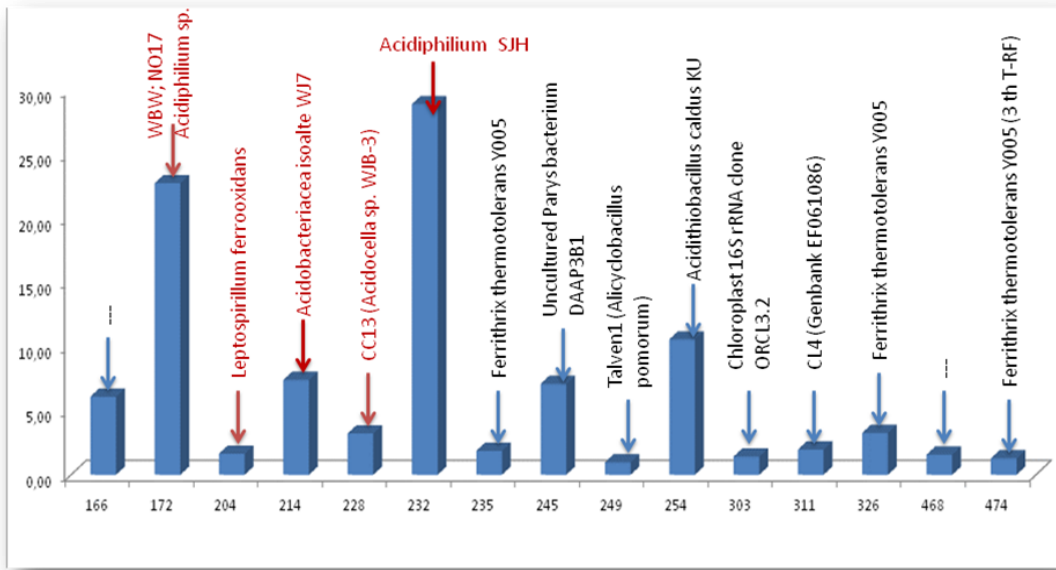
Şekil 4.15 Balya AMD'sinin bakteriyal komünitesinin T-RFLP elektroferogram profili (Alu I ile kesilmiş)



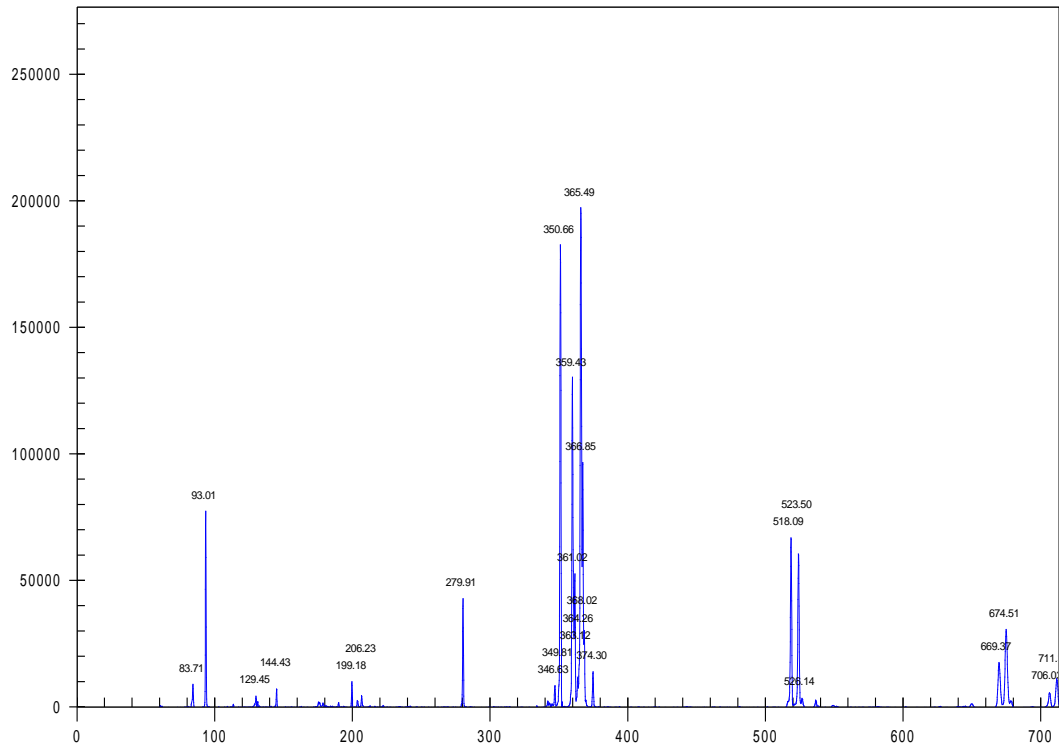
Şekil 4.16 Balya AMD'sinin bakteriyal komünitesinin T-RFLP analizi (AluI ile kesilmiş)



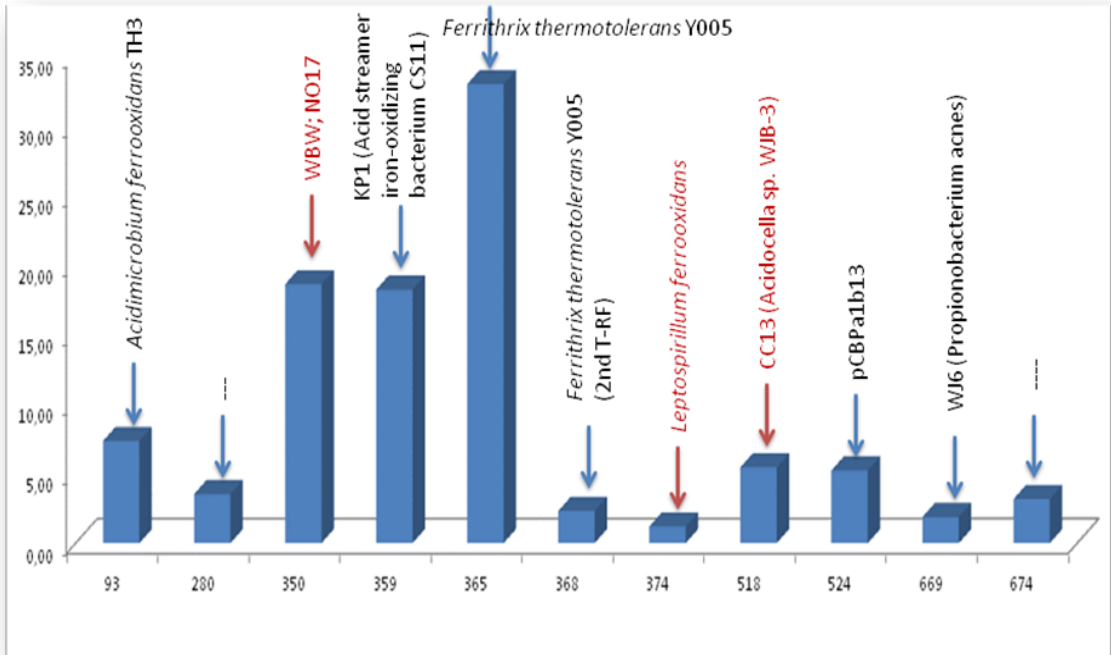
Şekil 4.17 Çan AMD'sinin bakteriyal komünitesinin T-RFLP elektroferogram profili (Hae III ile kesilmiş)



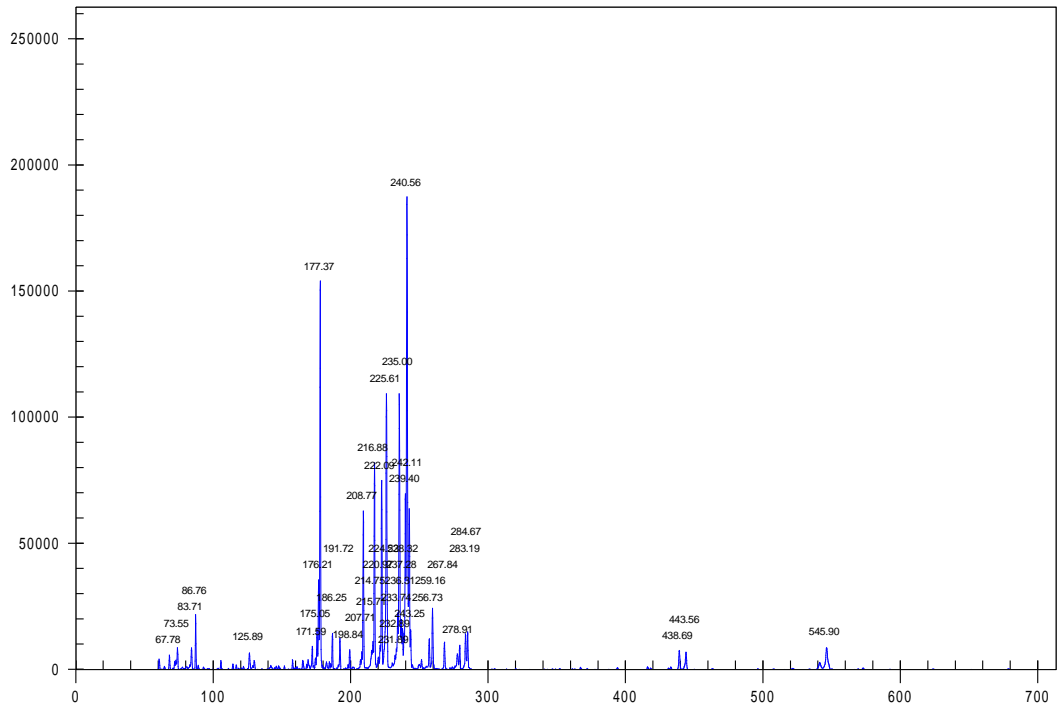
Şekil 4.18 Çan AMD'sinin bakteriyal komünitesinin T-RFLP analizi (HaeIII ile kesilmiş)



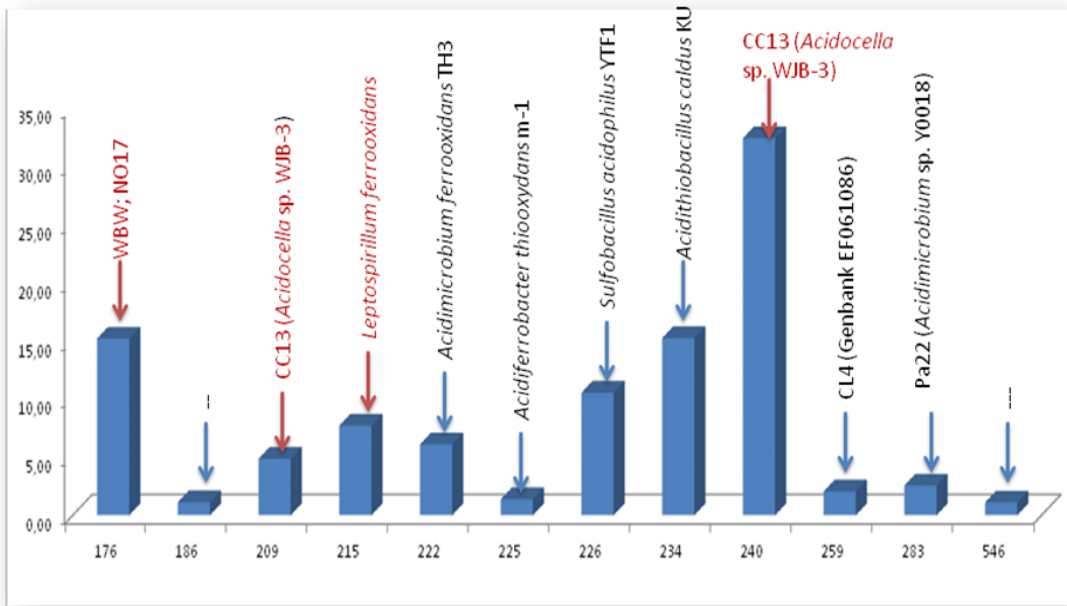
Şekil 4.19 Çan AMD'sinin bakteriyal komünitesinin T-RFLP elektroferogram profili (CfoI ile kesilmiş)



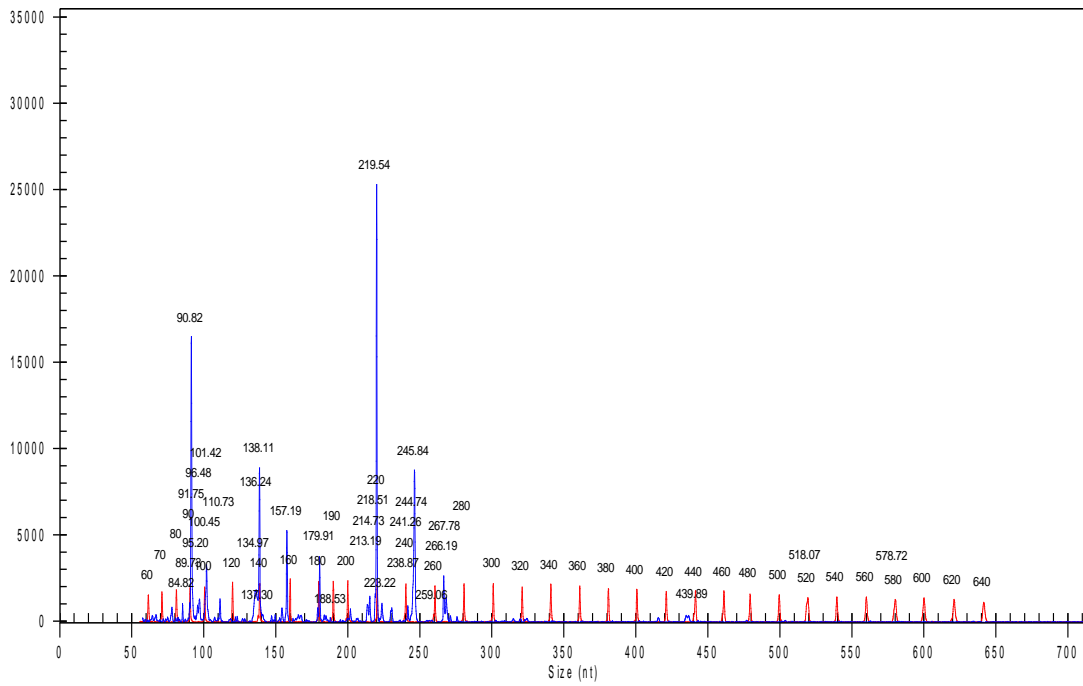
Şekil 4.20 Çan AMD'sinin bakteriyal komünitesinin T-RFLP analizi (CfoI ile kesilmiş)



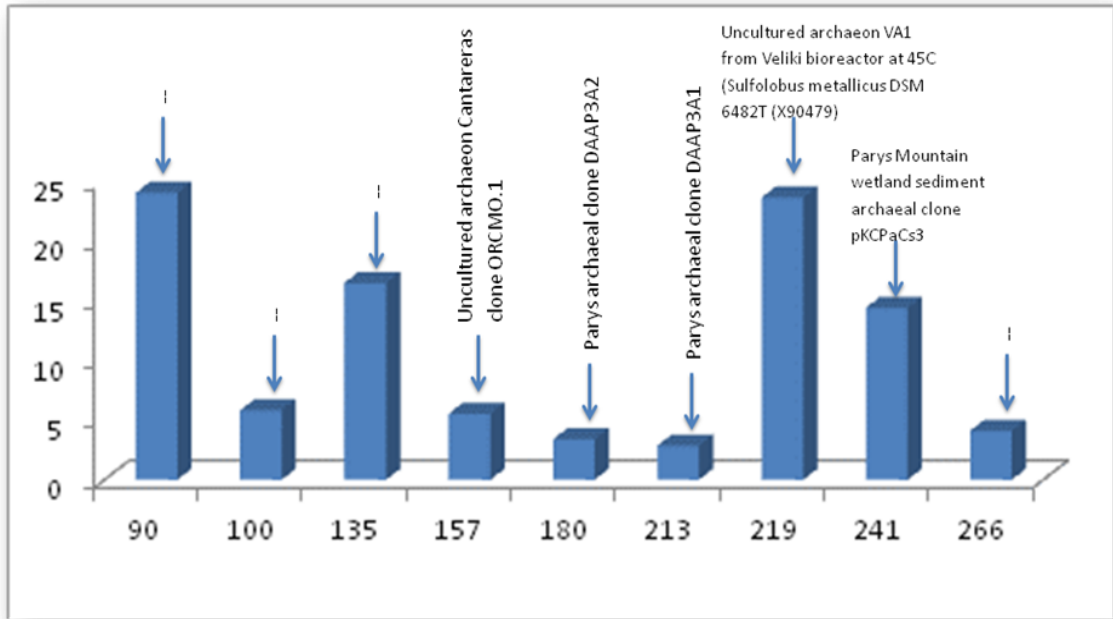
Şekil 4.21 Çan AMD'sinin bakteriyal komünitesinin T-RFLP elektroferogram profili (AluI ile kesilmiş)



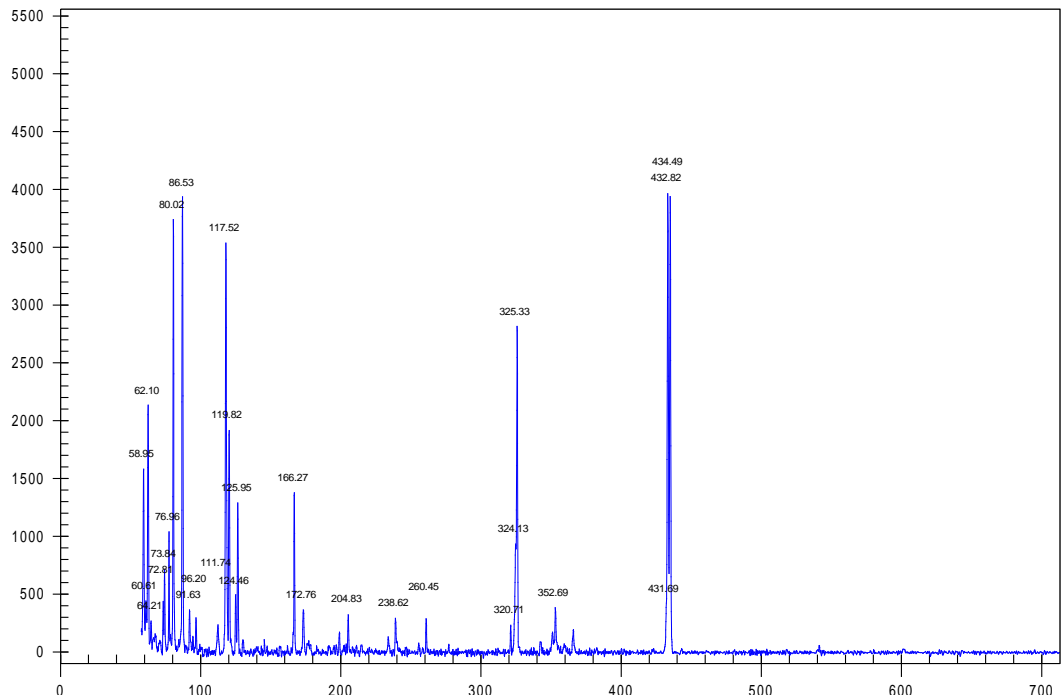
Şekil 4.22 Çan AMD'nin bakteriyel komünitesinin T-RFLP analizi (AluI ile kesilmiş)



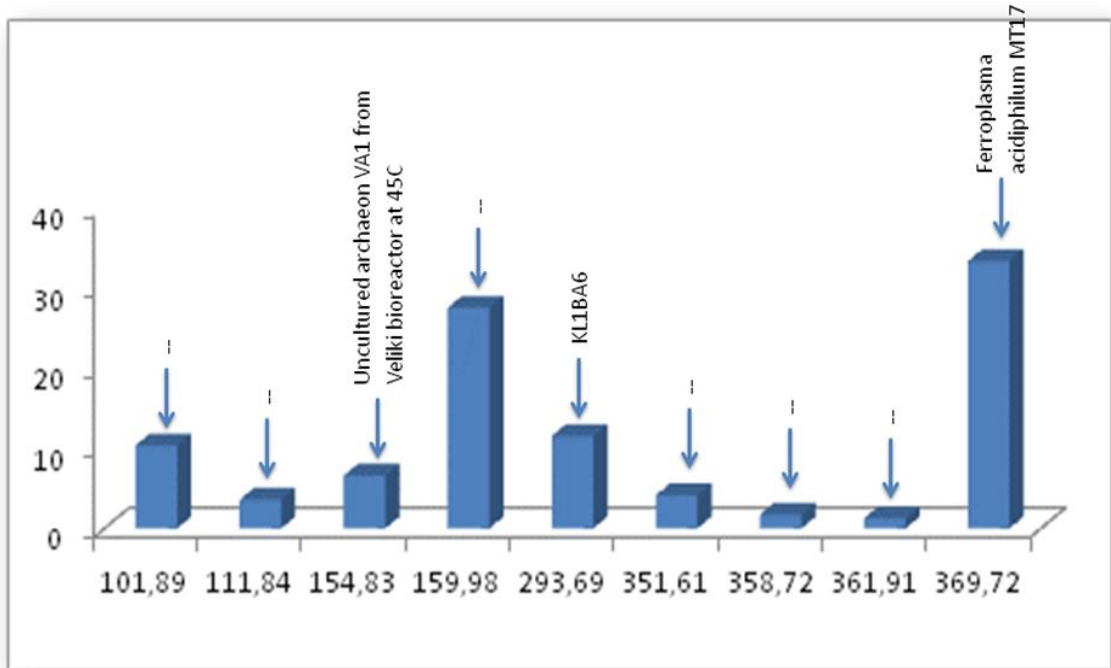
Şekil 4.23 Çan AMD'nin arkeal komünitesinin T-RFLP elektroferogram profili (HaeIII ile kesilmiş)



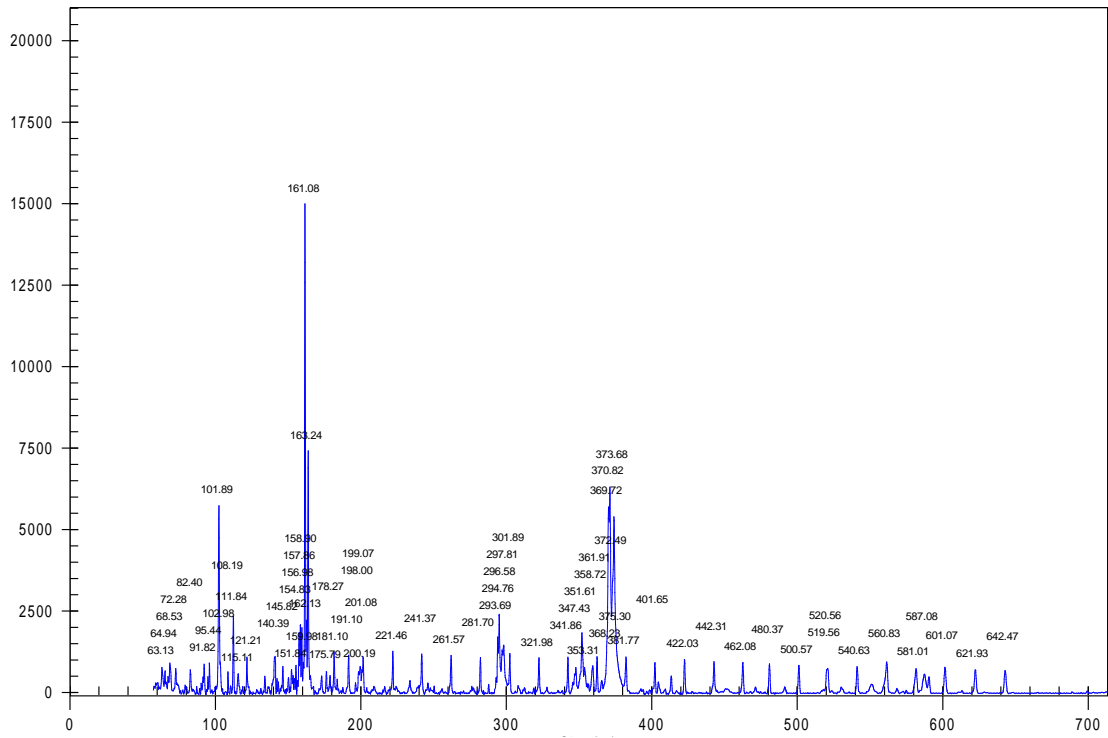
Şekil 4.24 Çan AMD'nin arkeal komünitesinin T-RFLP analizi (HaeIII ile kesilmiş)



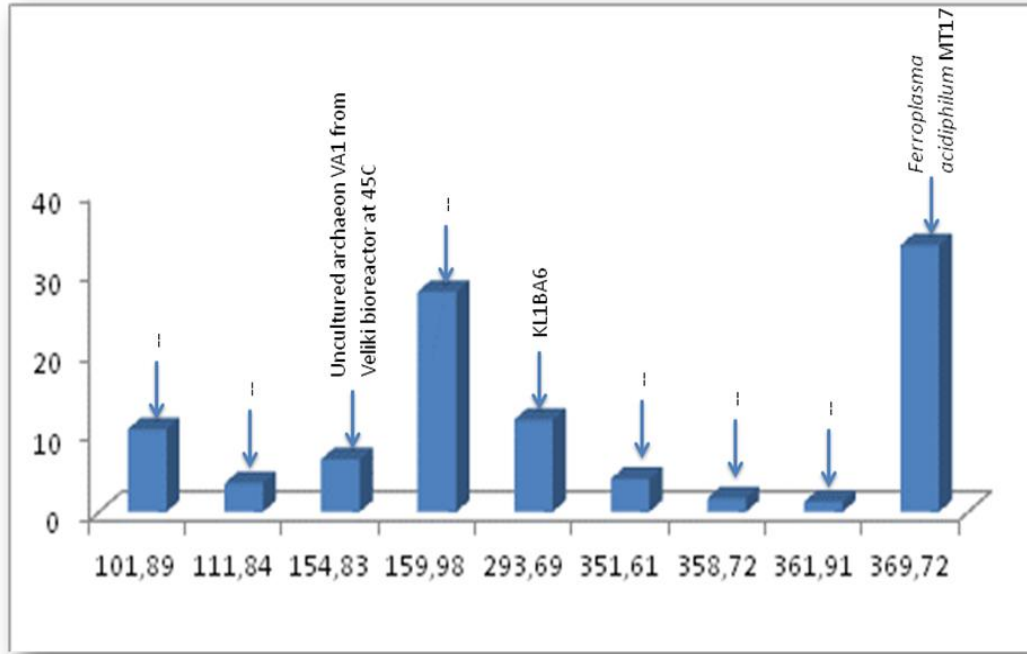
Şekil 4.25 Çan AMD'nin arkeal komünitesinin T-RFLP elektroferogram profili (CfoI ile kesilmiş)



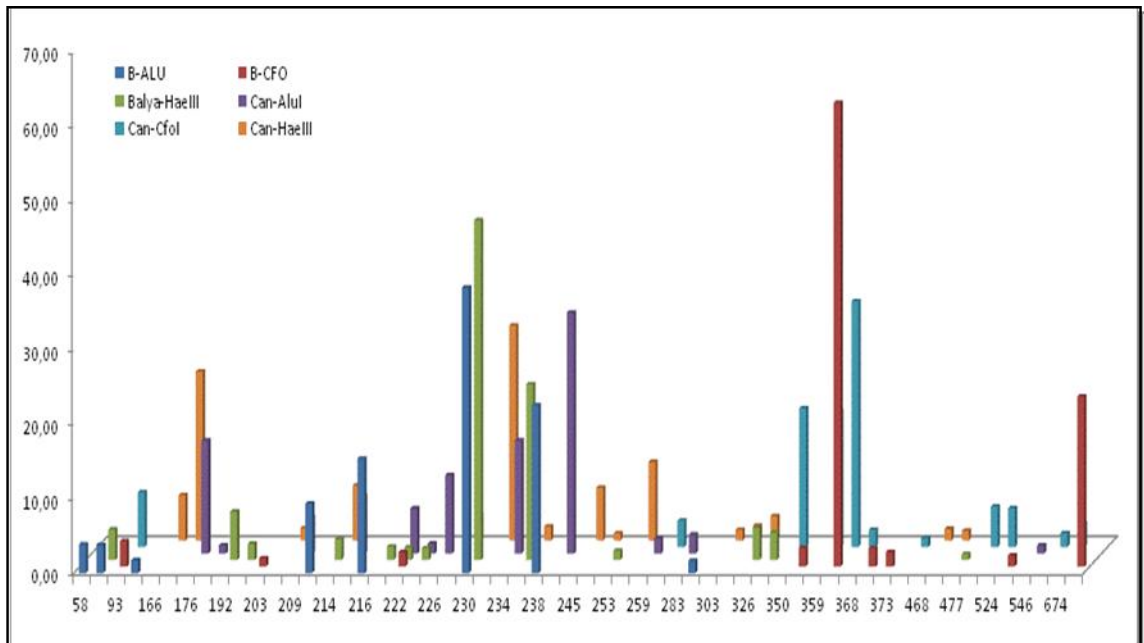
Şekil 4.26 Çan AMD'sinin arkeal komünitesinin T-RFLP analizi (CfoI ile kesilmiş)



Şekil 4.27 Çan AMD'sinin arkeal komünitesinin T-RFLP elektroferogram profili (AluI ile kesilmiş)



Şekil 4.28 Çan AMD'sinin arkeal komünitesinin T-RFLP analizi (AluI ile kesilmiş)



Şekil 4.29 Balya ve Çan AMD'lerinin bakteriyel komünitelerinin T-RFLP analizleri açısından karşılaştırılması

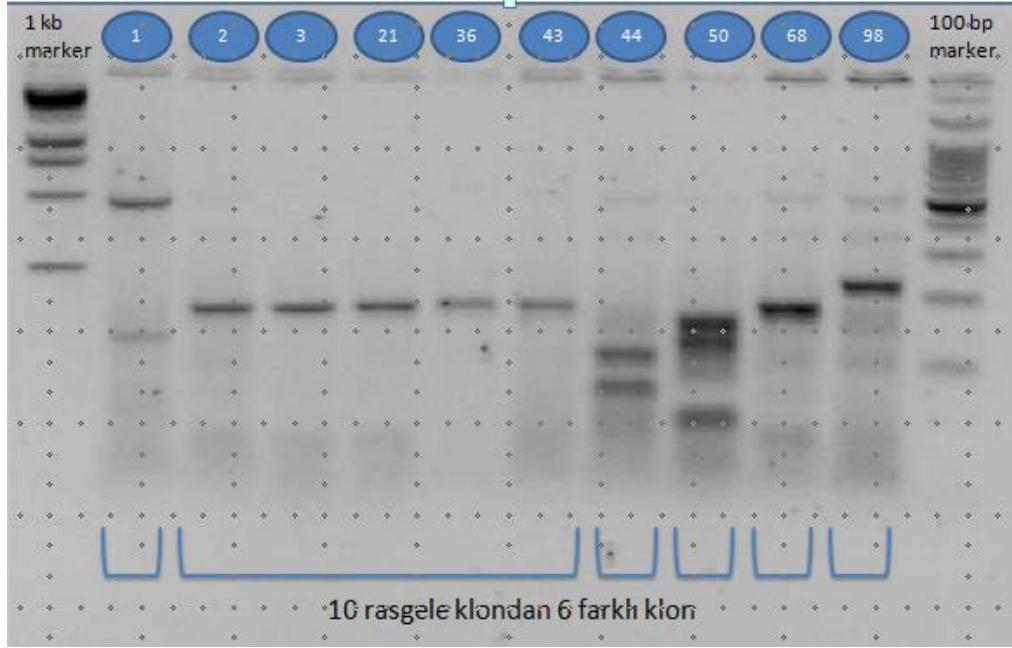
4.3.2.4. 16S Klonlama

Çan'daki bakteriyel çeşitliliğin 16S klonlama yöntemi ile ortaya çıkarılması amacı ile LB petrilerinde 16S rRNA PCR ürünleri taşıyan beyaz kolonilerden (her bir petride yaklaşık 100 civarında beyaz koloni elde edilmiştir). Bu 100 koloniden temsili ve rasgele 10 koloni seçilmiş, X-Gal ve ampisilin içeren yeni LB ortamlarına transfer edilmişlerdir. 37 °C'de 1 gece inkübasyondan sonra beyaz kolonilerden oluşan petriler 1 gece +4 °C'de bekletilip bu kolonilerin mavi renge dönüp dönmediği kontrol edilmiştir. Daha sonra bu klonların her birinden PCR kurularak bunların istenilen büyüklükte inserte sahip olup olmadıkları kontrol edilmiştir.

i) Klonlara ait 16S rRNA geni amplifikasyonu ürünlerinin enzimatik kesimi (T-RFLP)

Klonlardaki 16S rRNA geni için elde edilen PCR ürünlerinin restriksiyon analizleri için MspI ve HaeIII enzimleri kullanılmıştır. Restriksiyon kesimleri sonrası %2 lik agaroz jelle yüklenerek yürütülmüş olan jel görüntüsü Şekil 4.30'de verilmiştir.

Restriksiyon enzimleri kesim sonrasında elde edilen her klonun verdiği kesim profili benzerliklerine göre gruplandırılmıştır. Bu gruplandırmalardan sonra hangi klonlardan plazmid ekstraksiyonu ve bunu takiben dizi analizi yapılacağına karar verilmiştir. RFLP sonuçlarına göre Çan-Bacteria için hazırlanan gen kütüphanesinde 6 patterne sahip klon olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.30 Çan'daki bakteriyel klonların enzimatik kesim profilleri

ii) Rekombinant plazmidlerin klonlardan ekstraksiyonu ve saflaştırılması

RFLP sonuçlarına göre gruplara ayrılmış olan klonların her biri için bir temsilci seçilmiş ve bunlardan plazmid izolasyonu ve bunu takiben dizi analizi yapılmasına karar verilmiştir. Plazmid izolasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrolü amacıyla ekstraktlardan %1'lik agaroz jellere yükleme yapılmış ve uygun büyüklükte vektörün olup olmadığı marker yardımıyla belirlenmiştir.

iii) 16S rRNA genlerinin dizi analizleri

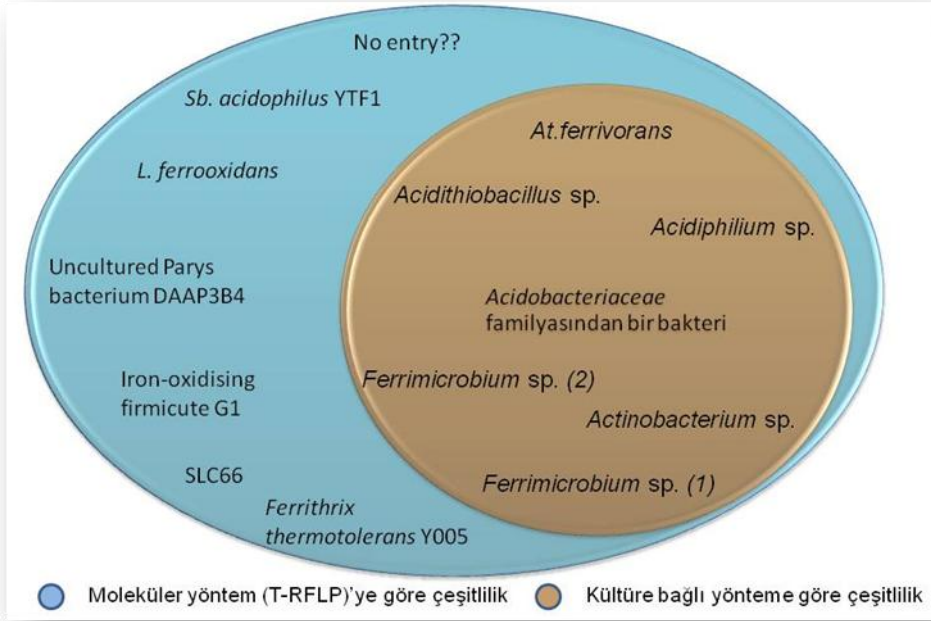
Uygun büyüklükte vektöre sahip olan klonlardan dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu dizi analiz sonuçları BLAST programı ile değerlendirilerek her bir klonun gen bankasında benzerlik gösterdiği türler belirlenmiştir. Çizelge 4.7'de Archaea ve Bacteria için yapılan dizi analizleri sonuçlarına göre bu klonların benzerlik gösterdiği türler gösterilmektedir.

Çizelge 4.7 Çan AMD'sinin bakteriyel klonlarının benzerlik gösterdiği türler

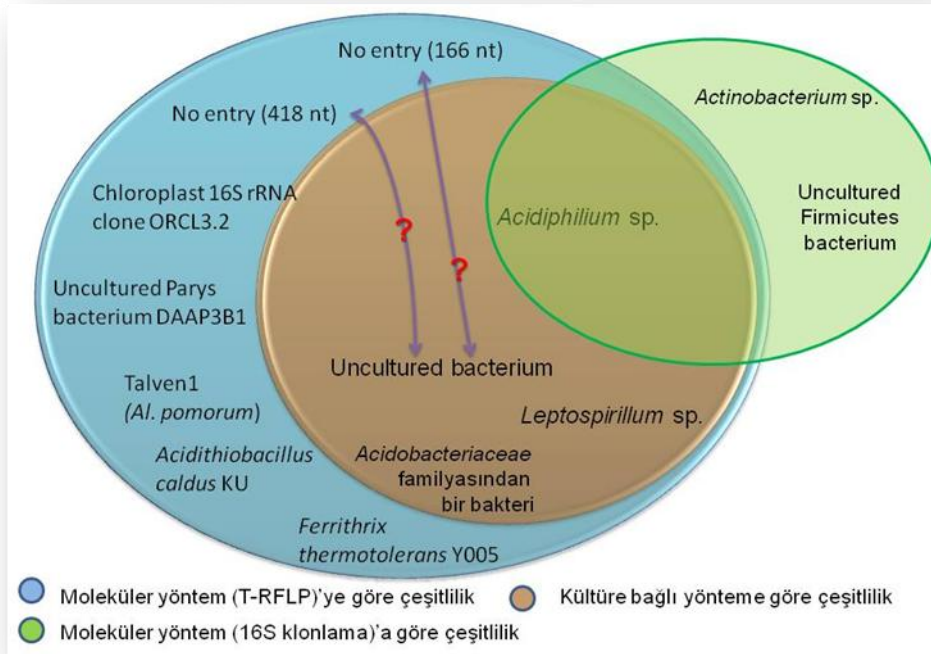
Klon adı	Primer seti	Accession no	Gen bankasındaki en yakın karşılığı	Benzerlik
1	T7-SP6	AM706669.1	Uncultured <i>Firmicutes</i> bacterium partial 16S rRNA gene, clone firmicutes	%97
3	T7-SP6	JX989228.1	Uncultured <i>Acidiphilium</i> sp. clone LVEg10 16S ribosomal RNA gene (%100) <i>Acidiphilium</i> sp. CCP3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (%99)	%100
44	T7-SP6	-	-	-
50	T7-SP6	-	-	-
68	T7-SP6	JX989228.1	Uncultured <i>Acidiphilium</i> sp. clone LVEg10 16S ribosomal RNA gene (%100) <i>Acidiphilium</i> sp. CH3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (%98)	%100
98	T7-SP6	GU168006.1	<i>Actinobacterium</i> BGR 96 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%99

4.3.3. AMD örneklerinde kültüre bağımlı ve kültürden bağımsız prokaryotik çeşitliliğin karşılaştırılması

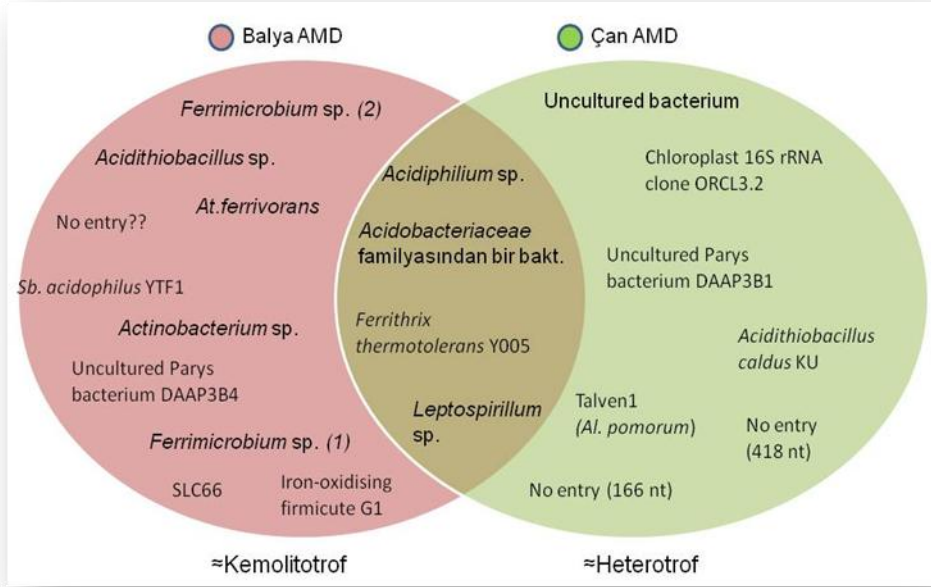
Balya ve Çan'daki mevcut bakteri ve arke çeşitliliğinin hem yönetsel hem de lokalite açısından karşılaştırılması Şekil 4.31-4.34'de şematize edilmiştir. Şekil 4.31; Balya AMD'sinin, Şekil 4.32 ise Çan AMD'sinin kültüre bağımlı ve moleküler yöntemlere göre elde edilen bakteri çeşitliliğinin karşılaştırılmasını gösterirken Şekil 4.33; Balya ve Çan AMD'lerindeki mevcut bakteri çeşitliliğinin karşılaştırılmasını şematize etmektedir. Şekil 4.34 ise T-RFLP analizi yapılarak ortaya çıkarılan Çan'daki mevcut arkeal çeşitliliği göstermektedir.



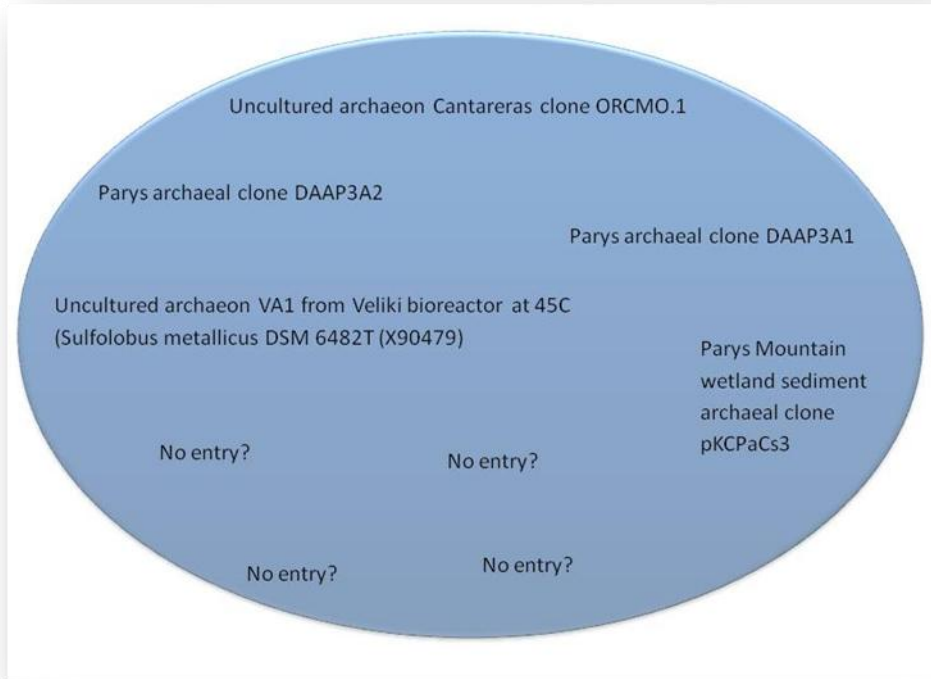
Şekil 4.31. Balya AMD'sinin kültüre bağımlı ve moleküler yöntemlere göre elde edilen bakteri çeşitliliğinin karşılaştırılması



Şekil 4.32. Çan AMD'sinin kültüre bağımlı ve moleküler yöntemlere göre elde edilen bakteri çeşitliliğinin karşılaştırılması



Şekil 4.33. Balya ve Çan AMD'lerinin bakteri çeşitliliğinin karşılaştırılması



Şekil 4.34. Çan AMD'sinin arkeal çeşitliliğinin karşılaştırılması

4.4. Biyodesülfürizasyon Deneyleri

Desülfürizasyon yeteneğine sahip olan mikroorganizmaların istekleri göz önüne alındığında, tez çalışması için seçilen asidik maden drenajları uygun ortamlardır. İzole edilen asidofil mikroorganizmalar arasında kükürdü okside edebilen tek suşa rastlanmıştır. Bu nedenle desülfürizasyon çalışmaları bu izolatla gerçekleştirilmiştir.

Kömürlerdeki inorganik bileşenlerin cins ve miktarları, bilindiği gibi, kömürlerin jeolojik, kimyasal ve teknolojik özelliklerinin belirlenmesi açısından önemlidir. Toz ve kil difraktogramlarında tanımlanan kömür örneği; %70–75 civarında huminit, %5 liptinit ve %3–4 inertinit grubu maserallerden oluşan, rasgele huminit yansıtma değeri %0,0524 olarak ölçülen organik madde, yaklaşık %10 civarında kil, kuvars ve kalsit mineralleri ile %6–8 oranında frambodial piritler ve demir hidroksit minerallerinden oluşmaktadır.

Kömürün major (%) ve minör element (ppm) içeriği ise;

Na ₂ O (%)	8,7	As (ppm)	163
MgO (%)	2,5	Ba (ppm)	298
Al ₂ O ₃ (%)	14,0	Cr (ppm)	151
SiO ₂ (%)	43,1	Cu (ppm)	73
K ₂ O (%)	0,6	Mo (ppm)	15
P ₂ O (%)	0,2	Pb (ppm)	21
CaO (%)	6,9	Sr (ppm)	1515
TiO ₂ (%)	0,9	Rb (ppm)	55
SO ₃ (%)	10,1	Th (ppm)	32
Fe ₂ O ₃ (%)	7,2	U (ppm)	25
MnO (%)	<0,1	V (ppm)	260
		Y (ppm)	12
		Zn (ppm)	148

Kömürlerdeki kül içeriği genellikle esas ve eser element içeriği ile ilgilidir. Genel olarak kül içeriği ile önemli pozitif korelasyon gösteren elementler inorganik, negatif korelasyona sahip olanlar ise organik birlikteliği ifade etmektedir (Atalay, 2007).

Gerçekleştirilen optimizasyonda etkili olduğu düşünülen tüm parametreler (pH, inokulum miktarı, pulp yoğunluğu, kömür partikül boyutu, inkübasyon süresi) aynı anda birbirleri ile kombine edilerek deneysel tasarım sayesinde ortogonal array deney seti oluşturularak çalışılmıştır. Bu deney setinde oluşturulan kontrol (bakteri inokulum yapılmamış) ve deney gruplarının (bakteri inokulum yapılmış) 15 günlük inkübasyonları sonunda elde edilen pH değerleri çizelge 4.8’de verilmiştir.

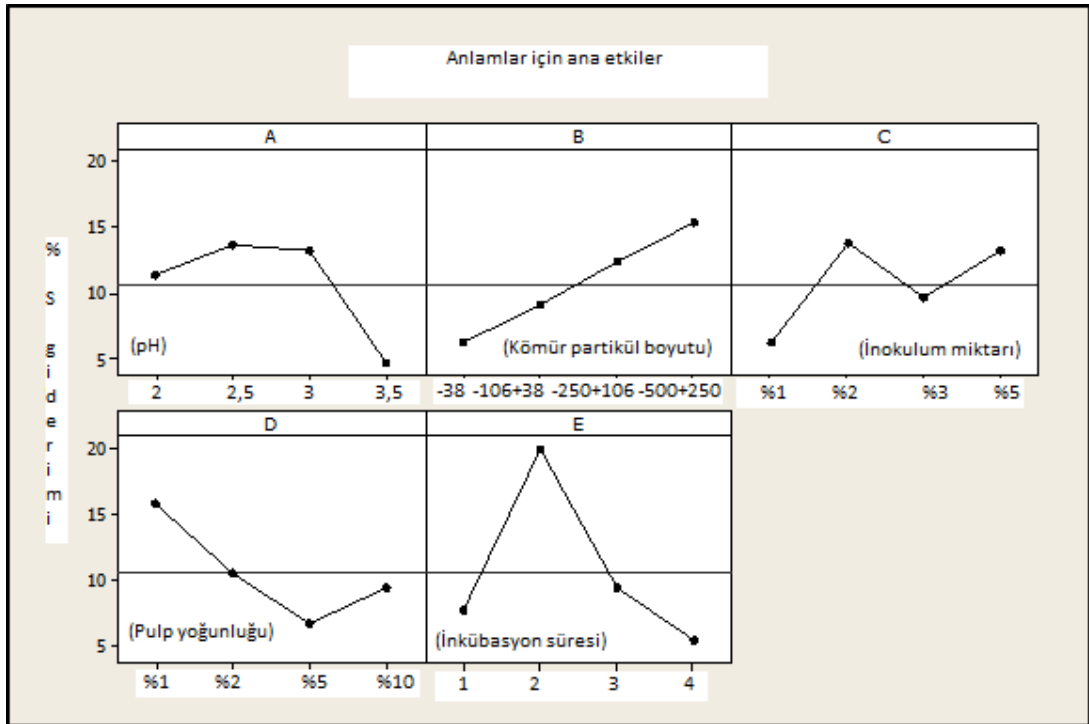
Çizelge 4.8 Kontrol ve deney gruplarında inkübasyon sonrası pH’larında gözlenen değişiklikler

Deney no	İnkübasyon öncesi pH	İnkübasyon sonrası pH (kontrol grubu)	İnkübasyon sonrası pH (deney grubu)
1	2	2,56	2,52
2	2	3,35	3,13
3	2	3,79	3,57
4	2	5,39	5,90
5	2,5	3,32	3,27
6	2,5	7,52	7,67
7	2,5	3,25	2,61
8	2,5	2,84	2,78
9	3	3,75	3,63
10	3	7,65	7,37
11	3	3,34	3,23
12	3	3,27	2,64
13	3,5	3,25	3,23
14	3,5	3,29	3,20
15	3,5	7,69	7,48
16	3,5	5,84	5,49

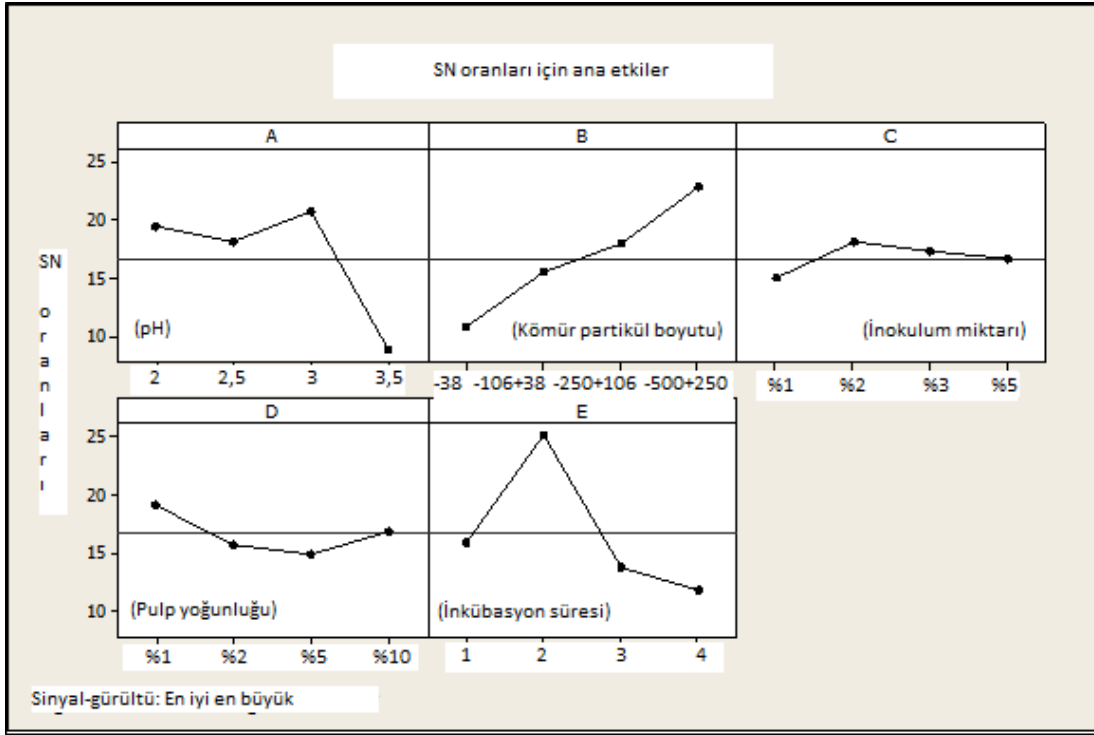
Dr. Genichi Taguchi tarafından geliştirilen bu yaklaşımda, sonuçları analiz edebilmek için S/G oranı olarak bilinen bir istatistiksel performans ölçüsü kullanılmıştır. Deneylerden elde edilen sonuçlar sinyal/gürültü oranına (S/G) çevrilerek değerlendirme

yapılmıştır. S/G oranındaki S sinyal faktörünü, G ise gürültü faktörünü ifade etmektedir. Sinyal faktörü sistemden alınan gerçek değeri, gürültü faktörü ise deney tasarımına katılamayan fakat deney sonucuna etki eden faktörleri ifade etmektedir. Gürültü kaynakları, elde edilmek istenen performans özelliklerinin hedef değerden sapmasına sebep olan tüm değişkenlerdir. O halde S/G oranındaki gürültü faktörlerini, elde eden G değeri ne kadar küçük olursa istenen hedef değere o kadar yaklaşmış olur. Dolayısı ile bu analizde amaç S/G oranının maksimize etmektir. Bu çalışmada “en büyük en iyi” kriteri kullanılmıştır.

Şekil 4.35, optimizasyon deneyinde değerlendirilen parametreler ve ana etki grafikleri göstermektedir. Şekil 4.36, incelenen parametrelerin SN oranları açısından değerlendirilmesini göstermektedir.



Şekil 4.35. Optimizasyon deneyinde değerlendirilen parametreler ve ana etki grafikleri



Şekil 4.36 İncelenen parametrelerin SN oranları açısından değerlendirilmesi

Taguchi yaklaşımı kullanılarak gerçekleştirilen deneysel tasarımda (L_{16}) ortogonal dizini ile tüm parametrelerin birbiri ile kombine edildiği 16 farklı deney seti oluşturulmuş ve her bir deney 3 kez tekrarlanmıştır. Bu deneylerin sonuçları ise Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Oluşturulan deney setinde yer alan her bir denemenin toplam kükürt giderim sonuçlarına bakılmış ve değerlendirilmiştir. Çizelge 4.10, anlamlar için yanıt tablosunu göstermektedir. Buna göre optimizasyon parametrelerinden en etkilisinin inkübasyon süresi olduğu belirlenmiştir. Etkinliklerine göre diğer parametreler ise sırası ile, pulp yoğunluğu, kömür partikül boyutu, pH ve inokulum miktarı olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.9 Taguchi dizaynına göre optimizasyon deneylerinde kullanılan parametre, düzey ve %desülfürizasyon ölçüm değerleri

Deney no	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	1. ölçüm	2. ölçüm	3. ölçüm
1	2	-38	%1	%1	1	%4,452	%5,219	%4,153
2	2	-106+38	%2	%2	2	%22,022	%20,255	%23,681
3	2	-250+106	%3	%5	3	%6,168	%6,943	%6,943
4	2	-500+250	%5	%10	4	%15,477	%11,942	%8,423
5	2,5	-38	%2	%5	4	%1,482	%4,704	%2,669
6	2,5	-106+38	%1	%10	3	%3,327	%3,951	%7,470
7	2,5	-250+106	%5	%1	2	%34,202	%34,463	%28,203
8	2,5	-500+250	%3	%2	1	%14,224	%15,312	%13,136
9	3	-38	%3	%10	2	%15,172	%14,152	%17,419
10	3	-106+38	%5	%5	1	%7,007	%7,229	%6,489
11	3	-250+106	%1	%2	4	%5,501	%4,711	%5,107
12	3,5	-500+250	%2	%1	3	%29,408	%22,331	%22,331
13	3,5	-38	%5	%2	3	%0,857	%0,630	%2,218
14	3,5	-106+38	%3	%1	4	%2,365	%1,911	%1,599
15	3,5	-250+106	%2	%10	1	%6,121	%7,593	%2,175
16	3,5	-500+250	%1	%5	2	%8,882	%11,976	%9,456

Minitab'ta yapılan analiz sonucunda desülfürizasyon açısından etkin izolatin pH 2,5'da, %2 inokulum ile 2 haftalık inkübasyon süresi sonunda %1 pulp yoğunluğunda -500+250 µm partikül boyutunda kömürü optimum desülfürize edebildiği belirlenmiştir. Bu parametreler kullanılarak gerçekleştirilecek doğrulama deneyinde elde edilmesi düşünülen desülfürizasyon sonucu %35,8227'dir. Doğrulama deneyinde ise % 33,37 elde edilmiştir. Dolayısı ile doğrulama deneyinde elde edilen sonuçların güven aralığında olduğunu söyleyebiliriz.

Çizelge 4.10 Anlamlar için yanıt tablosu

	Faktörler				
Düzeyley	A	B	C	D	E
1	11,307	6,094	6,184	15,187	7,760
2	13,596	8,943	13,732	10,638	19,991
3	13,072	12,345	9,613	6,663	9,382
4	4,649	15,242	13,095	9,436	5,491
Delta	8,947	9,148	7,547	9,224	14,49
Derece	4	3	5	2	1

Bulunan veriler ışığında Minitab'te yapılan varyans analizi sonucunda parametrelerin F değerleri (47,65 – 44,51 – 34,11 – 41,87 – 115,72) elde edilmiştir. Ayrıca P değerinin 0.05'ten küçük olması faktörlerin anlamlı olduğunu kanıtlamaktadır. Standart hata 2,0688, R^2 değeri %96,38, ayarlanmış R^2 değeri de %94,68 olarak bulunmuştur. Bu iki ayrı R^2 değerinin birbirine yakın olması ve yüksek değerde olması deneyin güvenilirliğinin bir göstergesidir. Varyans analizi Çizelge 4.11'de gösterilmiştir. Varyans analizinde “Genel Lineer Model” kullanılmıştır.

Çizelge 4.11 Varyans analizi (Genel lineer modele göre)

Parametre	Serbestlik derecesi	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F faktörü	P değeri
A	3	611,81	611,81	203,94	47,65	0,000
B	3	571,52	571,52	190,51	44,51	0,000
C	3	437,94	437,94	145,98	34,11	0,000
D	3	537,54	537,54	179,18	41,87	0,000
E	3	1485,87	1485,87	495,29	115,72	0,000
Hata	32	136,96	136,96	4,28		
Toplam	47	3781,64				

$$S = 2,06880 \quad R-Sq = \%96,38 \quad R-Sq(adj) = \%94,68$$

4.4.1. Seçilen izolatan farklı kömür örnekleri kullanılarak biyodesülfürizasyon etkinliğinin belirlenmesi

Bu deneyde *At. ferrivorans* biyokütlesinin, farklı oranlarda kükürt içeren kömürler üzerinde kükürt giderimi açısından nasıl bir etki gösterdiği değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.12 Farklı kükürt miktarlarına sahip kömürlerin *At. ferrivorans* bakterisi ile desülfürizasyona tabi tutulması ile elde edilen %kükürt giderimleri

	pH (Kontrol)	pH (Biyolojik işlem sonrası)	Toplam kükürt değeri (% wt)	Desülfürizasyon sonrası toplam kükürt değeri (% wt)
Artvin–Antrasit	2,83	2,40	2,58	2,34
Çan–linyit	2,42	2,41	5,95	5,83
Mihalıççık–2.rezerv–linyit	3,15	2,67	2,73	2,09
Tunçbilek–linyit	2,57	2,43	0,83	0,81
Gediz (yüksek piritli kömür)–linyit	2,97	2,32	6,87	5,82

Artvin, Çan, Mihalıççık, Tunçbilek, Gediz kökenli kömürler biyolojik işleme tabi tutulmuştur. Uygulanan biyolojik işlem sonrası pH değişimlerine de bakılmıştır. pH değişimleri ve kükürt miktarlarındaki değişimleri Çizelge 4.12’de gösterilmiştir. Özellikle Mihalıççık’ın farklı bir rezervinden alınan kömür ile yüksek piritik kükürt oranına sahip Gediz kömürleri üzerinde *At. ferrivorans* bakterisi ile desülfürizasyonda olumlu yönde sonuç verdiği bulunmuştur. Diğer kömür tiplerinde uygulanan biyolojik işlem ile çok yüksek bir kükürt giderimi elde edilmemiştir. Pirit oranı yüksek olan kömürlerde bakterinin kömüre uygulanabilirliği daha çok önem kazanmıştır.

4.4.2. Kömürdeki kükürt miktarının biodesülfürizasyona etkisi

Kömür desülfürizasyonunun gerçekleştirildiği besiyerlerinde mikrobiyal büyümeden dolayı oluşan renk değişimi Şekil 4.37’de gösterilmiştir. Başlangıçta

besiyerinde yer alan Fe^{+2} bakterinin metabolizması sayesinde oksidasyona uğrayarak Fe^{+3} formuna dönüşmektedir. Gözlenen renk değişimi hatta bazı örneklerde Fe^{+3} presipitatların görülmesi bakteriyel metabolizmanın fiziksel göstergesidir. Kükürt gideriminin de gerçekleştiği erlenlerdeki besiyerleri sarıya dönüşmüştür. Özellikle Şekil 4.37a ve Şekil 4.37f'de bakteri inokulumunun yapıldığı erlenlerdeki kontrole göre sarı renge dönüşmesi daha çarpıcı bir şekilde görülmektedir. Desülfürizasyonun gerçekleşmediği ya da diğerlerine göre daha az olduğu kömür örnekleri içeren besiyeri rengine çok fazla bir değişiklik olmamıştır.



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

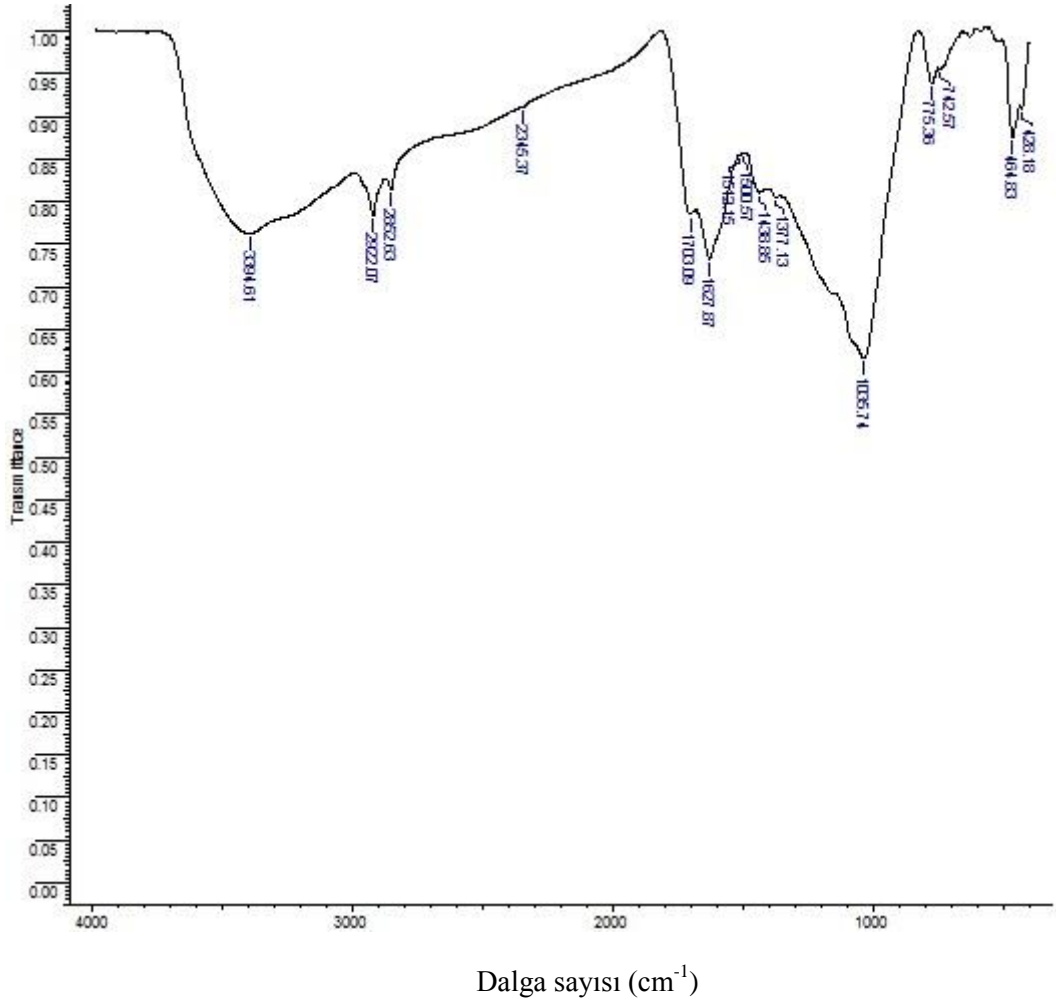
Şekil 4.37. Farklı tipte kömürlerin desülfürizasyon sonrası kültür sıvısı görüntüleri (a) Desülfürizasyon optimizasyonunda kullanılan Mihaliççık kömürü (Kontrol-örnek) (b) Artvin-antrasit kömürü (Kontrol-örnek) (c) Çan-lyinyit kömürü (Kontrol-örnek) (d) Mihaliççık-lyinyit (2.rezerv) (Kontrol-örnek) (e) Tunçbilek-lyinyit (Kontrol-örnek) (f) Gediz-lyinyit kömürü (Kontrol-örnek)

4.4.3. Etkin izolatın metabolik özellikleri ile desülfürizasyon sürecinin ilişkilendirilmesi

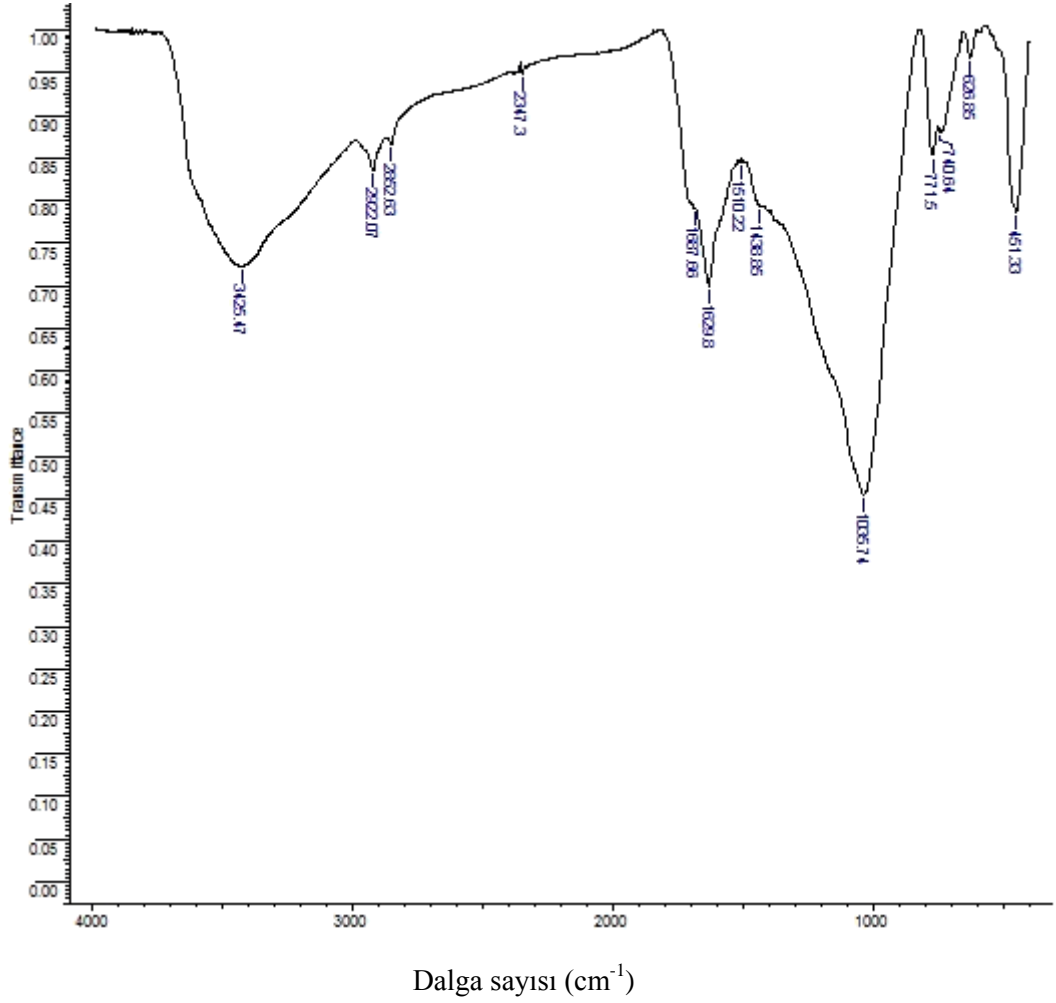
Desülfürizasyon sürecinde kullanılan izolatın metabolik özellikleri ile desülfürizasyon süreci bazı yöntem ve analizlerle ilişkilendirilmiştir.

4.4.3.1. Kömürün Biyodesülfürizasyon öncesi ve sonrası FTIR spektroskopisi

Şekil 4.38, biyodesülfürizasyon işlemine tabi tutulmamış kömürün FTIR görüntüsü, Şekil 4.39 ise mikrobiyal kükürt gideriminin gerçekleştiği kömürün FTIR görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.38. Biyodesülfürizasyon işlemine tabi tutulmamış kömürün FTIR görüntüsü



Şekil 4.39. Mikrobiyal kükürt gideriminin gerçekleştiği kömürün FTIR görüntüsü

Çizelge 4.13’de, FTIR tekniği ile desülfürizasyon öncesi ve sonrası kömür yapısında gözlenen bant pozisyon değişimlerini göstermektedir. Bu çizelgede bant bozisyonlarının yanı sıra bantlara karşılık gelen transmittans değerleri ve bantların yoğunlukları da yer almaktadır. Bazı bölgelerde meydana gelen bant değişimleri ya da kaymaları kükürt giderimi hakkında fikir verebilmektedir.

Çizelge 4.13 FTIR tekniği ile desülfürizasyon öncesi ve sonrası kömür yapısında gözlenen bant pozisyon değişimleri

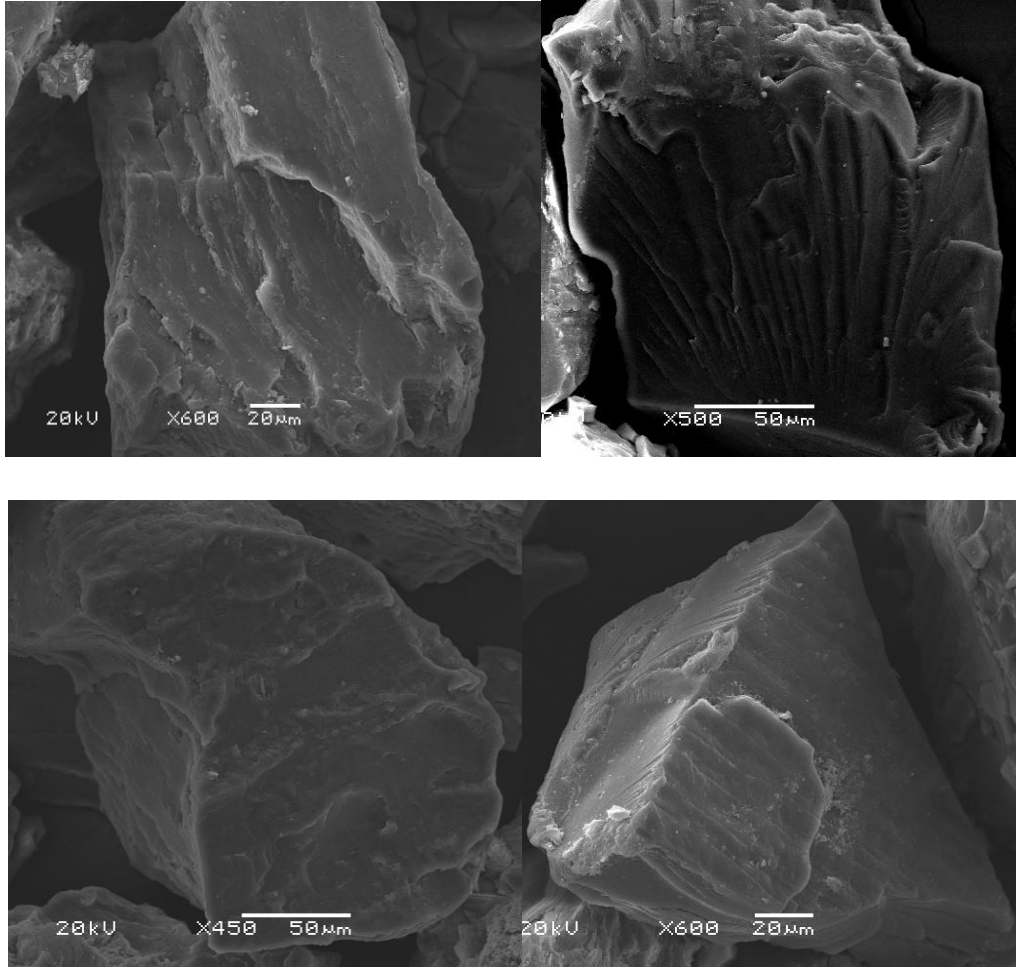
Gözlenen bantlar	Desülfürizasyon öncesi kömür			Desülfürizasyon sonrası kömür		
	Bant	Transmitans	Yoğunluk	Bant	Transmitans	Yoğunluk
O–H gerilmesi	3394	0,763	Güçlü	3425	0,723	Orta
C–H gerilmesi	2922	0,784	Orta	2922	0,836	Orta
C–H gerilmesi	2852	0,814	Orta	2852	0,866	Zayıf
C ≡ N gerilmesi	2345	0,911	Zayıf	2347	0,949	Zayıf
C =O gerilmesi (asit)	1703	0,785	Orta	–	–	–
C = O gerilmesi (açıl klorür)	–	–	–	1687	0,792	Orta
C = C gerilmesi (alken)	1627	0,733	Güçlü	1629	0,700	Orta
NO ₂ gerilmesi veya C = N gerilmesi	1512	0,855	Orta	1510	0,846	Zayıf
NO ₂ gerilmesi veya C = N gerilmesi	1500	0,858	Orta	–	–	–
–CH ₃ eğilmesi	1438	0,811	Orta	1438	0,795	Orta
–CH ₃ eğilmesi (Alifatik C–H düzlem içi eğilmesi)	1377	0,806	Orta	–	–	–

Çizelge 4.13 (devamı) FTIR tekniği ile desülfürizasyon öncesi ve sonrası kömür yapısında gözlenen bant pozisyon değişimleri

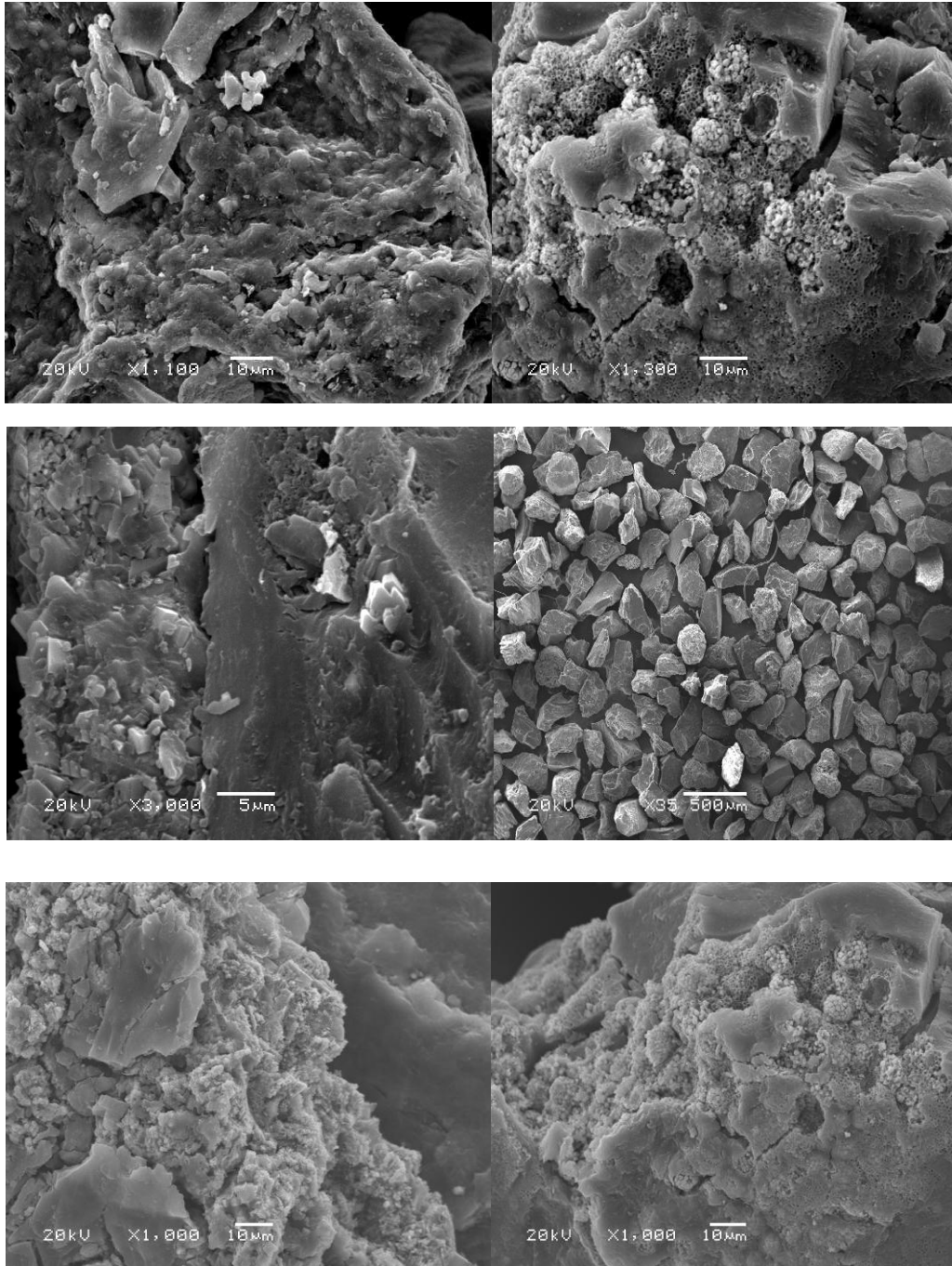
Gözlenen bantlar	Desülfürizasyon öncesi kömür			Desülfürizasyon sonrası kömür		
	Bant	Transmitans	Yoğunluk	Bant	Transmitans	Yoğunluk
S-O gerilmesi (R ₂ SO-sülfoksit) veya SO ₂ simetrik gerilmesi	1035	0,616	Çok güçlü	1035	0,455	Çok güçlü
S-O gerilmesi (fonksiyonlu grup S-O)	775	0,939	Zayıf	771	0,854	Zayıf
S-O gerilmesi (fonksiyonlu grup S-O) veya CH=CH-(cis) bağı ya da C-H düzlem dışı eğilmesi	742	0,956	Zayıf	740	0,881	Zayıf
S-O gerilmesi (R-SO ₂ -OH) veya C-S gerilmesi (fonksiyonlu grup CH-S-) veya C-Cl bağı	-	-	-	626	0,969	Çok zayıf
-	464	0,876	Orta	-	-	-
-	-	-	-	451	0,787	Orta
-	428	0,908	Zayıf	-	-	-

4.4.3.2. Kömürün biyodesülfürizasyon öncesi ve sonrası SEM analizleri

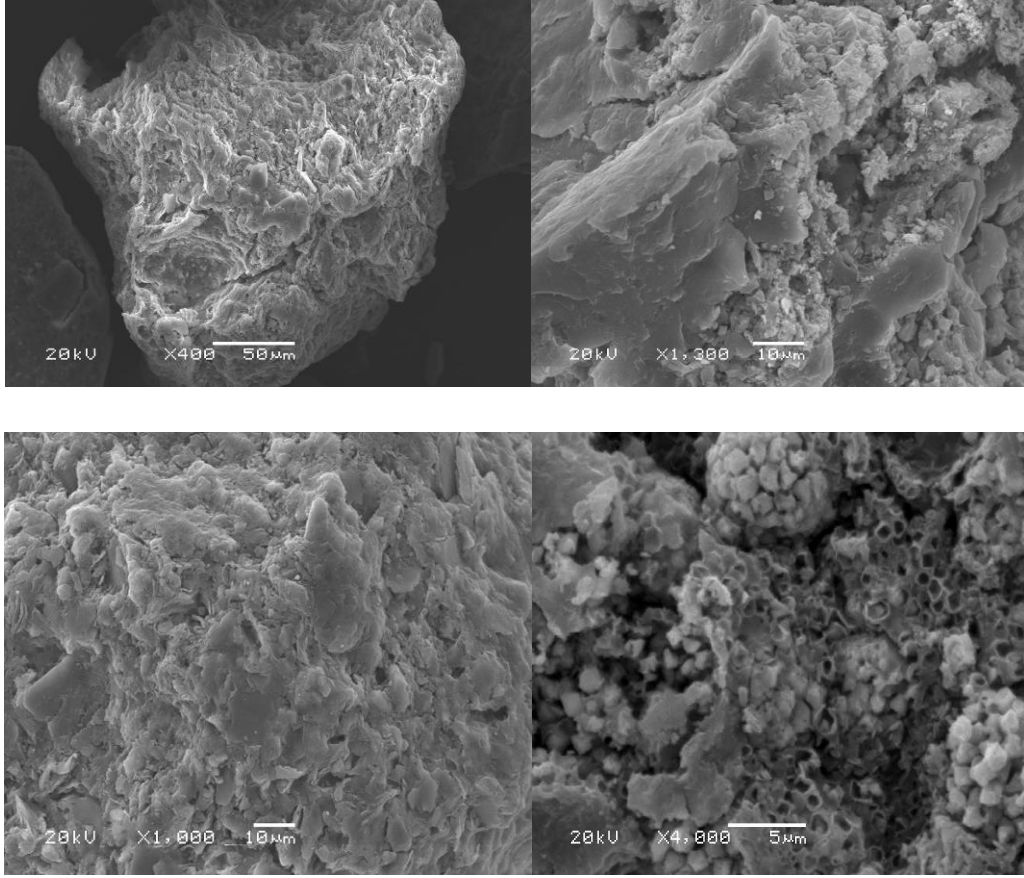
Biyodesülfürizasyon öncesi kömür partikülünün yüzey görüntüleri Şekil 4.40'da gösterilmiştir. *At.ferrivorans* ile gerçekleştirilen desülfürizasyon sonrası bakterinin özellikle pirit kristallerine yaptığı atak ve kömürün yüzeyinde meydana getirdiği korozyon ve deformasyon Şekil 4.41'de görülmektedir.



Şekil 4.40. Desülfürizasyon öncesi pirit kristallerinin farklı büyütmelerde SEM görüntüleri



Şekil 4.41 Desülfürizasyon sonrası pirit kristallerinin farklı büyütmelerde SEM görüntüleri



Şekil 4.41 (devamı). Desülfürizasyon sonrası pirit kristallerinin farklı büyütmelerde SEM görüntüleri

4.4.3.3. Desülfürizasyonda kullanılan besiyerinin Fe^{+2}/Fe^{+3} değişimleri

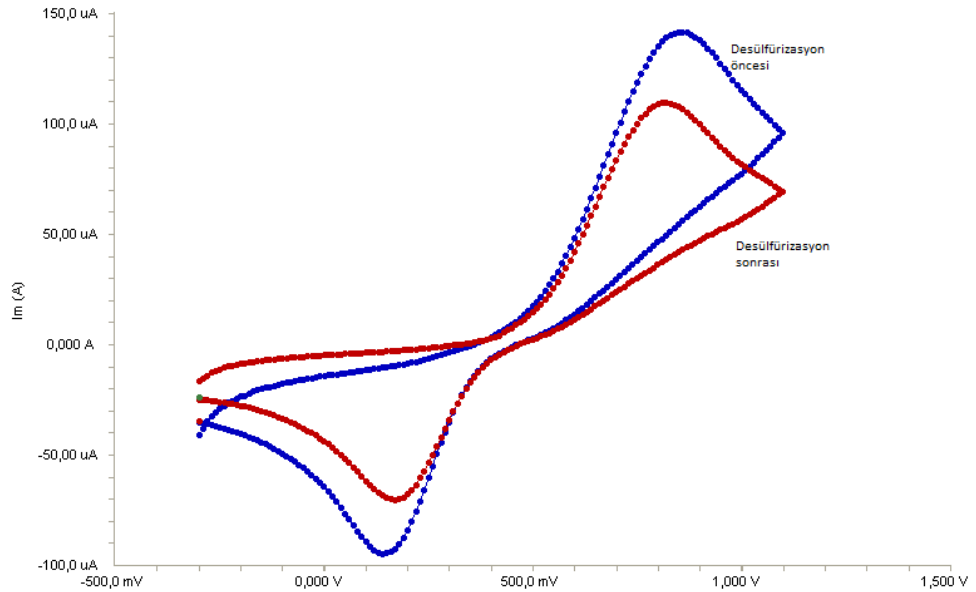
Kömür desülfürizasyonu süresince periyodik aralıklarla (10 ve 15. gün) alınan örneklerde total demir ve Fe^{+2} miktarları Çizelge 4.14'te verilmiştir.

Çizelge 4.14 Total Fe ve Fe⁺² miktarlarının desülfürizasyon süreci boyunca değişimi

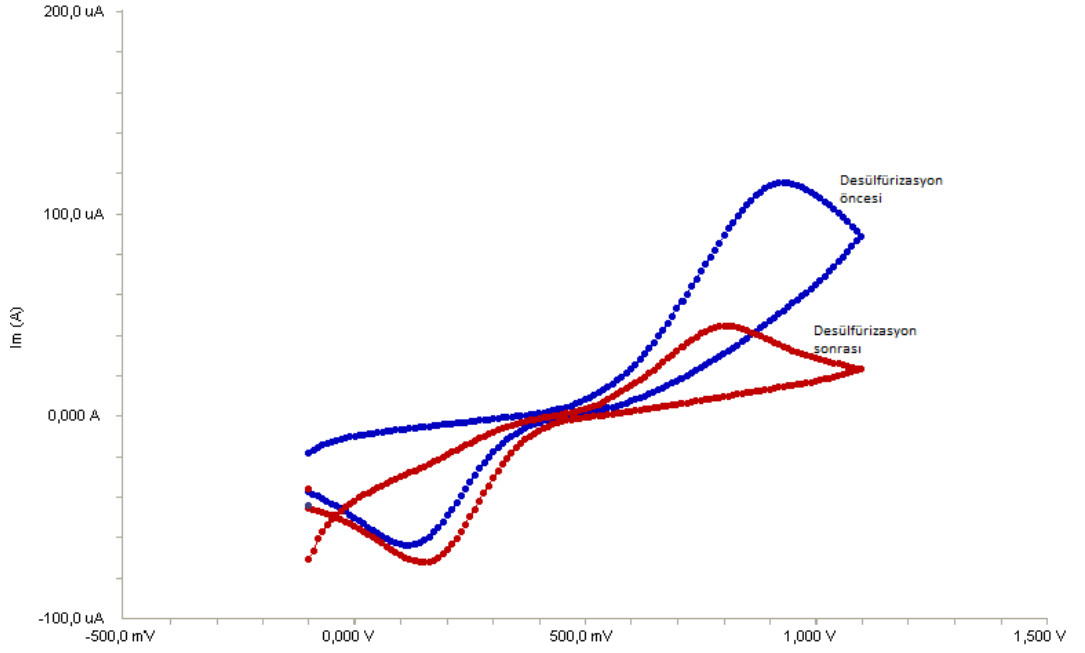
	Toplam Fe	Fe ⁺²	Fe ⁺³	Toplam Fe	Fe ⁺²	Fe ⁺³
	10. gün	10. gün	10. gün	15. gün	15. gün	15. gün
Kontrol (mg/L)	3399	1325	2074	2531	1227	1304
Deney (mg/L)	3439	158	3281	1933	3,2	1929

4.4.3.4. Desülfürizasyonda dönüşümlü voltametri ölçümleri

Desülfürizasyonda kullanılan besiyerinin ve kültür sıvısının 1 ve 2 haftalık kültür sıvısının -0,3 ile +1,1 V gerilim aralığında 50 mV/s tarama hızı uygulanarak dönüşümlü voltamogramı alınmış ve bunlar Şekil 4.42 ve 4.43’de gösterilmiştir.



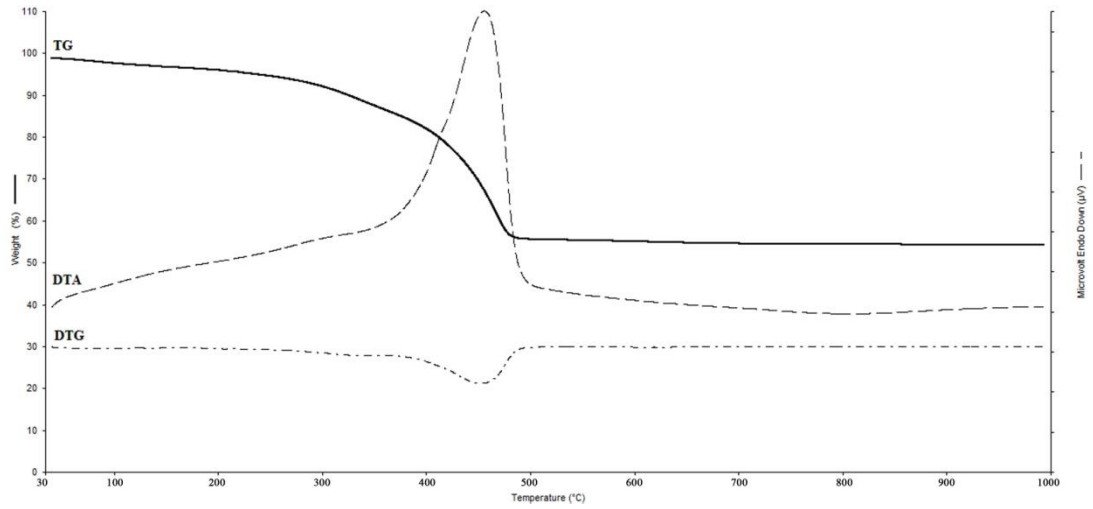
Şekil 4.42. Desülfürizasyonda kullanılan besiyerinin ve 1 haftalık kültür sıvısının dönüşümlü voltamogramı (demir için)



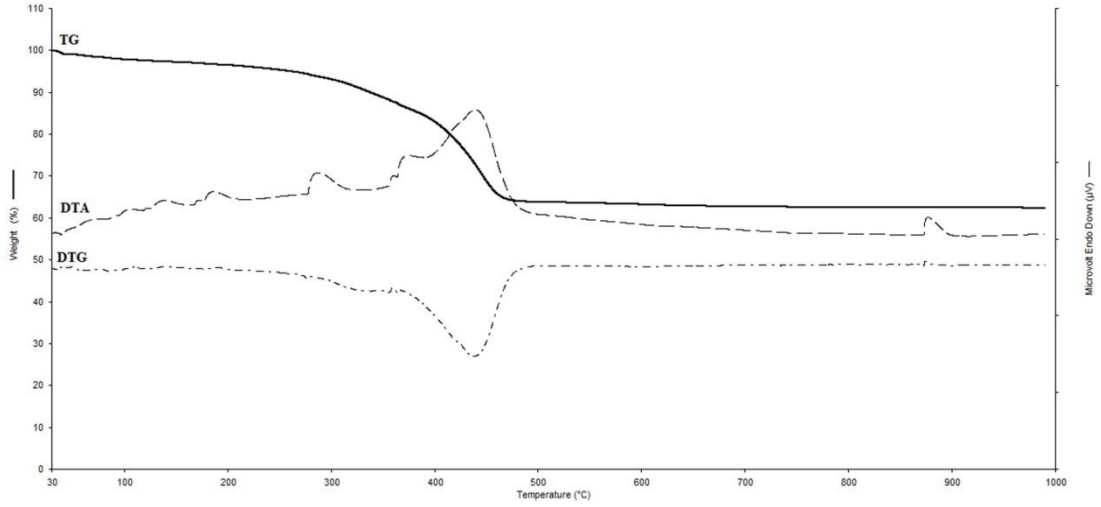
Şekil 4.43. Desulfürizasyonda kullanılan besiyerinin ve 2 haftalık kültür sıvısının dönüşümlü voltamogramı (demir için)

4.4.3.5. TGA/DTA analizleri

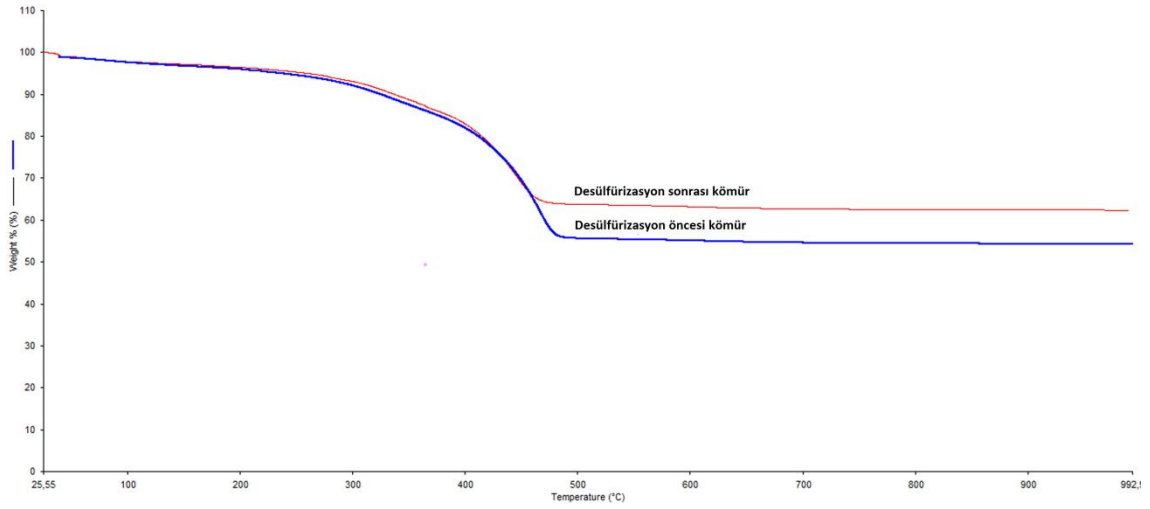
Kömür örneklerinin biyodesulfürizasyon öncesi ve sonrası TG/DTA ve DTG eğrileri Şekil 4.44-4.46'de belirtilmiştir.



Şekil 4.44 Biyodesulfürizasyon öncesi kömürün TG/DTA ve DTG profilleri



Şekil 4.45 Biyodesülfürizasyon sonrası kömürün TG/DTA ve DTG profilleri



Şekil 4.46 Biyodesülfürizasyon öncesi ve sonrası kömürün TG eğrileri açısından karşılaştırılması

4.4.4. Desülfürizasyon öncesi ve sonrası kömürün kalitesini etkileyecek parametrelerin değerlendirilmesi

Kükürt giderim uygulamalarının linyitin özelliklerini etkileyip etkilemediğini belirlemek amacı ile kalori ve kül analizleri de yapılmıştır. Kömürlere uygulanan mikrobiyal işlemin, kükürt giderimini sağlamakla birlikte, kalori değerinde bir miktar

azalmaya sebep olduğu saptanmıştır. Desülfürizasyon sonrası elde edilen üst ısıl değeri 1826, alt ısıl değeri ise 1733 kcal/kg olarak bulunmuştur. Ancak kalori değeri, elde edilen kükürt değeri ile birlikte değerlendirildiğinde emisyon değeri olarak ifade edilmiş ve bu değerde bir azalma belirlenmiştir. Kükürt emisyon değeri (EV); kükürt içeriğinin megajoule cinsinden kalori değerine bölünmesi ile elde edilir. EV'nin yüksek değeri, çevresel etkinin fazla olduğunu gösterir (Aller et al., 2001). EV tespiti için %3,42 wt kükürt değerine sahip Mihaliçcık linyitinin kükürt ve kalori değerleri baz alınmıştır. Bakteriyle gerçekleştirilen desülfürizasyon deneylerinde bu kömürlerin kükürt emisyon değerini düşürdüğü gösterilmiştir (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15 İşlem görmemiş ve mikrobiyal işlem görmüş kömürün kalori ve kükürt emisyon değerlerinin karşılaştırılması

	Desülfürizasyon öncesi kömür	Desülfürizasyon sonrası kömür
Toplam kükürt değeri (% wt)	3,42	2,29
Yukarı kalori	2262	1826
Aşağı kalori	2152	1733
Kükürt emisyon değeri (EV)	0,379	0,315

Kükürt giderim uygulamalarının kömür kalitesini etkileyen parametrelerde meydana gelen değişikliklerin sonuçları Çizelge 4.16'da verilmiştir.

Ayrıca yapılan çalışmada kül ve uçucu madde oranına da bakılmış ve önemsenmeyecek derecede arttığı, nem oranının ise azaldığı belirlenmiştir. Bunun yanısıra kömürün içerdiği karbon, hidrojen ve azot elementlerinin içerikleri de bakteriyel işlemde sonra belli miktarlarda azalma göstermiştir.

Çizelge 4.16 Mikrobiyal işlem görmemiş ve görmüş olan kömürde kaliteyi etkileyen parametrelerin değişimi

	Mikrobiyal işlem görmemiş kömür	Mikrobiyal işlem görmüş kömür
Piritik kükürt (%)	2,37	0,80
Organik kükürt (%)	0,72	0,65
Sülfatik kükürt (%)	0,33	0,22
Toplam nem	3,85	3,53
Kül (%)	54,70	61,58
Uçucu madde (%)	24,70	21,44
Karbon (%)	26,95	21,5
Hidrojen (%)	2,13	1,79
Azot (%)	1,27	1,05
Külde kükürt	3,01	0,06

BÖLÜM 5

5. TARTIŞMA

Kömür ya da metal atıklarının yüzey kalıntıları ile ilişkili en ciddi çevresel problemlerden birisi piritin oksidasyonu ve asidik bir ortamın oluşmasıdır. Piritin (FeS_2) oksidasyonu ile Fe^{+2} , S_2O_3 ve H^+ iyonları ortama salınmaktadır. Bunun yanı sıra kimyasal ve/veya biyolojik yollarla da Fe^{+2} 'nin Fe^{+3} 'e oksidasyonu; FeS_2 'nin daha fazla oksidasyonuna olanak sağlamaktadır. Kömür ya da metal maden ocaklarında görülebilen asidik maden drenajı; düşük pH ile karakterize edilmektedir. Bunun yanı sıra yüksek konsantrasyonda sülfat, demir, manganez, alüminyum, diğer toksik ve radyoaktif iyonları ayrıca fazla miktarda çözünmüş katı maddeyi bünyesinde barındırmaktadır. Asidik maden drenajı; oksijene maruz kalan asidik maden sularının bünyelerinde barındırdıkları mikroorganizma ve belirli sülfid minerallerinin etkileşiminin sonucunda oluşur. FeS_2 , arsenopirit (FeAsS), kalkopirit (CuFeS_2), sfalerit (ZnS), galena (PbS) gibi bileşiklerin oksidasyonu sözü edilen asidik koşulların oluşumuna neden olmaktadır (Mills, 1995). Maden sahalarından veya üretim süreçlerinden (pasasından) kaynaklanan bu asidik maden drenajları, su kaynaklarına karışmakta, gerek asidik yapısı ve gerekse içerdiği yüksek ağır metal derişimleri ile ciddi kirlilik riski oluşturmaktadır. Terk edilmiş maden sahaları ülkemizin değişik kesimlerinde oldukça yaygındır. Bu drenajlar yüksek yatırımlı maden bölgeleri civarında bulunmaktadır. İzmir Kalecik'te, Ödemiş–Türkönü'nde, Alaşehir yakınlarında, Beydağ–Halıköy'de, Konya civarında bulunan civa madenlerinde ve Çankırı Ovacık kömür madeni bölgelerinde bulunan AMD'leri bunlara örnek olarak verilebilir (Gemici and Oyman, 2003; Gemici, 2004; 2008; Gemici and Tarcan, 2007; Gemici et al., 2009; Karahalil et al., 2012; Aykol et al., 2003; Yenilmez et al., 2011). Ancak koruyucu önlemler alınmadığı takdirde, cevherdeki veya maden atıklarındaki sülfür mineralleri su ile yıkanarak çevreye yayılmakta ve fiziksel ve kimyasal olarak çevreyi kirliletmektedir. Büyük yatırımlarla inşa edilen Artvin'deki Muratlı Barajı Murgul bakır maden ocağının AMD'si, Balıkesir'deki Havran Barajı ise Balya

AMD'sinin olumsuz etkileri ile karşı karşıyadır (Aykol et al., 2003). Böylesine önemli yatırımları ve sucul ekosistemleri tehdit eden AMD'lerin sayısı konusunda kesin bir bilgi ya da rapor bulunmamaktadır. Bununla birlikte böyle bir ortamda yaşayabilmek için adaptasyonlar geliştirerek bu alanları habitatı haline getiren ve asidofil olarak adlandırılan mikroorganizmalar da mevcuttur. Bu asidofiller özellikle biyomadencilik alanında oldukça önemli bir potansiyele sahiptir. Ülkemizde bulunan AMD'ler üzerine yapılan çalışmalar ya jeolojik boyutta ya da risk değerlendirme ve tehlike analizleri boyutunda yapılmış olup bu bölgelerin mikrobiyal komünite analizleri ile ilgili herhangi bir veri, yayın ve tez çalışması bulunmamaktadır. Bu tez çalışması bu anlamda bir ilki yansıtmaktadır.

Çalışma kapsamında asidofil bakteri ve arke çeşitliliği araştırılan Balya ve Çan asidik maden drenajlarının bazı kimyasal bileşenleri Çizelge 4.2'de verilmiştir. Elde edilen analiz sonuçlarına göre Çan AMD su örneğinde Cu^{+2} , toplam Cr, toplam Fe, Mg^{+2} , ve Al^{+3} 'nin baskın metaller olduklarını söyleyebiliriz. Balya AMD su örneğinde ise, Zn^{+2} , Mg^{+2} , toplam demir ve Al^{+3} 'nin ortamda en çok bulunan metaller oldukları görülmektedir. Her iki ortamın kimyasal bileşiminde beklenildiği gibi demir ve kükürt bulunmaktadır. AMD gibi ortamların habitat olduğu mikroorganizmaların metabolik özellikleri de dikkate alındığında demir ve kükürt transformasyon reaksiyonları bu organizmaların bilinen tipik özellikleridir. Bu nedenle izolasyon çalışmaları için seçilen ortamların öncelikle kimyasal kompozisyonlarına bakılarak izolasyon çalışmaları için uygun olup olmadığı belirlenmiştir. Nisan (2011) ayında alınan su örneklerinde demir ve kükürt miktarlarının yüksek olması seçilen AMD'lerin doğru habitat olabileceklerini düşündürmüştür. Balya AMD kimyasal bileşiminin Çan AMD'ye kıyasla izolasyon çalışmalarında kullanılan iz element çözeltisi başta olmak üzere diğer besi yeri bileşenlerine daha fazla benzerlik gösterdiği görülmektedir. Örneğin, iz element çözeltisinde Zn^{+2} diğer bileşenlere oranla daha fazla bulunmaktadır. Balya AMD'de de Zn^{+2} 'nin diğer bileşenlere göre daha fazla bulunduğu belirlenmiştir. Ancak prokaryotik çeşitliliğin belirlenmesinde izlenen stratejilerden bir tanesi olan kültür bağımlı tekniklerde Balya AMD'den izole edilebilen tür çeşitliliği ile Çan AMD'den izole edilebilen tür çeşitliliği sayısal olarak çok farklı olmamıştır. Dolayısı ile izolasyon çalışmalarında literatürde de sıklıkla kullanılan besi yerlerinin farklı kompozisyonlarda AMD'ler için de kullanılabilirliğini söyleyebiliriz. Ancak sayısal olarak benzerlik olsa

da, izole edilen türlerin farklı olması AMD'lerin kimyasal kompozisyonlarındaki farklılığa dayandırılabilir. Benzer biçimde Balya AMD'nin toplam demir içeriği Çan AMD'den daha fazladır. Bu durum örnek alımı sırasında çekilen ve Şekil 3.5 ve 3.6'da sunulan fotoğraflardan da görsel olarak anlaşılabilir. Ortamda sarıdan kırmızıya doğru oluşan rengin fazlalığı ortamdaki demirin transformasyon reaksiyonlarının bir sonucudur. Balya AMD fotoğraflarındaki daha belirgin olan sarı-kırmızı renk dağılımı bu durumun bir göstergesi olarak düşünülmüştür. Yapılan kimyasal analizlerde de Balya AMD'nin toplam demir içeriğinin Çan AMD'ye kıyasla yaklaşık 3 kat fazla olduğu görülmüştür. Kültür bağımlı yöntemlerde izolasyon için kullanılan besiyerlerinden bir tanesi olan FeTSB besiyerinde yüksek oranda demir bulunmaktadır. Bu besiyeri filamentli ve demir okside eden mikroorganizmaları belirlemek için kullanılan bir ortamdır. Balya AMD ve Çan AMD'den FeTSB besiyerine yapılan ekimler sonucunda Çan AMD'den her hangi bir izolat elde edilemezken beklenildiği üzere Balya AMD'den 3 farklı demir okside edebilen, filamentli bakteri kültüre edilebilmiştir. Bilindiği üzere filamentli bakteriler yaşam alanı olarak genellikle akarsuları tercih ederler. Bu nedenle literatürde bu tip asidofil filamentli bakteriler "acid streamer" olarak bilinirler. Balya AMD'nin durgun bir ortam olması nedeniyle bu izolatların elde edilmesi beklenmedik bir durumdur. Ancak, Balya AMD'nin Kocaçay Deresi ile çok yakın olması ve olası bir su taşkını ya da yer altı suları ile bu türlerin taşınmış olabileceği düşünülebilir. Kocaçay Deresinin Balya AMD'nin yakınlarından geçmesi ve mevsimsel yağış rejimlerine bağlı olarak derenin pH değerinin asidik olması (Aykol et al., 2003) dere ile drenajın bir birlerine karıştığını göstermektedir. Dolayısı ile filamentli "acid streamer"ların Kocaçay Deresinden Balya AMD'ye geçme olasılığı düşünülebilir. Buradan elde edilen sonuçlar, asidofil mikroorganizmaların izolasyonunda ortamın kimyasal kompozisyonunun öncelikle belirlenmesi ve bu kompozisyonla birlikte çevresel özelliklerin değerlendirilerek izolasyon stratejilerinin geliştirilmesinin yararlı olacağını göstermiştir. AMD gibi ortamlarda yaşayan mikroorganizmaların asidotolerant ya da asidofil olmaları zorunludur. Ortam pH değerleri Çizelge 4.1'den de görülebileceği gibi kuvvetli asidiktir. Balya AMD 2,75 pH değerine sahipken, Çan AMD'nin pH değeri 2,85'dir.

Çalışmamız, planmalama aşamasında iki temel hedef üzerine kurulmuştur. Bunlardan birincisi, ülkemizde yeterli veri bulunmayan asidofil prokaryotik çeşitliliğe

bilimsel katkıda bulunmak ikincisi ise AMD izolatlarının desülfürizasyon potansiyelinin araştırılmasıdır. Bu habitatlarda yaşayan mikrobiyal çeşitlilik üyeleri önemli biyoteknolojik uygulamalarda potansiyel mikroorganizmalardır. Ülkemiz bilindiği üzere, linyit kömürü rezervlerinin bol olduğu bir coğrafyaya sahiptir. Linyit rezervlerinin önemli bir kısmı kükürt içeriği yüksek kömürlerden oluşmaktadır ve bu özelliğinden dolayı linyit kömürleri çevre kirliliğine neden olduğu için kullanımları sınırlandırılmıştır. Çalışmamızda düşük kaliteli linyit kömürlerinin kükürt miktarını azaltarak çevresel emisyonun uygun seviyelere düşürülmesi için biyolojik bir çözüm yolu aramaktır. Birçok asidofilik bakteri ve arkenin elektron vericisi ve alıcısı olarak elementel kükürt ve indirgenmiş inorganik kükürt bileşiklerini kullanarak kükürdün transformasyonunda rol oynadığı bilinmektedir (Dopson and Johnson, 2012). Kömürde gerçekleştirilebilecek desülfürizasyonun avantajı düşük kükürt içerikli atık hacminin üretilmesi olacaktır dolayısıyla kömür maden drenajının oluşumu da sınırlandırılmış olacaktır. Teknolojik ve çevresel kısıtlamalardan dolayı flotasyon, biyolojik ya da termal yöntemler gibi az sayıda desülfürizasyon tekniği yerinde “in situ” uygulama için geçerli görülebilmektedir. Atık hacmi, bölgenin özellikleri ve daha önce benzer büyük ölçekli uygulama tecrübelerinin azlığı hesaba katıldığında desülfürizasyon tekniklerinin önemli ölçüde yatırım, işletme ve bakım maliyeti, dikkatli bir şekilde planlanması gereken parametrelerdir. Tekniklerin etkinliği bu açılardan ele alınmalıdır. Özellikle kömür ya da metal AMD’leri habitat olarak kullanan mikroorganizmaların izolasyonu sonrasında bunların biyoteknolojik uygulamalarından biri olan desülfürizasyonda kullanılma potansiyelinin iyi bir fırsat olacağı düşünülmektedir. Bu nedenle çalışma alanı olarak biyolojik kükürt giderimi yapabilecek organizmaların önemli bir yaşam alanı olan asidik maden drenajları seçilmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında mikrobiyal çeşitliliği ortaya çıkarmak amacı ile kültürden bağımsız ve kültüre bağlı yöntemler kullanılmıştır. Prokaryotik çeşitliliğin moleküler yöntemler kullanılarak çalışılması son yıllarda giderek popüler hale gelmiştir ve temel olarak neredeyse tüm yöntemler 16S rRNA geninin polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması temeline dayanmaktadır. Mikrobiyal çeşitlilik çalışmalarında farklı moleküler yöntemler kullanmak olasıdır. Uygulanacak yöntemin seçimi, amaca ve analiz edilecek örnek miktarına bağlı olarak değişebilmektedir.

Ayrıca tür sayısının ortaya konmasının yanı sıra bir diğer önemli faktör de bu tür içindeki bireylerin dağılımıdır (Ovreas et al., 2003).

Bu tez çalışmasında AMD örneklerindeki asidofilik prokaryotların izolasyonuna yönelik kullanılan inorganik demir çift tabaka “overlay” (iFe₀), demir–kükürt çift tabaka (FeS₀), maya özütü çift tabaka (Yeo), maya özütü (Yeo) ve demir–TSB çift tabaka (FeTSB) besiyelerinin tamamında farklı tipte bakterilerin geliştiği gözlenmiştir. Çalışmanın ilerleyen dönemlerinde T–RFLP analizinin değerlendirilmesi sonucunda izolasyon yapılan ortamlarda heterotrof ve demir okside eden filamentli bakterilerin var olduğunun görülmesi ile başlangıçta izolasyon besiyeri olarak kullanılmayan FeTSB ortamına ihtiyaç duyulmuştur. Burada iFe₀ ve FeS₀ besiyeleri ile kemolitotrof asidofiller; maya özütü besiyeri ile heterotrofik asidofiller, FeTSB ortamı ile de organotrof ve demir okside eden bakterilerin izolasyonu hedeflenmiş ve başarı sağlanmıştır. Bu besiyelerinin içerisinde genel olarak yüksek Fe⁺² konsantrasyonuna ek olarak önemli tuzlar ve kullanılan iz element çözeltilisinde yer alan ağır metaller bulunmaktadır. Fe⁺²’nin ve diğer metallerin ortamda belirgin konsantrasyonda bulunması çalışılan AMD’lerin su örneklerinin elementel analiz verileri ile benzerlik göstermektedir. İzolasyonun yapıldığı sucul ortam, laboratuvar koşullarında benzeştirilmeye çalışılmıştır. Bu nedenle, hedeflenen prokaryotik çeşitlilik elde edilmiştir. İzolasyonun yanı sıra çevresel AMD örneklerinde grup bazında canlı bakteri sayımları da yapılmıştır. Çizelge 4.3’te de görüldüğü gibi Balya AMD’sinin özellikle demir okside eden kemolitotrof ile demir ve kükürt okside eden kemolitotrof prokaryotlar açısından Çan AMD’sine göre sayıca fazla olduğu görülmektedir. Her iki AMD’nin sahip olduğu kimyasal kompozisyon düşünüldüğünde metabolizmaları ve enerji elde edim kaynakları inorganik maddelere dayanan asidofillerin Balya AMD’sinde sayıca daha fazla olması beklenen bir sonuçtur. Çan AMD’sinde maya özütü besiyerinde oldukça fazla sayıda koloninin sayılması bu AMD’nin daha çok heterotrof asidofil prokaryotları bünyesinde barındırdığını düşündürmektedir.

Çalışma kapsamında asidofilik arke ve bakterilerin izolasyonuna yönelik alınan su örneklerinden elde edilen izolatların gram boyamaları sonucunda basil ve spiral şekilli izolatların Gram(–), filamentli bakterilerin Gram (+) olduğu, hücre morfolojilerinin ise genel anlamda farklı uzunlukta basil, spiral, filamentli şeklinde

olduğu gözlemlenmiştir. İzolatların kolonilerin makroskopik görünümüleri Çizelge 4.4 ve 4.5'te verilmiş, Balya AMD'ye ait 35, Çan AMD'ye ait 16 izolat elde edilmiştir. Genel olarak izolatların kolonilerinde ortada koyu turuncu-kırmızı renkte ferrik demir merkezi ve bunun etrafında daha açık renkli pigmentasyon mevcuttur. Demir okside eden izolatların sıvı besiyerine transfer edilip büyümeleri sağlandığında sıvı ortamın inkübasyon süresi ilerledikçe sarı bir renk aldığı hatta daha da ilerleyen günlerde camın cidarlarında sarı-kırmızı presipitatlar şeklinde geliştiğinin göstergesi olduğu belirlenmiştir. Demirin yanı sıra kükürdü de okside edebilen izolatların kolonilerinin üzerlerinin beyaz ve mukoid bir tabaka ile kaplandığı görülmüştür. Bu koloniler kükürt okside eden bakteriler için karakteristiktir. Heterotrofik asidofillerde ise karakteristik beyaz ya da pembe renkli opak ya da daha şeffaf koloniler gözlemlenmiştir. Elde edilen izolatlar; T-RFLP yöntemi ile tarandıktan ve temsili olarak seçildikten ve 16S rRNA bölgeleri çoğaltılıp saflaştırıldıktan sonra 27F ve 1387R primer setleri ile dizi analizine tabi tutulmuştur. T-RFLP yöntemi ile elde edilen izolatların dizi analizi ile tanımlanması öncesi bir taramadan geçirilip temsili örneklerin seçilmesi amacı ile kullanılmıştır. Şekil 4.3, 4.4 ve 4.5, PA-5 izolatının sırasıyla HaeIII, CfoI ve AluI restriksiyon enzimleri ile kesilmiş T-RF profillerini göstermektedir. Elde edilen pik sonuçları BART'ın T-RFLP veri tabanında değerlendirildiğinde *At.ferrivorans* ile eşleşmektedir. Bu şekilde kültüre edilebilen izolatlar öncelikle T-RFLP yöntemi taranarak dizi analizi için temsili izolatlar seçilmiştir. Çizelge 4.6; izolatların moleküler tanımlamaları ile ilgili bilgileri sunmaktadır. Bu bilgiler ışığında Çan AMD'den izole edilen PA-32'nin *Leptospirillum* sp., PA-34'ün *Acidobacteriaceae* familyasından bir bakteri, PA-H6'nın henüz kültüre edilemeyen bir asidofil bakteri olduğu, PA-H7'nin ise *Acidiphilium* sp. ile eşleştiği görülmüştür. Balya AMD'den izole edilen PA-5, PA-8 ve PA-20 izolatlarının NCBI'da *At.ferrivorans*, PA-19'un *Acidithiobacillus* sp., PA-38'in *Ferrimicrobium* sp., PA-45'in *Actinobacterium* sp., PA-44'ün farklı bir *Ferrimicrobium* sp. suşu, PA-H2'nin *Acidobacteriaceae* familyasından bir bakteri, PA-H3'ün *Acidiphilium* sp. ile eşleştiği görülmüştür. Bu verilere göre Çan AMD'den 4 farklı tür, Balya AMD'den ise 7 farklı tür tanımlanmıştır. *At. ferrivorans*, FeSO₄; *Leptospirillum* sp., iFe₀; *Ferrimicrobium* sp. ve *Actinobacterium* sp. gibi filamentli bakteriler FeTSB; diğer izolatlar ise Ye(pH3) besiyerleri kullanılarak izole edilmiştir.

Kullanılan besiyerleri adı geçen türleri izole etmeye yöneliktir (Johnson et al., 2009; Johnson and Roberto, 1997; Johnson, 1995; Johnson and Hallberg, 2003). AMD'lerden elde edilen bu izolatlar ülkemiz için ilk kayıtları oluşturmaktadır.

Son yıllarda ekstremofillerle yapılan çalışmalar daha çok bu mikroorganizmaların kendileri ya da ürünlerinin potansiyel biyoteknolojik uygulamaları üzerine yoğunlaşmıştır. Yeni mikrobiyal türlerin izolasyonu, yeni metabolitlerin ve yol izlerinin belirlenmesi, hücresel bileşenlerin moleküler ve biyokimyasal karakterizasyonu ile kullanım alanları da giderek artmaktadır (Satyanarayana ve ark., 2005). Aşırı asidik prokaryotlar hem biyolojik özellikleri hem de uygulama açısından oldukça ilgi görmektedir. Uygulamadan kasıt minerallerin biyolojik işleme tabi tutulmasını kapsayan biyolojik madenciliktir (Rawlings, 2002). Özetle asidofilik bakterileri tanımlamak endüstriyel ve çevresel açıdan kritik öneme sahiptir. Asidofil mikroorganizmaların çeşitli biyoteknolojik uygulamaları arasında, biyoliçing ve biyodesülfürizasyon en yaygın olan uygulama alanları olarak sıralanabilir (Akçıl ve Çiftçi, 2003; Ehrlich, 2004).

Çalışılan AMD'lerdeki komünite analizleri kültüre bağlı tekniklerin yanı sıra kültürden bağımsız, moleküler boyutta değerlendirilmiştir. Çalışma alanlarında moleküler tanımlama için 16S rRNA'ya dayanan FISH, DGGE, T-RFLP ve 16S klonlama gibi yöntemler kullanılmıştır. Bu amaçla farklı yöntemlerin kullanılmasının nedeni, elde edilecek verilerin birbiriyle karşılaştırılması sonucunda doğrulayıcı ve tamamlayıcı bilginin elde edilme potansiyelidir. Ribozomal RNA'ların evrimsel belirteç (marker) olarak kullanılmasının nedenleri; yeterli büyüklükte olması, işlevsel olarak sabit, evrensel olarak yaygın olan moleküller olması ve tüm hücrelerde nükleotid dizisinin korunduğu çok sayıda bölge içermeleridir (Madigan ve Martinko 2005).

Floresan in situ hibridizasyon (FISH) analizi, mikroorganizmaların hücrelerine zarar vermeden rRNA'larını hedef alan floresan boyalı oligonükleotidler kullanılarak izlenmesine dayalı bir tekniktir. Oligonükleotidler, hücrede çok miktarda bulunan rRNA'ların belirli kısımlarına bağlanabilen floresan boyalı, tek sarmal halinde özel baz dizileridir. Kullanılan bu oligonükleotidler domaine, gruba ya da türe spesifik olabilir. rRNA moleküllerinin her canlı hücrede bulunması ve numunedeki mikroorganizma miktarı düşük olsa da besiyerinde çoğaltmaya gerek kalmadan rRNA'larına ulaşılabilmesi, ayrıca mikroskopik sayıma dayalı sonuç veren kültürden bağımsız

oldukça hızlı yöntemlerden biri olması yöntemin avantajları olarak sıralanabilir. rRNA hedefli arke ve bakteri domainine spesifik nükleik asit problarının metabolik olarak aktif hücreler görülmüş, çevresel örnekte bulunan prokaryotların morfolojilerinin belirlenmesi ve kantitatif analizlerinin yapılması sağlanmıştır. Şekil 4.7’de Çan AMD ve Balya AMD’ye ait DAPI boyamalarının görüntüleri yer almaktadır. Özellikle Balya AMD çevresel örneğinin DAPI boyamasında çeşitliliğe oluşturan komünite üyelerinin farklı uzunluklarda basil, spiral, filamentli yapılar gibi farklı morfolojilerini görmek mümkün olmuştur. Bu görüntüler, prokaryotik çeşitliliğin elde edilmesinde kullanılan diğer kültüre bağlı ve kültürden bağımsız yöntemlerle de paralellik göstermektedir. Şekil 4.8, her iki örneğin de bakteri ve arke problemleri ile gerçekleştirilmiş FISH’in floresans mikroskopunda görüntüleri yer almaktadır. Hem Balya hem de Çan AMD için gerçekleştirilen FISH’de Arc915’ten sinyalin çok zayıf olduğu görülmüştür. Eub338 probu ile neredeyse DAPI kadar hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması kapsamında yapılan diğer moleküler çalışmalarla da örtüştüğü görülmüştür. Çan’da arke probundan alınan sinyalin daha iyi olduğu görülmektedir. Bu sonuç, T-RFLP yönteminde Çan AMD’sinde arke üyelerine rastlanması ve PCR ile çoğaltılmasına uygunluk göstermektedir. FISH yöntemi çevresel örnekte mevcut aktif mikrobiyal türlerin miktarları hakkında bilgi vermesine rağmen, kompozisyondaki değişimi tespit etmede yeterli değildir. Bu nedenle çoğu araştırmacı FISH’i diğer moleküler tekniklerle birlikte kullanmaktadırlar. Yapılan FISH analizinde otofluoresan özelliğe sahip olan partiküllere de rastlanmıştır. Bu da hatalı pozitif sonuçlara neden olabilmektedir. Yüksek konsantrasyonda ağır metal içeren asidik su örneği FISH analizine tabi tutulduğu için fiksasyon esnasında PBS tamponu ile nötrleştirmeden söz konusu metallerin çözünebilir hale gelmesi amacı ile sadece asidofillerin FISH analizlerinde kullanılan ve pH’ı 1,8 olan Mackintosh ortamından yararlanılmıştır. Bu ortam hem fiksasyon aşamasında hem de filtrelerin yıkanmasında kullanılmıştır. Böylelikle otofluoresan özelliğe sahip partiküllerin ortamda görüntülenmesinin önüne geçilmiştir (Gonzalez–Toril et al., 2003). Hatalı negatif sonuç almada da yetersiz penetrasyon, düşük rRNA içeriği, fluoroforun yıkımı rol oynayabilmektedir. Probu, bakteriyel hücrelerin yetersiz penetre etmesi sonucu sinyal yoğunluğu düşük olabilir. Canlılarda düşük rRNA içeriği direkt olarak büyüme oranı ile ilişkilidir.

Metabolizmanın yavaş olması, düşük sinyal yoğunluğu ile negatif sonuç doğurabilir (Aycan, 2012). Asidofiller için de böyle bir durum söz konusu olabilmektedir. Dolayısı ile yavaş gelişen türler için Cy5 dışında, Cy3 gibi parlak fluoresan ışık yayan probalar kullanılabilir. Birçok fluorokrom, eksitasyon devam ederken hızlı bir şekilde yok olur ve bu fotomikrografide önemlidir. Bu problemi çözmek için dar bantlı filtre setleri ve fotostabil siyanin boya kullanılması önerilmektedir (Moter ve Göbel 2000).

Muyzer ve arkadaşlarının ortaya koyduğu bir yöntem olan DGGE, mikrobiyal ekolojide yaygın olarak kullanılmaktadır. Çevresel örneklerden yapılan DNA ekstraksiyonunu takiben 16S rRNA bölgesinin GC kuyruğu içeren özel primerlerle çoğaltılması ve kimyasal denatürantlar yardımı ile PCR ürününün poliakrilamid jel içerisinde ayrılması, farklı dizilere sahip türlerin jelde farklı noktalarda göç hareketlerini durdurması esasına dayanmaktadır. Bu yöntemin önemli bir avantajı, jelden bantların kesilerek komüniteyi oluşturan üyelerin dizilenmesine olanak vermesidir (Muyzer 1999). Yöntemin dezavantajları ise 550 baz gibi kısa DNA fragmentlerinin ayrımını gerçekleştirebilmesidir. Aynı zamanda primerlerin bozulmasıyla ya da heterodupleks moleküllerin varlığıyla oluşan çift bantlar, birbirine yakın bantların her zaman reel bant olmaması bu tayini zorlaştırabilmektedir (Muyzer 1999). Bu çalışmada DGGE sadece komüniteyi profillendirmek amacı ile kullanılmış ancak bantların kesilerek elde edilen DNA'larının dizilenmesine gidilmemiştir. Şekil 4.10'da Çan AMD'sine ait DGGE profilinde 10 farklı bant gözükse de bantların birbirine çok yakın pozisyonda olması ve bazılarının çok net olmaması gerçekte olması gereken bant sayısının üstünde bir sayı da olma ihtimalini güçlendirmektedir. Balya AMD'sinin DGGE profilinde ise 6 farklı bant görünmekte, özellikle 2 dominant bant, aynı jele yüklenmiş *Acidithiobacillus* sp. ve *Acidiphilium* sp.'ye bantları ile aynı pozisyonda olduğu görülmektedir. Bu sonuç, sözü geçen iki türün Balya AMD örneğinde mevcut olduğunun DGGE yöntemi ile kanıtıdır. DGGE göçü esnasında yakın noktalarda durması ile birden fazla bantın tek bant gibi görülmesi bu yöntem için karşılaşılabilecek bir durumdur. Bantların gerçek temsilcilerini bulmak için denatürant oranı daha dar olan bir DGGE jeline aynı örneklerin yüklenmesi, bantlarının daha fazla açılması, net olarak görülebilir hale gelmesi veya bantların klonlanması sağlanarak bu engel aşılmalıdır. Hem Çan'da hem de Balya AMD'lerinin DGGE profillerinde bantların birbirine yakınlığı göz önünde bulundurulursa daha doğru sonuç için denatürant oranı daha dar olan bir jelde çevresel

örnek DNA'larının yürütülmesi sağlanabilir. 16S rRNA analizine dayanan bir yöntem olan T-RFLP komünitelerdeki farklı türlerin varlığını belirlemek için kullanılan hızlı ve ekonomik bir yöntemdir. Restriksiyon enzimleri ile kesilerek elde edilen profillerde ortamdaki tür çeşitliliği ve bolluğu ortaya konmaktadır. Ancak farklı restriksiyon enzimleri farklı komünite parmak izleri oluşturması beklenmektedir (Dunbar et al., 2000). Bu bağlamda en az iki ya da dört farklı enzimin kullanılması ve diğer enzim kesimleri ile gerçekleştirilen T-RFLP profillerinin birbiriyle uyuşması ve genel sonuca uyum sağlaması önemlidir (Tiedje et al., 1999). Kullanılan enzimler arasından HaeIII'nin, diğerlerine oranla daha iyi kesimi gerçekleştirdiği ve daha iyi profiller verdiği literatürden de bilinmektedir (Patrick et al., 2011). Bu nedenle sonuçların değerlendirilmesi aşamasında bu enzim baz alınarak yoruma gidilmiş, diğer enzimlerle oluşturulan profillerin de sonuçlara uyum sağlayabilirliğine bakılmıştır. Herhangi bir PCR bazlı yöntem gibi T-RFLP de çeşitliliğin olması gerekenden daha az düzeyde tahmine neden olabilir. Bunun dışında farklı türler farklı gen kopya sayısına sahip olabilir, bu da yanlış sonuçlara götürebilir (Liu et al., 1997). Restriksiyon enzimleri tarafından tamamlanmamış kesim çeşitliliğinin daha fazla görülmesine neden olabilir (Osborn et al., 2000). Bu nedenle bu çalışmada kullanılan restriksiyon enzimleri her ne kadar kısa sürede kesimi gerçekleştirdiği bilinse de 1 saatlik inkübasyona bırakılmış ve kesim işleminin tamamlanmasına olanak tanınmıştır. Bu dezavantajlara rağmen otomize, hızlı ve kantitatif potansiyeli olduğundan bir çok araştırmacının mikrobiyal çeşitliliğin taranmasında tercih ettiği bir yöntemdir (Osborn et al., 2000). Bu yöntem hem çevresel örneklerdeki mikrobiyal çeşitliliği ortaya çıkarmak için hem de elde edilen izolatların dizi analizi ile tanımlanması öncesi bir taramadan geçirilip temsili örneklerin seçilmesi amacı ile kullanılmıştır. Şekil 4.12'den görüleceği üzere T-RFLP analizine göre Balya AMD'sinin bakteriyel komünite üyelerinden, *At. ferrivorans* (66 nt), *Acidiphilium* (214 nt), *Fm. acidiphilium* (230 nt), demir okside eden *Actinobacterium* (235 nt), *At. ferrooxidans* (253 nt) çevresel su örneğinden izole edilebilirken örnekteki bolluğu diğerlerine göre çok daha az olan *Sulfobacillus acidophilus* (192 nt), *Leptospirillum ferrooxidans* (202 nt) demir okside eden firmiküt G1 (222 nt), *Ferrithrix thermotolerans* (326, 328 nt) gibi türler henüz izole edilememiştir. Ortamda varlığı tahmin edilen ancak diğer dominant türler kadar sayıları fazla olmayan söz konusu bu

türlerin izolasyonu için zenginleştirme besiyerleri hazırlanabilir. Özellikle, kültürden bağımsız bir yöntem olan T-RFLP analizine göre dominant görünen türler olan *Fm. acidiphilium* ve demir okside eden *Actinobacterium*'un kültüre bağlı tekniklerle de izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Diğer restriksiyon enzimlerinin (CfoI ve AluI) kesimleri ile elde edilen T-RFLP profilleri de bu sonuçlarla tutarlılık göstermektedir. Şekil 4.18'den görüleceği gibi Çan AMD'sinin bakteriyel komünite üyelerinden, WBW-NO17-*Acidiphilium* sp. (172 nt), *L. ferrooxidans* (204 nt), *Acidobacteriaceae* izolat WJ7 (214 nt), *Acidiphilium* SJH (232 nt) çevresel su örneğinden izole edilebilirken örnekteki bolluğu diğerlerine göre çok daha az olan *Ferrithrix thermotolerans* (235, 326, 474 nt), Talven 1 *Alicyclobacillus* sp. (249 nt), *At. caldus* (254 nt) gibi türler henüz izole edilememiştir. Çan AMD'sinin T-RFLP profilinde kloroplast 16S rRNA geninin görülmesi bu gölde yaşayan alglerin de bir kanıtı olabilmektedir. Çan AMD'de özellikle T-RFLP profilinde *Acidiphilium* sp. türünün dominant görülmesi bu gölün daha çok heterotrof, Balya AMD'de ise kemototrof ya da miksotrof türlerin dominant görülmesi ise bu gölün ototrof bir göl olduğunu kanıtlayabilir. Bu sonuçlar, Şekil 4.2'de verilen su örneklerinin metal analizleri ile de uyum sağlamaktadır. T-RFLP analizine göre Çan AMD'de *L. ferrooxidans*'ın, Balya AMD'sinde *At. ferrivorans*'ın yoğunluğu çok gözükmese de izole edilebilmesi diğer türlere göre daha kolay kültüre alınabildiğinin bir göstergesi olabilir. Bakteriyel çeşitliliğin yanısıra her iki AMD örneği için arkeal çeşitlilik de araştırılmıştır. Bunun için her iki örnekten elde edilen DNA, bakteri ve arke domainine spesifik primer setleri kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. Bunun sonucunda Balya AMD'sinde herhangi bir PCR ürünü alınamazken Çan AMD'sinde arkeal PCR ürünü alınabilmiştir. FISH analizinde Balya'da da az da olsa arkeal sinyallerin alındığının görülmesi, Balya'da da arkeal organizmaların bulunduğu ancak çok az sayıda olduğunun bir kanıtı olabilir. Çan AMD'sinin arkeal 16S PCR ürünü HaeIII, CfoI ve AluI şeklinde 3 restriksiyon enzimi ile kesildiğinde elde edilen profiller Şekil 4.24, 4.26 ve 4.28'de gösterilmiştir. Şekil 4.24'de elde edilen grafik dikkate alındığında elde edilen piklere ait türler, BART'ın T-RFLP veri tabanında araştırıldığında kültüre edilebilen herhangi bir türle eşleşmediği gibi toplamda %50'lik yoğunluğa sahip olan 4 türün de veri tabanında yer almadığı görülmüştür. Çan AMD'sinin arkeal 16S klon kütüphanesinin kurulması ile mevcut

eşleşmeler dizi analizi ile doğrulanması, daha önce veri tabanına girilmeyen nükleotitlere ait türlerin de veri tabanına işlenerek bu bilgi bankasına katkıda bulunulması sağlanacaktır.

16S rRNA'nın nükleik asit ekstraksiyonu, DNA'nın, PCR reaksiyonu ile çoğaltması, ürünün saflaştırılması, uygun bir klonlama vektörüne (genelde plazmit) ligasyonu, konakçı bir bakteriye transformasyonu, plazmidin izolasyonu ve dizileme aşamalarından oluşan zaman alıcı, kantitatif olmayan ancak güvenilir bir yöntem olan 16S klonlama sayesinde elde edilen diziler, internetten erişimi mümkün olan bazı tarama sitelerindeki mevcut tür dizileri ile kıyaslanmaktadır (Madden et al., 1996). Şekil 4.30'da Çan AMD'sinin bakteriyel klon kütüphanesi kurulması çalışmasında 100 klon arasından rastgele seçilen 10 klonun 2 restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucunda 6 farklı profil gözlenmiştir. Bu profil sonucunda temsili klonlar seçilerek dizileme işlemi gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.7'de görüldüğü gibi 10 klondan 5 tanesinin neredeyse yarısının aynı bant profili verdiği görülmüş ve bu klonlardan temsili seçilen 2 ayrı klonun da *Acidiphilium* sp. ile eşleştiği görülmüştür. Bu sonuç Çan AMD'de *Acidiphilium* sp. türünün dominant olduğunun T-RFLP yönteminin yanısıra 16S klonlama yöntemi ile de doğrulandığının kanıtı olmaktadır.

Ferriatrix thermotolerans, bugüne kadar sadece Yellowstone ulusal parkından izole edildiği bildirilen bir türdür (Johnson et al., 2009). Sunulan tez çalışmasında T-RFLP profillerine göre hem Balya AMD'de hem de Çan AMD'de *F. thermotolerans*'in varlığı gösterilmiş olmakla birlikte, kültüre alınamamıştır. Aslında, *F. thermotolerans*'in FeTSB ortamında gelişmesi beklenmektedir. Ancak yapılan tekrarlı inkübasyonlarda her hangi bir gelişme görülmemiştir. Her iki AMD'nin sıcaklık değerleri ılımlı denilebilecek düzeyde olmalarına karşın *F. thermotolerans*'in T-RFLP profillerinde görülmesi üzerinde gelecekte çalışılması gereken bir durum olarak değerlendirilmektedir.

Geçmişteki mikrobiyal ekolojik çalışmaların çoğu, mikroorganizmaların çevreden izolasyonu ve karakterizasyonu ile sınırlandırılmıştır. Bu yaklaşım mevcut biyoçeşitlilik üzerine değerli bilgiler sağlamış olmasına rağmen bu şekilde elde edilen çeşitlilik tam anlamıyla bütünü yansıtmamaktadır. Bu tez çalışmasında da agaroz petrilerinde koloni olarak elde edilen mikroorganizma yüzdesi genel olarak düşük

olmuştur. Kültüre bağımlı yaklaşım kültürden bağımsız yaklaşımla desteklenmiş ve her iki AMD örneği için de daha bütüncü ve gerçek komünite yapıları ortaya konulmaya çalışılmıştır. Şekil 4.31-4.34, Balya ve Çan'daki mevcut bakteri ve arke çeşitliliğinin hem yöntemsel hem de lokalite açısından karşılaştırılmasını şematize etmektedir. Bu bilgiler ışığında moleküler yöntemlerle elde edilen prokaryotik çeşitliliğin özellikle dominant üyelerinin kültüre bağımlı yöntemler sayesinde izole edildiğini göstermektedir.

Günümüzde ülkelerin sahip olduğu biyoçeşitlilik oldukça önemli bir zenginlik olarak kabul görmektedir. Türkiye'nin sahip olduğu zengin biyoçeşitlilik unsurlarının envanterleri oluşturulmaya hızla devam edilirken, önemli bir durumda bu biyolojik kaynaklardan etkin ve sürdürülebilir yararlanma süreçlerinin geliştirilmesidir. Ülkelerin sahip olduğu yer altı kaynakların çeşitliliği ve zenginliği ülke ekonomisi için ne kadar yararlı ve değerli ise, biyoçeşitlilikte benzer bir etkiye sahiptir. Bu anlamda mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesine koşut olarak biyoteknolojik uygulamalarında birlikte planlanması gerek zaman ve gerekse ekonomik bir kazanç sağlayabilecektir. Sunulan tez çalışmasında, asidik maden drenajı örneklem yeri olarak seçilmiştir. Bu nedenle çalışma, ülkemizde asidofil mikrobiyal çeşitliliğinin envanteri oluşmasında bir ilki yansıyacak olmasının yanı sıra; kültüre edilen mikrobiyal türlerin biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilirliğini araştırmak için model bir çalışma olarak düşük kaliteli linyit kömürlerinin iyileştirilmesi sürecinde biyodesülfürizasyon çalışmaları planlanmıştır.

Sunulan tez çalışması kapsamında yapılan izolasyon çalışmalarında elde edilen izolatlar arasında yer alan *At.ferrivorans* kükürt oksidasyon yeteneğine sahip olduğu bilinen bir türdür (Hallberg et al., 2010). Tez çalışması kapsamında bu bakterinin kültüre edilmiş olması nedeni ile çalışmanın hedefleri arasında yer alan biyodesülfürizasyon deneylerine bu tür ile devam edilmiştir. Sunulan tez çalışması kapsamında Balya AMD'den elde edilen *At.ferrivorans* 'ın etkinliğini belirleyebilmek için optimizasyon çalışmaları da yapılmıştır.

Optimizasyon çalışmasında etkili olduğu düşünülen parametreler olarak, pH, inokulum miktarı, pulp yoğunluğu, kömür partikül boyutu ve inkübasyon süresi seçilerek Taguchi deney tasarım modeli uygulanmıştır. Bu deney tasarım modeli ile aynı anda, seçilen parametrelerin birbirleri ile kombine edilmiş, deneysel tasarım

sayesinde ortogonal array deney seti oluşturularak çalışılmıştır. Bu deney setinde *At.ferrivorans* ile aşılamanın yapılmadığı kontrol ve *At.ferrivorans* ile aşılama yapılarak oluşturulan deney gruplarının 15 günlük inkübasyonları sonunda elde edilen pH değerleri Çizelge 4.8’de verilmiştir. Literatür bilgilerimize göre desülfürizasyon sürecinde ortamın pH değeri asidik seviyelerde kalmalı ya da biraz daha düşüş göstermelidir. Çizelge 4.8’de gösterilen deney gruplarından 4, 6, 10 ve 15 no’lu deneylerde başlangıç pH değeri asidik koşullarda iken, deney sürecinde kontrol ve deney gruplarında pH değerlerinin nötral seviyelere ulaştığı görülmektedir. pH değişiminin inokulum içermeyen kontrol gruplarında da görülmesi bu değişikliğin nedeninin biyolojik olmadığını, kimyasal süreçlerden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Çizelge 4.9’da aynı numaralı deney gruplarının desülfürizasyon seviyelerinin %2–7 aralığında kaldığı görülmektedir. Diğer deney gruplarında başlangıç pH değerinin hem kontrol hem de inokulum içeren çalışma gruplarında pH değerindeki küçük miktardaki artışlar kimyasal süreçler ile birlikte bir miktar biyolojik etkilerden de kaynaklanabilir. Demir okside eden prokaryotların sıvı kültürlerinin pH değerleri, ortamın başlangıç pH değerine ve ferro demir konsantrasyonuna bağlı olarak artış gösterebilir. Ferro demir oksidasyonu proton tüketen bir reaksiyondur ve oksidasyon ilerledikçe pH artma eğilimindedir. İnokulum içeren ortamdaki pH değerlerinin az da olsa kontrol gruplarına kıyasla düşük olmaları ise, pH azalmasına neden olan ferrik demir hidrolizinin gerçekleşmesi ile oluşabileceği düşünülmektedir (Hallberg and Johnson, 2007; Dastidar et al., 2000). Çizelge 4.8’de verilen değerler incelendiğinde en yüksek kükürt giderim oranına 7 no’lu deney grubunda ulaşılmıştır. Burada 7 no’lu deney olarak gösterilen grubun koşulları pH 2,5; kömür partikül boyutu –250+106 µm, inokulum miktarı %5; pulp yoğunluğu %1, inkübasyon süresi 2 haftadır. Bu koşullarda ortalama %32,289’luk bir kükürt giderimi elde edilmiştir.

Şekil 4.35 incelendiğinde pH’ın 3 düzeyine kadar artması ile kükürt gideriminde bir artış elde edilebileceği ve ancak daha sonraki artışların kükürt giderimini olumsuz etkileyeceği görülmüştür. Çalışmada kükürt gideriminde kullanılan *At. ferrivorans*’ın pH toleransının çok fazla olmadığı bilinmektedir (Hallberg et al, 2010). Bu nedenle çalışmamızda pH değerinin 3’ün üzerine çıkması durumunda *At. ferrivorans*’ın bu pH

değişimini tolere edemeyeceği ve dolayısı ile metabolik olarak aktif olmasının beklenemeyeceği düşünülmektedir.

Genellikle biyodesülfürizasyonda görev alan mikroorganizmaların bu reaksiyonu kuvvetli asidik pH değerlerinde yapabilmektedirler. Dastidar ve arkadaşları (2000), *At. ferrooxidans* (ATCC 13984) biyokütlesi ile Hindistan kömürlerinden kükürt uzaklaştırılması için yaptıkları çalışmada pH değerini 1,4'e ayarlayarak çalışmaya başlamışlar ve hücre büyümesini takiben ortam pH değerini 2,0'de sabitlendiğini bildirmişlerdir. pH 2,0 gibi kuvvetli bir asidik ortamda %10 pulp yoğunluğunda %60'ın üzerine pirit oksidasyonunu yapabildiklerini bildirmişlerdir (Dastidar et al., 2000).

Cara ve arkadaşlarının *At. ferrooxidans* ve *L. ferrooxidans* bakterilerinin her ikisini sıkıştırılmış yatak reaktörde üreterek semiantrasit kömürden kükürt gideriminde; 20 günlük bir inkübasyon sürecinde, pH 1.5 değerinde, ardışık kolon sisteminde en yüksek verime % 30 ile 2 no'lu kolonda ulaşılmıştır (Cara et al., 2005).

Kömür partikül boyutu küçüldükçe, etkin yüzey alanının artması nedeni ile kükürt gideriminin de artması beklenirken, elde edilen sonuçların bu durumun tam tersi olduğu görülmektedir. Bu durum iki şekilde açıklanabilir. Birincisi, kömür daha küçük boyutlara parçalandığında mikroorganizmanın metabolizmasını olumsuz yönde etkileyebilecek silikat gibi yapıların ortaya çıkması ile mikroorganizmanın büyümesi için sınırlayıcı bir faktör olmasıdır. İkincisi ise, çalışmamızın ilerleyen aşamalarında yaptığımız SEM analizlerinden de görülebileceği gibi kömürün yüzeyinde bakterinin yerleşebilmesi için daha geniş yüzeylere gereksinim duyabileceği düşüncesidir (bkz. Şekil 4.40 ve 4.41, SEM görüntüleri).

Ancak partikül boyutu küçüldükçe kömür içerisinde bulunan pirit yüzeylerine mikrobiyal atakların daha fazla olabileceği de unutulmamalıdır. Şekil 4.41'de *At. ferrivorans*'ın atak yaptığı kömür partükülleri açıkça görülmektedir. Bununla birlikte *At. ferrivorans*'ın sadece pirit oksidasyonu yapmadığı bununla birlikte diğer kükürt formlarını da okside etmesi nedeni ile (Çizelge 4.16) partikül boyutunun denenen aralıklarda en iyi partikül boyutu olarak -500+250 µm seçilmiştir.

İnokulum miktarının etkisini belirlemek için yapılan çalışmada Şekil 4.35'den de görülebileceği gibi %2 ve %5 inokulum miktarlarında neredeyse aynı oranda bir kükürt giderimi elde edilmiştir. Ancak %3 inokulum miktarındaki kükürt gideriminde beklenmedik bir düşüş gözlenmiştir.

Pulp yoğunluğu arttıkça desülfürizasyon etkinliğinin azalması beklenen bir sonuçtur. Denemede kullanılan en düşük pulp yoğunluğu olan % 1 seviyesinde en yüksek kükürt giderimi elde edilirken, en düşük kükürt giderimine %5 pulp yoğunluğunda ulaşılmıştır. Bununla birlikte % 10 pulp yoğunluğunda bir artış olurken, en yüksek kükürt giderim oranının elde edildiği pulp yoğunluğundaki oran ile kıyaslandığında %5 ve %10 oranındaki pulp yoğunluğundaki değişimin desülfürizasyona etkisinin önemsiz düzeyde kaldığı söylenebilir. Aytar ve arkadaşlarının 2008 yılında, ülkemizde düşük kaliteli linyit kömürlerinden kükürt giderimi için beyaz çürükçül funguslardan *Trametes versicolor* ATCC 200801 kullanarak yaptıkları çalışmada %5 oranından daha yüksek pulp yoğunluğunun, kükürt giderimini olumsuz etkilediğini bildirmişlerdir (Aytar et al., 2008). Benzer biçimde literatürde artan pulp yoğunluğunun kükürt giderimini sınırladığını gösteren çalışmalar vardır. Örneğin, *At. ferrooxidans* ile yapılan bir çalışmada pulp yoğunluğunun % 20 seviyelerine kadar artırılmasının herhangi bir sınırlama getirmediği ve ancak, %20'nin üzerinde kükürt gideriminde düşüş olduğu görülmüştür (Acharya et al., 2001). Pulp yoğunluğunun artışı ile gözlenen desülfürizasyon oranındaki azalmanın nedeni olarak, kömür bileşenlerinin daha konsantre halde bulunmasının yanı sıra kömür yüzeyindeki bozulmayı gerçekleştirecek mikroorganizmanın metabolik stresi ile ilişkilendirilebilir (Chaudhury, 1994).

İnkübasyon süresinin etkisinin belirlenmesi için yapılan denemelerde en etkin sürenin 2 hafta olduğu görülmektedir. Çalışmaların kesikli sistemde yapıldığı düşünülürse elde edilen 15 günlük inkübasyon süresinin sürekli sistemlere uygulanabilirse biraz daha kısaltılabileceği düşünülmektedir. Genellikle kömür gibi farklı bileşenlere sahip kompleks bir yapıdan 15 gün gibi bir inkübasyon sürecinde etkin desülfürizasyon seviyelerine ulaşılması önemli olarak değerlendirilmektedir.

Çizelge 4.10, anlamlar için yanıt tablosunu göstermektedir. Buna göre optimizasyon parametrelerinden en etkilisinin inkübasyon süresi olduğu belirlenmiştir. Etkinliklerine göre diğer parametreler ise sırası ile, pulp yoğunluğu, kömür partikül boyutu, pH ve inokulum miktarı olduğu görülmektedir.

Farklı kükürt formları arasında değişiklik göstermekle birlikte, literatürde 48 saatten aylar seviyesine kadar değişen geniş bir zaman diliminde kükürt giderimi

yapabilen mikrobiyal türlerin varlığına rastlanılmaktadır (Bozdemir et al., 1996; Acharya et al., 2001; Malik et al., 2001).

Minitab'ta yapılan analiz sonucunda desülfürizasyon açısından etkin izolatin pH 2,5'da, %2 inokulum miktarı ile 2 haftalık inkübasyon süresi sonunda %1 pulp yoğunluğunda $-500+250$ μm partikül boyutunda kömürü optimum düzeyde desülfürize edebildiği belirlenmiştir. Bu parametreler kullanılarak gerçekleştirilecek doğrulama deneyinde elde edilmesi düşünülen desülfürizasyon sonucu %35,8227'dir. Doğrulama deneyinde ise % 33,37 elde edilmiştir. Dolayısı ile doğrulama deneyinde elde edilen sonuçların güven aralığında olduğunu söyleyebiliriz. Erincin ve arkadaşlarının, Mengen ve Gediz linyitlerinden kükürt uzaklaştırmak amacı ile *Rhodococcus rhodochrous* ile yaptıkları bir çalışmada sırası ile %21,4 ve %25,3 oranında kükürt giderimi elde edebilmişlerdir (Erincin et al., 1998). Aytar ve arkadaşları (2008), Tunçbilek linyitlerinden kükürt uzaklaştırmak amacı ile *Trametes versicolor* ile yaptıkları çalışmada %40 oranında bir kükürt giderimi elde ettiklerini bildirmişlerdir. Dastidar ve arkadaşları, *Thiobacillus ferrooxidans* ile, %60'ın üzerinde piriti okside edebildikleri bildirmişlerdir (Dastidar et al., 2000). Kömürlerden kükürt uzaklaştırılmasında görev alan mikroorganizmaların, atakları sonucunda kömür yapısında bulunan farklı kükürt formlarını farklı düzeylerde etkiledikleri bilinmektedir. Mohebalı ve arkadaşlarının izole ettiği *Gordonia alkanivorans* bakterisi ile de hem bir organik kükürt bileşiği olan DBT hem de DBT içeren hegzadekanlar desülfürize edilmiştir (Mohebalı et al., 2007).

Peeples ve Kelly'nin yaptığı çalışmada termoasidofil bir tür olan *Metallosphaera sedula* kullanılmıştır. Bu bakteri metal sülfidleri çözebilmesi nedeniyle, kullanım açısından geçerli biyokatalitik bir alternatiftir (Peeples ve Kelly, 1993; Larrison et al., 1990). Kömür madenlerinin asit drenajından ya da kömürün yüzeyinden izole edilen yerli suşların, elde edildikleri kömürün piritik kısımlarını zenginleştirmede ya da piritik kükürdü gidermede yüksek etkinliğe sahip olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Cardona ve Marquez'in yaptıkları bir araştırmada izole edilen iki mikroorganizma ile iki tip kömürün biyolojik desülfürizasyonu çalışılmış ve asidik maden drenajından alınan örneklerdeki mikroorganizmalar kullanılmıştır. Bu çalışmada %85–95 piritik kükürt giderimi elde edilmiştir (Cardona and Marquez, 2009). Jorjani ve ark. (2004)

kömür madeni çevresinden alınan örneklerdeki mikroorganizmalarla çalışmış ve %53,5 toplam kükürt giderimi sağlamışlardır.

Tez çalışması kapsamında, *At. ferrivorans* biyokütlesinin, farklı oranlarda kükürt içeren kömürler üzerinde kükürt giderimi açısından nasıl bir etki gösterdiği de değerlendirilmiştir. Ülkemizin farklı bölgelerindeki kömür yataklarını temsilen seçilen Artvin, Çan, Mihaliççık, Tunçbilek, Gediz kökenli kömürler, optimizasyon çalışması sonunda belirlenen optimum koşullarda biyolojik işleme tabi tutulmuştur. Uygulanan biyolojik işlem sonrası pH değişimlerine de bakılmıştır. pH değişimleri ve kükürt miktarlarındaki değişimleri Çizelge 4.12’de verilmiştir. Özellikle Mihaliççık’ın farklı bir rezervinden alınan kömür ile yüksek piritik kükürt oranına sahip Gediz kömürleri üzerinde *At. ferrivorans*’ın desülfürizasyonda olumlu yönde sonuç verdiği bulunmuştur. Diğer kömür tiplerinde uygulanan biyolojik işlem ile çok yüksek bir kükürt giderimi elde edilmemiştir. Elde edilen sonuçlara göre, kükürt oranı yüksek olan ve düşük ranklı kömürlerde *At. ferrivorans* ile daha başarılı bir kükürt giderimi elde edilebileceği düşünülmektedir. Artvin’den alınan kömür örneği antrasit olması ve yaşlı bir kömür olarak değerlendirilmesi nedeni ile mikrobiyal ataklara karşı daha dayanıklıdır. Bu nedenle biyodesülfürizasyonda beklenildiği gibi yaşça daha genç olan linyit kömürlerinde daha etkin sonuçlar elde edilmiştir.

Acidithiobacilli 3 türe sahip bir genustur. Bu genus üyeleri aşırı asidofilik gammaproteobacteria, üyesidir ve tek enerji kaynağı olarak elementel kükürtü ve kükürtün çeşitli formlarının indirgenmiş hallerini kullanarak ototrofik olarak büyür. Bu türler arasında *At. ferrivorans* ferro demiri elektron vericisi olarak kullanması nedeni ile diğer Acidithiobacilli üyelerinden ayrılır. Bu metabolik özellikler *At. ferrivorans*’ın desülfürizasyon çalışmaları için önemi bir alternatif olmasını sağlamıştır (Hallberg et al., 2010).

Kömür desülfürizasyonunun gerçekleştirildiği besi yerlerinde mikrobiyal büyümeden kaynaklanan renk değişimi Şekil 4.37’de gösterilmiştir. Başlangıçta besi yerinde yer alan Fe^{+2} , bakterinin metabolizması sayesinde oksidasyona uğrayarak Fe^{+3} formuna dönüşmektedir. Gözlenen renk değişimi, hatta bazı örneklerde Fe^{+3} presipitatların görülmesi bakteriyel metabolizmanın fiziksel bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Kükürt gideriminin gerçekleştiği erlenlerdeki besiyerleri sarıya

dönüşmüştür. Özellikle Şekil 4.37a ve Şekil 4.37f’de bakteri inokulumunun yapıldığı erlenlerdeki kontrolle karşılaştırıldığında sarı renge dönüşüm daha çarpıcı bir şekilde görülmektedir. Desülfürizasyonun gerçekleşmediği ya da diğerlerine göre daha az olduğu kömür örneklerinin besiyeri renginde çok fazla bir değişiklik olmamıştır.

Şekil 4.38 ve Şekil 4.39’da biyodesülfürizasyon öncesi ve sonrası kömür örneklerinin FTIR grafikleri verilmektedir. Çizelge 4.13’de, FTIR ile desülfürizasyon öncesi ve sonrası kömür yapısında gözlenen kimyasal yapıdaki değişimler gösterilmektedir. Bu çizelgede bant bozisyollarının yanı sıra bantlara karşılık gelen transmittans değerleri ve bantların yoğunlukları da yer almaktadır. Bazı bölgelerde meydana gelen bant değişimleri ya da kaymaları kükürt giderimi hakkında fikir verebilmektedir. Desülfürizasyon sonrasında kömürün yapısında değişikliklerden bir tanesi, desülfürizasyon sonrası da gözlenen ve S-O gerilmesi olarak önerilen 1035 cm^{-1} ’deki pikin şiddetinin arttığının, 775 cm^{-1} ’deki pikin ise işlem sonrasında şiddetinin artarak 771 cm^{-1} ’deki pike kaydığının görülmesidir. Bunun yanı sıra 1500 ve 1703 cm^{-1} piklerinin desülfürizasyon sonrası görülmemesi ile 1687 ve 626 cm^{-1} piklerinin sadece desülfürizasyon sonrası görülmesi; kömürün yapısında bulunabilen C-O, S-O, N-O, C-N bağlarının gerilimlerinin ve şiddetlerinin değişimlerini göstermektedir. FTIR analizi tek başına fikir vermesi açısından etkili bir yöntem olsa da güvenilirliği artırmak için başka analizlerle desteklenmesi gerekmektedir. FTIR analizinden elde edilen kimyasal yapıdaki değişimler SEM fotoğraflarında görülen yüzeydeki, bozulmalar ile görsel olarak da desteklenmektedir.

Biyodesülfürizasyon öncesi kömür partikülünün yüzey görüntüleri Şekil 4.40’da gösterilmiştir. *At.ferrivorans* ile gerçekleştirilen desülfürizasyon sonrası bakterinin özellikle pirit kristallerine yaptığı atak ve kömürün yüzeyinde meydana getirdiği korozyon, bozulma ve deformasyon Şekil 4.41’de görülmektedir. SEM görüntüleri kömür örnekleri üzerinde *At.ferrivorans*’ın kolonize olabilecek biçimde bir bozulma oluşturduğu ve pürüzsüz bir yapıdan oldukça girintili-çıkıntılı bir yüzeye dönüşümün hızlı sayılabilecek bir zamanda gerçekleştiği söylenebilir.

At. ferrivorans demir oksidasyonu-redüksiyonu yapabilen ve aynı zamanda kükürdü okside edebilen bir metabolizmaya sahiptir (Hallberg et al., 2010, Kupka et

al.). FeSO_4 besi yerinden izole edilen *At. ferrivorans*'ın belirlenen optimum koşullarda Mihallıçık linyit kömüründen desülfürizasyon sürecinde ortamdaki $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$ dönüşümleri ile birlikte ortamdaki redoks potansiyelleri belirlenerek gerçekleşen metabolik süreç izlenmeye çalışılmıştır. Desülfürizasyon ortamı 10 mM Fe^{+2} , TSB ve kömür örneğinden oluşmaktadır (bkz. 3.1.3.9). Burada başlangıçta ortamda sadece Fe^{+2} varken, inkübasyon süresince Fe^{+3} formunun da oluştuğu görülmüştür. Bu durum, *At. ferrivorans*'ın demir oksidasyon yeteneğine bağlı bir değişimdir. Ancak kontrol gruplarındaki değişim dikkate alındığında biyolojik oksidasyonun yanı sıra kimyasal oksidasyonun da olduğu görülmektedir. Ancak *At. ferrivorans*'ın oksidasyon düzeyi kimyasal oksidasyondan çok daha fazladır. Bilindiği üzere kemolitotrofi, asidofilik bakteriler ve arkeler için yaygın bir özelliktir (Hallberg and Johnson, 2007). Elementel kükürt de dahil olmak üzere kükürdün indirgenmiş formları *Acidithiobacillus* genusu üyesi bakteriler ve *Sulfolobus* genusu üyesi arkeler de kullanılmaktadır. Bazı asidofiller aynı zamanda enerji kaynağı olarak hidrojeni kullanabilmektedirler (Drobner et al., 1990; Johnson et al., 2012). *At. ferrioxidans* ferro demir oksidasyonu yapabilen ilk asidofil olarak karakterize edilmiştir (Silverman, 1967).

Sunulan tez çalışmasında da desülfürizasyon yeteneği Mihallıçık linyitleri üzerinde denenen *At. ferrivorans*'ın daha önce belirtildiği gibi demir oksidasyonu ile birlikte kükürt oksidasyon yeteneğine sahip kemolitotrofik bir bakteridir (Kupka et al., 2009). Çizelge 4.14'de de görüldüğü gibi $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$ 'e büyük oranda okside olmaktadır. Başlangıçta ortamda hiç Fe^{+3} bulunmamasına karşın inkübasyon ilerledikçe (10. ve 15. günlerde) Fe^{+2} 'nin azalmasına koşut olarak Fe^{+3} 'ün artış gösterdiği görülmektedir. Analiz sonuçlarında kontrol gruplarında toplam Fe miktarındaki değişimin nedeni olarak desülfürizasyon amacı ile ortama ilave edilen kömürün içeriğinde demir bulunabileceğidir. İnkübasyon koşullarının kuvvetli asidik özellikte olması ve inokulum olarak *At. ferrivorans* gibi demir transformasyonu yapabilen bir mikroorganizmanın kullanılması nedenleri ile kömürün içeriğindeki demir formlarında serbest hale geçerek sıvı fazda bulunabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda sunulan tez çalışmasının ilerleyen aşamalarında Mihallıçık linyit örneği üzerinde *At. ferrivorans*'ın yüksek oranda pirit oksidasyonu yapması nedeni ile ortamdaki demir konsantrasyonunun artış göstermesi beklenen bir sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Ortamda bulunan Fe^{+2} ve Fe^{+3} formlarının transformasyonları ortamın redoks potansiyeli ile doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle, sunulan tez çalışmasında ortamın redoks potansiyeli de belirlenerek, bakteriyal olarak transformasyonun gerçekleşmesi durumu takip edilmiştir. Desülfürizasyonda kullanılan besiyerinin 1 ve 2 haftalık kültür sıvısının $-0,3$ ile $+1,1$ V gerilim aralığında 50 mV/s tarama hızı uygulanarak dönüşümlü voltamogramı alınmış ve bunlar Şekil 4.42 ve 4.43’de gösterilmiştir. Elde edilen redoks potansiyelleri incelendiğinde *At. ferrivorans*’ın demirin hem redüksiyonunu hem de oksidasyonunu yapabildiğini göstermektedir. Elde edilen verilere göre her iki grafikte de inokulum içermeyen kontrol gruplarına kıyasla deney gruplarında akım miktarındaki düşüşlerin gözlenmesi demir transformasyonundan *At. ferrivorans*’ın sorumlu olduğunu düşündürmektedir. 15 günlük inkübasyon sonunda yapılan ölçüm sonuçlarında (Şekil 4.43) deney grubu için ölçülen $+153$ mV’lık potansiyel değeri (kontrol için $+108$ mV) oksidasyon reaksiyonunu gösterirken; $+788$ mV luk potansiyel (kontrol grubu için $+928$ mV) redüksiyon reaksiyonuna işaret etmektedir. Dolayısı ile gerek ortamdaki Fe^{+2}/Fe^{+3} değerlerinin niceliksel analizleri ve gerekse reaksiyon ortamının redoks potansiyeli analizlerinden elde edilen sonuçlara göre, *At. ferrivorans*’ın Mihallıçcık linyitlerinden kükürt giderimi sürecinde eş zamanlı olarak demir transformasyonunu da yapabildiğini söyleyebiliriz. Burada gerçekleşebilecek reaksiyonlar için önerilen denklemler Denklem 3–5’te verilmiştir.

Biyodesülfürizasyon öncesi ve sonrası TG/DTA ve DTG eğrileri Şekil 4.44 ve 4.45’de verilmiştir. Şekil 4.46 ise biyolojik işlem öncesi ve sonrası kömürlerin TG yanma profilleri açısından karşılaştırılmasını göstermektedir. Yüksek kükürt giderimi kömür yanma parametrelerinin de iyileşmesini sağlayabilmektedir. Termogravimetri (TGA) ve diferansiyel termal analiz (DTA) gibi termal analitik yöntemlerin kömür yanma davranışlarının çalışılmasında etkili araçlar olduğu gösterilmiştir (Chen et al., 1996; Küçükbayrak, 1993). Çeşitli yanma özellikleri TGA ve DTA profillerinden elde edilebilmektedir. Daha önce yapılmış olan TGA çalışmaları; yanmanın kömürdeki inorganik maddelerin varlığından, kömürleşme derecesinden ve maseralinden etkilendiğini göstermiştir (White et al., 1989; Crelling et al., 1992). Literatürde kömürün termal çalışması ile ilgili yayınlar olmasına rağmen termal davranışın üzerinde kükürdün etkisini ilişkilendiren yayınlar az sayıdadır (Pietrzak and Wachowska, 2004).

Termal davranışta görülen değişimler biyolojik işlem tarafından uyarılan oksidasyon süreçlerinden dolayı olabilir. Marinov ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kükürdü giderilmiş kömürlerin DTG eğrisinde ana degradasyon öncesi görülen tek pik 250-300 °C aralığındadır. Bu biyolojik işlem süresince ekstra uçucu maddenin açığa çıkmasına atfedilmiştir. Tüm örneklerdeki 350-400 °C aralığındaki ağırlık kayıpları bunu kanıtlamaktadır. Bu tez çalışmasında 400-500 °C aralığında % kütle kaybı desülfürizasyondan sonra 30'dan 50'ye artış göstermiştir. Bu da desülfürizasyon sonrası uçucu maddedeki azalışa atfedilebilir.

DTA profilleri yükselen sıcaklıklarda ısı akışının değerlendirilmesini göstermektedir. DTA eğrisinin ilk kısmı su adsorpsiyonu sonucu global endotermik süreç ve ekzotermik süreçle ilişkilidir. Oksidasyon reaksiyonları baskın olduğunda ve enerji dengesi ekzotermik olarak başladığında bu termal aralık bitmektedir. Bu yanma sürecini uçucu maddenin açığa çıkması ve kömür katranının yanması izlemektedir. Bu tez çalışmasında da biyodesülfürizasyon öncesi ve sonrası kömür örnekleri, yanma sürecinde farklı DTA profillerine sahiptir (Marinov et al., 2010). Desülfürizasyon sonrası profildeki bu farklılığın güçlü ekzotermik etkiden ve uçucu maddedeki değişimden kaynaklandığı düşünülmektedir.

At. ferrivorans'ın Mihalliçcik linyitlerinden kükürt gideriminde farklı kükürt formlarının değişimi incelendiğinde; piritik, organik ve sülfatik kükürt değerlerinde azalmanın olduğu görülmüştür (Çizelge 4.14). Literatürde biyodesülfürizasyon denemelerinde genellikle toplam kükürt giderimi daha düşük oranlarda elde edilmekle birlikte piritik kükürt gideriminin organik kükürde kıyasla daha yüksek olduğu görülmektedir. Sunulan tez çalışmasında da piritik kükürt giderimi %66 düzeyinde iken toplam kükürt giderimi %35 dolayındadır. Benzer bir durum Hindistan linyitleri ile yapılan bir çalışma da %60'ın üzerine pirit okside edildiği bildirilmiştir (Dastidar et al., 2000).

Kömürden kükürt gideriminde dikkat edilmesi gereken bir hususta, desülfürizasyon sürecinden sonra kömürün emisyon değeri, kül miktarı ve küldeki kükürt gibi kimyasal ve fiziksel özelliklerindeki değişimlerdir.

Kükürt emisyonunun (EV)'nin yüksek değeri, çevresel etkinin fazla olduğunu gösterir (Aller et al., 2001). EV tespiti için %3,42 wt kükürt değerine sahip Mihalıçcık linyitinin kükürt ve kalori değerleri baz alınmıştır. EV değeri 0,379 olarak hesaplanmıştır. *At. ferrivorans* ile gerçekleştirilen desülfürizasyon deneylerinde bu kömürlerin kükürt emisyon değerinin 0,315'e düştüğü görülmüştür (Çizelge 4.15). Buradan elde edilen veriler kükürt gideriminin yanı sıra Mihalıçcık linyit kömürünün emisyon değerinde de önemli bir düşüş elde edildiğini göstermektedir. Bununla birlikte, biyodesülfürizasyon işlemi öncesinde kömürün kül miktarı %54,70 iken, biyodesülfürizasyon işleminden sonra kül miktarının % 61,58 olarak ölçülmüştür. Burada kül miktarındaki artış istenilmeyen bir durumdur. Bununla birlikte uçucu madde herhangi bir artış gözlenmemesi de olumlu bir değişim olarak değerlendirilmektedir. Kül miktarındaki artışa rağmen külün içeriğindeki kükürt miktarındaki önemli düşüş, külün miktar olarak artmasının bertaraf edilebilecek bir durum olduğunu düşündürmektedir. Küldeki kükürt giderimi %99 olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.16'da verilen C, H ve N analiz sonuçlarına göre biyodesülfürizasyon sürecinin sonunda kömürde C, H ve N oranlarında düşüş olduğu görülmektedir. Biyodesülfürizasyon çalışmasında kullanılan *At. ferrivorans*'ın kemolitotrof olduğu bilinmektedir. Dolayısı ile kömürdeki C, H ve N düzeylerindeki düşüş *At. ferrivorans*'ın bu metabolik özelliğinden kaynaklanmaktadır. Şekil 4.41'de verilen SEM fotoğraflarından da görülebileceği gibi kömür üzerinde mikrobiyal ataklar ve oluşan yapısal değişimler nedeni ile bakterilerin yerleşebileceği girintili çıkıntılı bir yüzey oluşması ve kömürün daha iç kısımlarında bulunan bileşenlerine bakterilerin ulaşabilmesi olası olabilmektedir.

Yeraltı ya da açık maden ocaklarından, atık kalıntılarından, tortulardan kaynaklanan kömür ya da metal maden drenajları özellikle kömür madenlerinin işletildiği bölgelerde ciddi bir endüstriyel problemdir. Zaman zaman sığ yeraltı suları ile toprak-su zonlarının kontaminasyonuna neden olabilmektedir. Yüzey sularına deşarj edildiğinde ferrik demir hidratlanmış demir oksit ve aşırı asidik koşullar üreterek hidroliz olur. Oluşan bu asidite yüzey sularının da pH'sını düşürür, bu da onu korozyon yapar, bunun yanı sıra bir çok sucül yaşam formunun yaşayamayacağı bir hal alır. Toksikite düzeyleri özellikle deşarj hacmi, pH, toplam asidite, çözülmüş metal konsantrasyonu, alıcı akarsuların tamponlama kapasitesine bağlıdır. Asidik maden

drenajları toksisiteleri ve içerdikleri yüksek ağır metal konsantrasyonu nedeni ile insan sağlığı açısından çok ciddi bir tehdide işaret etmektedir. Bu suların karıştığı sucul sistemler de risk altındadır. Söz konusu suların insanlar ve hayvanlar tarafından içilmesinin, uzun vadede ciddi bir sağlık riski oluşturacağı açıktır. Bu durum sucul organizma habitatını etkilediği gibi ayrıca tarımsal aktiviteyi, bitki örtüsünü, sanayi ve içme sularının tedarikini de olumsuz etkiler. Bu nedenlerle pası yığınlarının uygun şekilde rehabilite edilerek yüzeysel ve yeraltı su kaynaklarına olan etkilerinin en aza indirilmesi önem taşımaktadır. Bu amaçla sızıntı suyu drenajının önlenmesi en önemli konu olarak ortaya çıkmaktadır. Özellikle bu alanlarda rehabilitasyon çalışmaları günümüzde revaçtadır (Kaksonen et al., 2003; Wei et al., 2007; Bayrakdar et al., 2009; Şahinkaya and Yucesoy, 2010; Şahinkaya and Gungor, 2010; Bekmezci et al., 2011; Şahinkaya et al., 2011). Maden atıklarının dere kenarları gibi geçirimsizliği yüksek olan bir alanda depolanması çok ciddi tehlike arz etmektedir (Şimşek et al., 2012). Sülfat indirgeyen bakteriler gibi AMD'leri iyileştirme potansiyeline sahip mikroorganizmaların izolasyonu, gelecekte yapılması düşünülen çalışmaların bir ayağını oluşturacaktır. Bu gibi çevresel koruma tedbirleri çevresel riskleri en aza indirerek toplumumuzda madencilğe olan olumsuz yargının da değişmesine de katkı sağlayacaktır.

Özetle sunulan tez çalışması;

- 1) Ülkemizdeki AMD'lerin mikrobiyal çeşitliliğini belirleyen bir çalışma olması açısından bir ilki yansıtmaktadır. Hem Çan hem de Balya AMD'leri ile ilgili risk değerlendirmeleri ve jeolojileri ile ilgili çalışmalar mevcut olsa da bu yerlerden kültüre bağımlı ve kültürden bağımsız yöntemlerle mikrobiyal çeşitlilik ile ilgili yapılan ilk çalışmadır.
- 2) Her iki AMD'den kültüre edilen tüm izolatlar, ülkemiz için ilk kayıttır.
- 3) Ülkemizdeki AMD'lerde yaşayabilen mikroorganizmaların biyoteknolojik potansiyellerini bir model uygulama olarak desülfürizasyonun kullanıldığı ilk çalışmadır.
- 4) Sunulan tez çalışması kapsamında izole edilen *At. ferrivorans* ile linyit kömüründe biyosesülfürizasyon çalışması ilk kez yapılarak literatüre katkı sağlanmıştır.

- 5) Çan AMD'sinden kültüre edilebilen bir izolatın (PA-H6) dizi analizi sonuçlarına göre şimdiye dek kültüre edilemediği ve ilk kez bu tez çalışmasında kültüre edilebildiği gösterilmiştir.
- 6) Kültürden bağımsız çalışmalardan T-RFLP ile elde edilen veriler ışığında Çan AMD'sinde kültüre edilemeyen arkelerin varlığı tespit edilmiştir.
- 7) Her iki AMD örneğinin hem kültüre bağımlı hem de kültürden bağımsız gerçekleştirilen mikrobiyal komünite analizlerinden elde edilen verilerin birbiriyle uyumlu olduğu, moleküler tekniklerle dominant görünen türlerin aynı zamanda kültüre edilebildiği gösterilmiştir.

Çalışma ekseninde ileride yapılması planlanan çalışmalar;

- a) Elde edilen izolatlar arasında henüz kültüre edilemeyen bakteri ya da klonları ile eşleşen türlerin dizi analizleri diğer primerler de kullanılarak gerçekleştirilecek ve bu türler daha detaylı karakterizasyona tabi tutulacaktır.
- b) Çalışma süresince başlanan 16S klonlama çalışmaları tamamlanacak ve her iki AMD'nin sahip olduğu prokaryotik çeşitlilik konusunda çok daha detaylı bir konsensus sağlanacaktır.
- c) Çalışma kapsamında elde edilen izolatların özellikle biyomadencilik alanında önemli bir potansiyele sahip olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla bu yerel izolatların biyoliçing, biyooksidasyon, enzimatik süreçler ya da seçici metal tutunumu gibi biyoteknolojik çalışmalarda kullanılması planlanmaktadır.
- d) Desülfürizasyon deneylerinin fermentör ölçeğinde gerçekleştirilmesi ve parametrelerin optimizasyonu planlanmaktadır.
- e) Özellikle kültüre edilebilen türlerin asidik maden drenajlarının biyolojik iyileştirme "biyoremediasyon" süreçlerinde kullanılması hedeflenmektedir.
- f) Her iki AMD'nin sıcaklık değerleri ılımlı denilebilecek düzeyde olmalarına karşın *F. thermotolerans*'ın T-RFLP profillerinde görülmesi nedeni ile özellikle bu bakteri üzerinde çalışmalara devam edilecektir.

6. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Acharya, C., Kar, R.N., Sukla, L.B., 2001, Bacterial removal of sulphur from three different coals, *Fuel*, 80, 2207-2210.
- Aguilar-Barajas E, Díaz-Pérez C, Ramírez-Díaz MI, Riveros-Rosas H, Cervantes C., Bacterial transport of sulfate, molybdate, and related oxyanions, *Biometals*. 2011; 24, 687-707
- Akçıl, A., Çiftçi, H., 2003, Küre Bakır Cevherinin Bakteriyel Liçi, *Madencilik Dergisi*, 42, 15-25.
- Akira, H., Nagashima, KVP., Matsuura, K., Shimada, K., Takaichi, S., Wakao, N., Katayama, Y., 1998, Phylogeny and photosynthetic features of *Thiobacillus acidophilus* and related acidophilic bacteria: its transfer to the genus *Acidiphilium* as *Acidiphilium acidophilum* comb. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48, 1889-1898.
- Aller, A., Martinez, O., De Linaje, A., Mendez, R., Moran, A., 2001, BIODESULPHURISATION OF COAL BY MICROORGANISMS ISOLATED FROM THE COAL ITSELF, *Fuel Processing Technology*, 69, 45.
- Altschul, SF., Madden, TL., Schäffer, AA., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, DJ., 1997, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research*, 25, 3389–3402.
- Amann, R.J., Binder, B.J., Olson, R. J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D. A., 1990, Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations, *Applied Environmental Microbiology*, 56, 1919-1925.
- Amann, R.J., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995, Phylogenetic identification of individual microbial cells without cultivation, *Microbiology Reviews*, 59, 143-169.
- Amann, R., Ludwig, W., 2000, Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology, *FEMS Microbiology Reviews*. 24,555-565.
- Amils, A., Irazabal, N., Moreira, D., Abad, J.P., Marín, I., 1998, Genomic organization analysis of acidophilic chemolithotrophic bacteria using pulsed field gel electrophoresis techniques, *Biochimie*, 80, 911–921.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Amils, R., González-Toril, E., Fernández-Remolar, D.C., Gómez, F., Aguilera, A., Rodríguez, N., Malki, M., García-Moyano, A., Fairén, A.G., de la Fuente, V., Sanz, J.L., 2007, Extreme environments as Mars terrestrial analogs: The Río Tinto case, *Planetary and Space Science*, 55, 370-381.
- Amouric A., Appia-Ayme C., Yarzabal A., Bonnefoy V., 2009, Regulation of the iron and sulfur oxidation pathways in the acidophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Adv. Mat. Res.*,71, 163–166.
- Andreas S., Annemarie N., Kristjansson JK., Stetter K., 1986, *Acidianus infernus* gen. nov. sp. and *Acidianus brierleyi* comb. nov. : facultatively aerobic, extremely acidophilic thermophilic sulfur-metabolizing archaeobacteria, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 559-564.
- Anton, J., Llobet-Brossa, E., Rodriguez-Valera, F., Amann, R., 1999, Fluorescence in situ hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds, *Environmental Microbiology*, 1, 517-523.
- ASTM, 2004, Standat test methods for sulfur in the analysis sample of coal and coke using high-temperature tube furnace combustion methods, USA.
- Atalay, M., 2007, Kale-Kurbalık (Denizli-Türkiye) kömürlerinin mineralojisi ve petrografisi, Yüksek Lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi, 175 s.
- Ateşok, G., 2004, Kömür Hazırlama ve Teknolojisi, Yurt Madenciliğini Geliştirme Vakfı Yayınları, İstanbul, ISBN-975-7946-22-2, 376 s.
- Auernik, K. S., Maezato, Y., Blum, P. H. & Kelly, R. M., 2008, The genome sequence of the metal-mobilizing, extremely thermoacidophilic archaeon *Metallosphaera sedula* provides insights into bioleaching-associated metabolism. *Appl Environ Microbiol.*, 74, 682–692.
- Austin C.B., Dopson M., 2007, Life in acid: pH homeostasis in acidophiles, *Trend in Microbiology*, 15, 165-172.
- Aycan, M., Meke Gölü ve Konya Acıgöl'ün prokaryotik çeşitliliğinin araştırılması, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 159 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Aykol, A., Budakoğlu, M., Kumral, M., Gültekin, A.H., Turhan, M., Esenli, V., Yavuz, F., Orgun Y., 2003, Heavy metal pollution and acid drainage from abandoned Balya Pb-Zn sulfite mine, NW Anatolia, Turkey, *Environmental Geology*, 45, 198-208.
- Aytar, P., Şam, M., Çabuk, A., 2008, Microbial desulphurization of Turkish lignites by white rot fungi, *Energy and Fuels*, 22, 1196-1199.
- Aytar, P., Gedikli, S., Şam S., Ünal A., Çabuk A., Kolankaya N., Yürüm A., 2011, Desulphurization of some low-rank Turkish lignites with crude laccase produced from *Trametes versicolor* ATCC 200801, *Fuel Processing Technology*, 92, 71-76.
- Baruah, M.K., Gogoi, P.C., 1998, A new form of sulphur in coal: the discovery of an iron-sulphur coordination compound, *Fuel*, 77, 979-985.
- Bathe, S. & Norris, P. R., 2007, Ferrous iron- and sulfur-induced genes in *Sulfolobus metallicus*. *Appl Environ Microbiol.*, 73, 2491–2497.
- Bayrak, Z., 1996, Taguchi yönteminin kalite kontrolüne uygulanması, Yüksek Lisans tezi, Kocaeli Üniversitesi, 135 s.
- Bayrakdar, A., Sahinkaya, E., Gungor, M., Uyanik, S., Atasoy, A.D., 2009, Performance of sulfidogenic anaerobic baffled reactor (ABR) treating acidic and zinc-containing wastewater, *Bioresource Technology*, 100, 354-360.
- Bayram, Z., Bozdemir, T., Durusoy, T., Yürüm, Y., 2002, Biodesulfurization of Mengen lignite with *Rhodococcus rhodochrous*: Effects of lignite concentration and retreatment, *Energy Sources*, 24, 625-631.
- Bekmezci O.K., Ucar D., Kaksonen A.H., Sahinkaya E., 2011, Sulfidogenic biotreatment of synthetic acid mine drainage and sulfide oxidation in anaerobic baffled reactor, *Journal of Hazardous Materials*, 30, 189, 670-676.
- Benloch, S., Acinas, S.G., Anton, J., Lopez, L., Luz, S.P., Rodriguez-Valera, F., 2001, Archaeal biodiversity in crystallizer ponds from a solar saltern: culture versus PCR, *Microbial Ecology*, 41, 12-19.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Blake R.C., Howard G.T., McGinness S., 1994, Enhanced yields of iron-oxidizing bacteria by in situ electrochemical reduction of soluble iron in the growth medium, *Applied Environmental Microbiology*, 60, 2704-2710.
- Bonaccorsi, R., Stoker, C.R, 2008, Science results from a Mars drilling simulation (Río Tinto, Spain) and ground truth for remote science observations. *Astrobiology*, 8, 967-985.
- Bond P.L, Banfield J.F, 2001, Design and performance of rRNA targeted oligonucleotide probes for in situ detection and phylogenetic identification of microorganisms inhabiting acid mine drainage environments, *Microbial Ecology*, 41, 149-161.
- Boone, D. R, Casstenholz, R. W. ve Garrity, G. M. (eds.), 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2od. Edn. New York. Springer.
- Bozdemir, T.O., Durusoy, T., Erincin, E., and Yurum, Y., 1996, Biodesulfurization of Turkish lignites 1. Optimization of the growth parameters of *Rhodococcus rhodochrous*, a sulfur-removing bacterium, *Fuel*, 75, 13, 1596-1599.
- Brierley C.L., 2008, How will biomining be applied in future, *T Nonferr Metal Soc* 18, 1302-1310.
- Brock T.D., Brock K.M., Belly R.T., Weiss R.L., 1972, *Sulfolobus*: A new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature, *Archiv für Mikrobiologie*, 84, 1, 54-68.
- Bruneel, O., Duran, R., Casiot, C., Elbaz-Poulichet, F., Personné, J.-C., 2006, Diversity of microorganisms in Fe-As-rich acid mine drainage waters of Carnoulés, France, *Applied and Environmental Microbiology* 72, 551-556.
- Bruneel, O., Duran, R., Koffi, K., Casiot, C., Fourçans, A., Elbaz-Poulichet, F., Personné, J., 2005, Microbial diversity in a pyrite-rich tailings impoundment (Carnoulés, France). *Geomicrobiology Journal*, 22, 249-257.
- Bruneel, O., Pascault, N., Egal, M., Bancon-Montigny, C., Goñi-Urriza, M.S., Elbaz-Poulichet, F., Personné, J.C., Duran, R., 2008, Archaeal diversity in a Fe-As rich acid mine drainage at Carnoulés (France), *Extremophiles*, 12, 563-571.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bruscella, P., Appia-Ayme, C., Levicán, G., Ratouchniak, J., Jedlicki, E., Holmes, D.S., Bonnefoy, V., 2007, Differential expression of two bc1 complexes in the strict acidophilic chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* suggests a model for their respective roles in iron or sulfur oxidation, *Microbiology*, 153, 102-110.
- Bryan, C.G., Hallberg, K.B., Johnson, D.B., 2006, Mobilisation of metals in mineral tailings at the abandoned São Domingos copper mine (Portugal) by indigenous acidophilic bacteria, *Hydrometallurgy*, 83, 184–194.
- Budakoglu M., Pratt LM., 2005, Sulfur-isotope distribution and contamination related to the Balya Pb-Zn Mine in Turkey, *Environmental Geology*, 47,773-781.
- Canıyılmaz, E., 2001, Kalite geliştirmede Taguchi metodu ve bir uygulama, Yüksek Lisans tezi, Gazi Üniversitesi, 150 s.
- Cara, J., Carbolla, M.T., Moran, A., Bonilla, D., Escolano, O., Garcia Frutos, F.J., 2005, Biodesulphurization of high sulphur coal by heap leaching, *Fuel*, 84,1905.
- Cardona, I.C., Marquez, M.A., 2009, Biodesulfurization of two Colombian coals with native microorganisms , *Fuel Processing Technology*, 90, 1099-1106.
- Chaudhury, G.R., 1994, Biological degradation bioremediation of toxic chemicals; Dioscorides Press: Oregon.
- Chen Y., Mori S., Pan W.P., 1996, Studying the Mechanisms of ignition of coal particles by TG-DTA, *Thermochim. Acta*, 275, 149-158.
- Chen Z. W., Jiang C. Y., She Q., Liu S. J., Zhou P. J., 2005, Key role of cysteine residues in catalysis and subcellular localization of sulfur oxygenase-reductase of *Acidianus tengchongensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 621–628.
- Chi, A., Valenzuela, L., Beard, S., Mackey, A.J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Jerez, C.A., 2007, Periplasmic proteins of the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Mol. Cell, Proteomics*. 6, 2239–2251.
- Cho, J.-C., Tiedje, J.M., 2001, Bacterial species determination from DNA–DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays, *Applied Environmental Microbiology*, 67, 3677– 3682.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Christensen, P.R., Wyatt, M.B., Glotch, T.D., Rogers, A.D., Anwar, S., Arvidson, R.E., Bandfield, J.L., Blaney, D.L., Budney, C., Calvin, W.M., Fallacaro, A., Ferguson, R.L., Gorelick, N., Graff, T.G., Hamilton, V.E., Hayes, A.G., Johnson, J.R., Knudson, A.T., McSween, H.Y., Mehall, G.L., Mehall, L.K., Moersch, J.E., Morris, R.V., Smith, M.D., Squyres, S.W., Ruff, S.W., Wolff, M.J., 2004, Mineralogy at Meridiani Planum from the Mini-TES experiment on the Opportunity Rover, *Science*, 306, 1733-1739.
- Cifuentes, A., Anton, J., Benlloch, S., Donnelly, A., Herbert, R.A., Rodriguez Valera, F., 2000, Prokaryotic diversity in *Zostera noltii*-colonized marine sediments, *Applied Environmental Microbiology*, 66, 1715-1719.
- Clark D., Norris P., 1996, *Acidimicrobium ferrooxidans* gen. nov., sp. nov.: mixed-culture ferrous iron oxidation with *Sulfobacillus* species, *Microbiology*, 142, 785-790.
- Clark, D.A. and Norris, P.R. 1996, *Acidimicrobium ferrooxidans* gen. nov., sp. nov.: mixed-culture ferrous iron oxidation with *Sulfobacillus* species, *Microbiology* 141, 785-790.
- Crelling, J.C., Hippo, E.J., Woerner, B.A., West Jr., D.P., 1992, Combustion Characteristics of Selected Whole Coals and Macerals, *Fuel* 71, 151-158.
- Çelik C., 1993, Kalite geliştirmede tasarım eniyileme problemine Taguchi yöntemlerinin uygulanmasında sistematik bir yaklaşım, Anadolu üniversitesi, Doktora tezi, Eskişehir.
- Çömlekçi N., 2003, Deney tasarımı ilke ve teknikleri, Alfa yayınları, İstanbul.
- Dastidar, M.G., Malik, A., Roychoudhury P.K., 2000, Biondesulphurization of Indian (Assam) coal using *Thiobacillus ferrooxidans* (ATCC 13984), *Energy Conversion & Management* 41, 375-388
- De Bruyn J.C., Boogerd F.C., Bos P., Kuenen J.G., 1990, Floating filters a novel technique for isolation and enumeration of fastidious, acidophilic, iron-oxidizing, autotrophic bacteria, *Applied Environmental Microbiology*, 56, 2891-2894.
- DeLong E., 1992, Archaea in coastal marine environments, *PNAS USA*, 89, 5685–5689.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Demirbilek, S., 1987, Kömür kullanımı ve ilgili çevre kirlenmesi, Madencilik, 26, 33-43.
- Denef, V.J., Mueller, R.S., Banfield, J.F., 2010, AMD biofilms: using model communities to study microbial evolution and ecological complexity in nature, ISME Journal, 4, 599–610.
- Deneke R., 2000, Review of rotifers and crustaceans in highly acidic environments of pH values ≤ 3 , Hydrobiologia, 433, 167-172.
- Dopson M., Johnson D.B., 2012, Biodiversity, metabolism and applications of acidophilic sulfur-metabolizing microorganisms, Environmental Microbiology, 14, 2620-31.
- Drobner, E., Huber, H., Stetter, K.O., 1990, *Thiobacillus ferrooxidans*, a facultative hydrogen oxidizer, Appl. Environ. Microbiol., 56, 2922-2923.
- Dufresne S., Bousquet J., Boissinot M., Guay R., 1996, *Sulfobacillus disulfidooxidans* sp. nov., new acidophilic, disulfide-oxidizing, gram-positive, spore-forming bacterium, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 46, 1056-1064.
- Dunbar, J., Ticknor, L.O., Kuske, C.R., 2000, Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis, Applied Environmental Microbiology, 66, 2943– 2950.
- Du Plessis, C.A., Slabbert, W., Hallberg, K. B. and Johnson, D. B., 2011, Ferredox: A biohydrometallurgical processing concept for limonitic nickel laterites.
- Dyall-Smith, M., 2004, Halohandbook, [www. microbiol.unimelb.edu.au / staff/mds/ HaloHandbook](http://www.microbiol.unimelb.edu.au/staff/mds/HaloHandbook).
- Ehrlich, H.L., 2004, Beginnings of rational bioleaching and highlights in the development of biohydrometallurgy: A brief history, The European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection, 4, 102-112.
- Erincin, E., Durusoy, T., Bozdemir, T.O., and Yürüm, Y., 1998, Biodesulphurization of Turkish lignites 3. The effect of lignite type and particle size on microbial desulphurization by *Rhodococcus rhodochrous*, Fuel, 77, 1121-1124.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fernández-Remolar, D.C., Prieto-Ballesteros, O., Rodríguez, N., Gómez, F., Amils, R., Gómez-Elvira, J., Stoker, C.R. 2008, Underground habitats in the Río Tinto Basin: A model for subsurface life habitats on Mars. *Astrobiology*, 8, 1023-1047.
- Finkelman R.B., 1994, Modes of occurrence of potentially hazardous elements in coal: Level of confidence, *Fuel Processing Technology*, 39, 21-34.
- Finkelman, R.B., Gross P.M.K., 1999, the types of data needed for assessing the environmental and human health impacts of coal, *International Journal of Coal Geology*, 40, 91-101.
- Fisher, M.M., Triplett, E.W., 1999, Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities, *Applied Environmental Microbiology*, 65, 4630–4636.
- García-Moyano, A., González-Toril, E., Moreno-Paz, M., Parro, V., Amils, R., 2008, Evaluation of *Leptospirillum* spp. in the Río Tinto, a model of interest to bihydrometallurgy, *Hydrometallurgy*, 94, 155–161.
- Garrido, P., González-Toril, E., García-Moyano, A., Moreno-Paz, M., Amils, R., Parro, V., 2008, An oligonucleotide prokaryotic acidophile microarray: its validation and its use to monitor seasonal variations in extreme acidic environments with total environmental RNA, *Environmental Microbiology*, 10, 836–850.
- Gemici U., 2008, Evaluation of the water quality related to the acid mine drainage of an abandoned mercury mine (Alaşehir, Turkey), *Environmental Monitoring and Assessment*, 147, 93-106.
- Gemici U., 2004, Impact of Acid Mine Drainage from the Abandoned Halikoy Mercury Mine (Western Turkey) on Surface and Groundwaters, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72, 482-489.
- Gemici U., Oyman T., 2003, The influence of the abandoned Kalecik Hg mine on water and stream sediments (Karaburun, İzmir, Turkey), *Sciences Total of Environment*, 132, 155-166.
- Gemici U., Tarcan G., 2007, Assessment of the pollutants in farming soils and waters around untreated abandoned Türkönü mercury mine (Turkey), *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*, 79, 20-24.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gemici Ü., Tarcan G., Somay M.A., Akar T., 2009, Factors controlling the element distribution in farming soils and water around the abandoned Halıköy mercury mine (Beydağ, Turkey), *Applied Geochemistry*, 24, 1908-1917.
- Gemmell R.T., Knowles C.J., 2000, Utilization of aliphatic compounds by acidophilic heterotrophic bacteria, The potential for bioremediation of acidic wastewaters contaminated with toxic organic compounds and heavy metals, *FEMS Microbiology Letters*, 192, 185-190.
- Gentry, T.J., Wickham, G.S., Schadt, C.W., He, Z., Zhou, J., 2006, Microarray applications in microbial ecology research, *Microbial Ecology*, 52, 159–175.
- Germida J.J., 1985, Modified sulfur-containing media for studying sulfur-oxidizing microorganisms, In: Caldwell DE., Brierley JA., Brierley CL., (ed.), *Planetary Ecology*, Van Nostrand reinhold, New York, NY, 333-344 p.
- Goltsman, D.S.A., Deneff, V.J., Singer, S.W., VerBerkmoes, N.C., Lefsrud, M., Mueller, R.S., Dick, G.J., Sun, C.L., Wheeler, K.E., Zemla, A., Baker, B.J., Hauser, L., Hauser, L., Land, M., Shah, M.B., Thelen, M.P., Hettich, R.L., Banfield, J.F., 2009, Community genomic and proteomic analysis of chemoautotrophic, iron-oxidizing *Leptospirillum rubrum* (Group II) and *Leptospirillum ferroplasma* (Group III) in acid mine drainage biofilms, *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 4599–4615.
- Gonsalves, L., Marinov, S.P., Stefanova, M., Yürüm, Y., Dumanli, A.G., Dinler-Doganay, G., Kolankaya, N., Sam, M., Carleer, R., Reggers, G., Thijssen, E., Yperman, J., 2008, Biodesulphurized subbituminous coal by different fungi and bacteria studied by reductive pyrolysis. Part 1: Initial coal, *Fuel*, 87, 2533-2543.
- Gonzalez-Toril, E., Gomez, F., Rodriguez, N., Fernandez-remolar D., Zuluaga, J., Marin, I., Amils, R., 2003, Geomicrobiology of the Tinto River, a model of interest for biohydrometallurgy, *Hydrometallurgy* 71, 301–309.
- Greene, E.A., Voordouw, G., 2003, Analysis of environmental microbial communities by reverse sample genome probing, *Journal of Microbiology Methods*, 53, 211–219.
- Gross, S., Robbins, E.I., 2000, Acidophilic and acid-tolerant fungi and yeasts, *Hydrobiologia*, 433, 1-3, 91-109

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hallberg, K.B., Kolmert, A.K., Johnson, D.B., Williams, P.A., 1999, A novel metabolic phenotype among acidophilic bacteria: aromatic degradation and the potential use of these microorganisms for the treatment of wastewater containing organic and inorganic pollutants, In R. Amils and A. Ballester (ed.), *Biohydrometallurgy and Environment toward the Mining of the 21st Century*, vol 9A, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 719-728 p.
- Hallberg, K. B., Johnson, D. B., 2001, Biodiversity of acidophilic microorganisms, *Advances Applied Microbiology*, 49, 37–84.
- Hallberg, K.B., Johnson, D.B., 2003, Novel acidophiles isolated from moderately acidic mine drainage waters, *Hydrometallurgy*, 71, 139-148.
- Hallberg, K.B., Johnson, D.B., 2005, Microbiology of wetland ecosystem constructed to remediate mine drainage from a heavy metal mine. *Science Total Environment*, 338, 53-66.
- Hallberg, K. B. and Johnson, D.B., 2007, Isolation, enumeration, growth, and preservation of acidophilic prokaryotes, In: *Manual of Environmental Microbiology*, 3rd Edition (Hurst, C. J., Crawford, R. L., Garland, J. L., Lipson, D. A., Mills, A. L. and Stetzenbach, L. D., eds). ASM Press, Washington, D. C., 1155-1165 p.
- Hallberg, K.B., Gonzalez-Toril, E., Johnson, D.B., 2010, *Acidithiobacillus ferrivorans*, sp. nov., facultatively anaerobic, psychrotolerant iron-, and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments, *Extremophiles*, 14, 9–19.
- Hallmann, R., Friedrich, A., Koops, H.P., Pommerening-Roser, A., Rohde, K., Zenneck, C., Sand, W., 1992, Physiological characteristics of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* and physicochemical factors influence microbial metal leaching, *Geomicrobiology Journal*, 10, 193-206.
- Handelsman, J., 2004, Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 669–685.
- Harrison, A.P, 1983, Genomic and physiological comparisons between heterotrophic thiobacilli and *Acidiphilium cryptum*, *Thiobacillus versutus* sp. nov., and *Thiobacillus acidophilus* nom. Rev, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33, 211-217.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Harrison, A.P., Norris, P.R., 1985, *Leptospirillum ferrooxidans* and similar bacteria: Some characteristics and genomic diversity, *FEMS Microbiology Letters*, 30, 99-102.
- He, H., Hong, F., Tao, X., Li, L., Ma, C., Zhao, Y., 2012, Biodesulfurization of coal with *Acidithiobacillus caldus* and analysis of the interfacial interaction between cells and pyrite, *Fuel Processing Technology*, 101, 73-77.
- Head, I. M., Saunders, J. R., Pickup, R. W., 1998, Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms, *Microbial Ecology*, 35, 1-21.
- Hedrich, S., Schlömann, M., Johnson, D.B., 2011, The iron-oxidizing proteobacteria. *Microbiology*, 157, 1551-1564.
- http://www.geographic.org/geographic_names/name.php?uni=10879659&fid=6238&c=turkey Erişim tarihi: 06.10.2012.
- <http://www.mobio.com/images/custom/file/protocol/12224.pdf>, UltraClean DNA isolation kit manual, Erişim tarihi: 06.10.2012.
- <http://www.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/wizard-plus-sv-minipreps-dna-purification-system-protocol/>, Promega Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System kit manual, Erişim tarihi: 06.10.2012.
- <http://www.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol/>, pGEM-T easy vector manual, Erişim tarihi: 06.07.2012.
- <http://www.chem-agilent.com/pdf/strata/400761.pdf>, Plasmid isolation kit manual, Erişim tarihi: 20.07.2012.
- Huber G., Spinnler C., Gambacorta A., Stetter K.O., 1989, *Metallosphaera sedula* gen. nov. and sp. nov. represents a new genus of aerobic, metal-mobilizing, thermoacidophilic archaebacteria, *Systematic Applied Microbiology*, 12, 38–47.
- Huber, H., Stetter, K.O., 1990, *Thiobacillus cuprinus* sp. nov., a novel facultatively organotrophic metal-mobilizing bacterium, *Applied Environmental Microbiology*, 56, 315-322.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hür, E., 2005, Polianilin türevlerinin paslanmaz çelik yüzeyinde elektrokimyasal sentezi ve anti-korozif özellikleri, Doktora tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 250 s.
- Ikumapayi F.K., Sundkvist J.E., Bolin N.J., 2009, Treatment of process water from molybdenum flotation. Conference in minerals engineering, Luleå, Sweden.
- International Energy Agency (IEA), 2007, Key World Energy Statistics, Paris.
- Johnson, D.B., 1991, Biological desulfurization of coal using mixed populations of mesophilic and moderately thermophilic acidophilic bacteria. In: Processing and Utilization of High-Sulfur Coals (Dugan, P.R., Quigley, D.R. and Attia, Y.A., Eds.), Elsevier, Amsterdam., 567-580 pp.
- Johnson, D.B. and Rang, L., 1993, Effects of acidophilic protozoa on populations of metal-mobilising bacteria during the leaching of pyritic coal. *Journal of General Microbiology*, 139, 1417-1423.
- Johnson, D.B., McGinness, S., Ghauri, M.A., 1993, Biogeochemical cycling of iron and sulfur in leaching environments. *FEMS Microbiology Reviews*, 11, 63-70.
- Johnson, D.B., 1995, Selective solid media for isolating and enumerating acidophilic bacteria, *Journal Microbiological Methods*, 23, 205– 218.
- Johnson, D.B. and Roberto, F.F., 1997, Heterotrophic acidophiles and their roles in the bioleaching of sulfide minerals. In: *Biomining: Theory, Microbes and Industrial Processes* (Rawlings, D.E., Ed.), Springer-Verlag/Landes Bioscience, Georgetown, TX, 259-280 pp.
- Johnson, D.B., Hallberg, K.B., 2003, The microbiology of acidic mine waters, *Research in Microbiology*, 154, 466-473.
- Johnson, D.B., Okibe, N., Roberto, F.F., 2003, Novel thermo-acidophilic bacteria isolated from geothermal sites in Yellowstone National Park: physiological and phylogenetic characteristics, *Archives of Microbiology*, 180, 60-68.
- Johnson, D.B., Hallberg, K., 2005, Acid mine drainage remediation options: a review, *Science Total Environment*, 338, 3-14.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Johnson, D.B., Bacelar-Nicolau, P., Okibe, N., Thomas, A., Hallberg, K.B., 2009, *Ferrimicrobium acidiphilum* gen. nov., sp. nov. and *Ferrithrix thermotolerans* gen.nov., sp. nov.: heterotrophic, iron-oxidizing, extremely acidophilic actinobacteria, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 1082–1089.
- Johnson, D.B., Kanao, T., Hedrich, S., 2012, Redox transformation of iron at extremely low pH:fundamental and applied aspects, *Frontiers in Microbiology*, 3, 3-13.
- Jorjani, E., Rezai, B., Vossoughi, M., Osanloo, M., 2004, Biodesulfurization of the Tabas deposit coal by microorganisms, *Journal of Mining Science* 40, 310–320.
- Kaksonen, A.H., Riekkola-Vanhanen M.L., Puhakka, J.A, 2003, Optimization of metal sulphide precipitation in fluidized-bed treatment of acidic wastewater, *Water Research*, 37, 255-66.
- Kamimura, K., Higashino, E., Kanao, T., Sugio, T., 2005, Effects of inhibitors and NaCl on the oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by a marine aciophilic, sulfur-oxidizing bacterium, *Acidithiobacillus thiooxidans* strain SH, *Extremophiles*, 9, 45-51.
- Kappler, A., Straub, K., 2005, Geomicrobiological cycling of iron, *Reviews in Microbiology & Geochemistry*, 55, 85-108.
- Karahalil, B., Ulukaya, M., Alp O., 2012, Pilot study of environmental monitoring of Konya region near abandoned mercury mine in Turkey, *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*, 88, 150-153.
- Karavaiko, G.I., Turova, T.P., Kondrat'eva, T.F., Lysenko, A.M., Kolganova, T.V., Ageeva, S.N., Muntyan, L.N., Pivovarova, T.A., 2003, Phylogenetic heterogeneity of the species *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 113–119.
- Karayığit, A.İ, 1989, Zonguldak ve Amasra Kömürlerinin Petrografik Özellikleri, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 315s.
- Kargı, F., Weismann, J.G., 1985, Kinetic parameter of estimation in microbial desulfurization of coal, *Biotechnology and Bioengineering*, 30, 9-15.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kargi, F., Robinson, J., 1985, Removal of sulfur compounds from coal by the thermophilic organism *Sulfolobus acidocaldarius*, *Applied Environmental Microbiology*, 44, 4- 878.
- Keller, M., Hettich, R., 2009, Environmental proteomics: a paradigm shift in characterizing microbial activities at the molecular level, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73, 62–70.
- Kelly, D.P., Shergill, W.P., Lu, W.P., Wood, A.P., 1997, Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria, *Antonie Leewenhoek*, 71, 95-107.
- Kelly, DP., 1999, Thermodynamic aspects of energy conservation by chemolithotrophic bacteria in relation to the sulfur oxidation pathways, *Arc. Microbiol.*, 171, 219-229.
- Kilbane, J.J., Daram, A., Abbasian, J., Kayser, K.J., 2002, Isolation and characterization of carbazole-degrading bacterium *Sphingomonas* sp. GTIN11, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 297, 242–248.
- Kimura, S., Hallberg, KB., Johnson, DB., 2006, Sulfidogenesis in Low pH (3.8–4.2) Media by a Mixed Population of Acidophilic Bacteria, *Biodegradation*, 17, 159-167.
- King, D.W., Lin, J., Kester, D.R., 1991, Spectrophotometric determination of iron(II) in seawater at nanomolar concentrations, *Analytica Chimica Acta*, 247, 125.
- Kirk, JL., Beaudette, LA., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, JN., Lee, H., Trevors, JT., 2004, Review: Methods of studying soil microbial diversity, *Journal of Microbiological Methods*, 58, 169–188.
- Kishimoto, N., Kosako, Y., Tano, T., 1991, *Acidobacterium capsulatum* gen. nov., sp. nov.: An acidophilic chemoorganotrophic bacterium containing menaquinone from acidic mineral environment, *Current Microbiology*, 22, 1-7.
- Kletzin A., 1992, Molecular characterization of the *sor* gene, which encodes the sulfur oxygenase reductase of the thermoacidophilic archaeon *Desulfurolobus ambivalens*. *J. Bacteriol.* 174, 5854–5859.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Klingelhöfer, G., Morris, R.V., Bernhardt, B., Schroder, C., Rodionov, D.S., de Souza, P.A., Yen, A., Gellert, R., Evlanov, E.N., Zubkov, B., Foh, J., Bonnes, U., Kankeleit, E., Gutlich, P., Ming, D.W., Renz, F., Wdowiak, T., Squyres, S.W., Arvidson, R.E., 2004, Jarosite and hematite at Meridiani Planum from Opportunity's Mössbauer spectrometer, *Science*, 306, 1740-1745.
- Kock, D., Graupner, T., Rammlmair, D., Schippers, A., 2007, Quantification of microorganisms involved in cemented layer formation in sulfidic mine waste tailings, *Advances in Materials Research*, 20–21, 481–484.
- Kock, D., Schippers, A., 2006, Geomicrobiological investigation of two different mine waste tailings generating acid mine drainage, *Hydrometallurgy*, 83, 167–175.
- Komnitsas, K., Paspaliaris, I., Zilberchmidt, M., Zilb Erchmidt, M., Groudev, S., 2001, Environmental impacts at coal waste disposal sites-efficiency of desulfurization technologies, *Global Nest: the Int. J.*, 3, 109-116.
- Kucera, J., Bouchal, P., Cerna, H., Potesil, J., Janiczek, O., Zdrahal, Z., and Mandl, M., 2012, Kinetics of anaerobic elemental sulfur oxidation by ferric iron in *Acidithiobacillus ferrooxidans* and protein identification by comparative 2-DE-MS/MS. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 101, 561–573.
- Kupka, D., Liljeqvist, M., Nurmi, P., Puhakka, JA., Tuovinen O.H., Dopson, M., 2009, Oxidation of elemental sulfur, tetrathionate and ferrous iron by the psychrotolerant *Acidithiobacillus* strain SS3, *Research in Microbiology*, 160, 767-774.
- Kural, O., 1991, Kömür, Kurtiş Matbaası, İstanbul, 17-49 s.
- Küçükbayrak, S., 1993, Volatile release profiles of some Turkish lignites, *Thermochim. Acta* 216, 119-129.
- Lagace, A. (2010) Development of a thiosulfate treatment system at Xstrata copper Kidd metallurgical site. In Annual Meeting of the Canadian Mineral Processors, Fragomeni, D., and Zinck, J. (eds). Ottawa, Canada: CIM, 87–96 pp..
- Lane, D.J., 1991, 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (eds. Stackebrandt E, Goodfellow M). Wiley, New York, 115–175 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Larsson, L., Olsson, G., Holst, O., Karlsson, H., 1990, Pyrite oxidation by thermophilic archaeobacteria, *Applied Environmental Microbiology*, 56, 697-701.
- Laska, S., Lottspeich, F., and Kletzin, A., 2003, Membrane-bound hydrogenase and sulfur reductase of the hyperthermophilic and acidophilic archaeon *Acidianus ambivalens*. *Microbiology*, 149, 2357–2371.
- Li, M., and Boucher, J.F., 1999, Thiosalts treatment by bicarbonate addition: a laboratory-scale feasibility study. In. *Pointe-Claire, Quebec: Noranda Inc. Technology centre*.
- Liljeqvist, M., sundkvist, J., Saleh, A., Dopson, M., 2011a, Low Temperature Removal of Inorganic Sulfur Compounds From Mining Process Waters, *Biotechnology and Bioengineering*, 108, 1251-1259.
- Liljeqvist, M., Valdes, J., Holmes, D.S., Dopson, M., 2011b, Draft genome of the psychrotolerant Acidophile *Acidithiobacillus ferrivorans* SS3, *Journal of Bacteriology*, 193, 4303-4305.
- Liu, C., Plumb, J., Hendry, P., 2006, Rapid specific detection and quantification of bacteria and archaea involved in mineral sulfide bioleaching using real-time PCR, *Biotechnology and Bioengineering*, 94, 330–336.
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H., Forney, L.J., 1997, Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA, *Applied Environmental Microbiology*, 63, 4516–4522.
- Ludwig, W., Klenk, H.P., 2001, Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework. for prokaryotic systematics. In: *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Edited by D. R. Boone, G. Garrity and R. W. Castenholz. New York: Springer-Verlag.
- Lukow, T., Dunfield, P.F., Liesack, W., 2000, Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants, *FEMS Microbiology Ecology*, 32, 241– 247.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Macalady, J.L., Jones D.S., Lyon E.H., Extremely acidic, pendulous cave wall biofilms from the Frasassi cave system, Italy, 2007, *Environmental Microbiology*, 9, 1402-1414.
- Mackintosh, M.E., 1978, Nitrogen fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *J Gen Microbiol* 105, 215–218.
- Madden, TL., Tatusov, RL., Zhang, J., 1996, Application of network BLAST server, *Methods Enzymol*, 266, 131-141.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., 2005, *Brock Biology of Microorganisms*, 11th Ed.. Pearson Prentice Hall.
- Madshus, I.H., 1988, Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells, *Biochemical Journal*, 250, 1–8.
- Malik, A., Dastidar, M.G., Roychoudhury, P.K., 2001, Biodesulphurization of coal: effect of pulse feeding and leachate recycle”, *Enzyme and microbial technology*, 28, 49.
- Mangold, S., Valdes, J., Holmes, D.S., and Dopson, M., 2011, Sulfur metabolism in the extreme acidophile *Acidithiobacillus caldus*, *Front Microbiol.*, 2, 17.
- Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., 1998, Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 64, 795–799.
- Marinov, SP., Gonsalvesh, L., Stefanova, M., Yperman, J., Carleer, R., Reggers, G., Yürüm, Y., Groudeva, V., Gadjanov, P., 2010, Combustion behaviour of some biodesulphurized coals assessed by TGA/DTA, *Thermochimica Acta*, 46-51.
- Marsh, T.L., 1999, Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products, *Current Opinion in Microbiology*, 2, 323–327.
- McFarland, B.L., Boron, D.J., Deever, W., Meyer, J.A., Johnson, A.R., Atlas, R.M., 1998, Biocatalytic sulfur removal from fuels: applicability for producing low sulfur gasoline, *Critical Reviews in Microbiology*, 24, 99–147.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Metrich N., Mandeville C.W., 2010, Sulfur in magmas, *Elements*, 6, 81-86.
- Meulenbergh, R., Pronk, J.T., Hazeu, W., Bos, P., and Kuenen, J.G. (1992) Oxidation of reduced sulfur compounds by intact cells of *Thiobacillus acidophilus*. *Arch Microbiol* 157: 161–168.
- Miller, K.M., Ming, T.J., Schulze, A.D., Withler, R.E., 1999, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE): a rapid and sensitive technique to screen nucleotide sequence variation in populations, *BioTechniques*, 27, 1016– 1030.
- Moeseneder, M.M., Arrieta, J.M., Muyzer, G., Winter, C., Herndl, G.J., 1999, Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis, *Applied Environmental Microbiology*, 65, 3518–3525.
- Mohebbi G., Ball A.S., Rasekh B., Kaytash A., 2007, Biodesulfurization potential of a newly isolated bacterium, *Gordonia alkanivorans* RIPI90A, *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 578.
- Moter, A. ve Göbel, B. U., 2000, Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms, *Journal of Microbiological Methods.*, 41, 85-112.
- Muyzer, G., de Waal, E. C., Vitterlinden, A. G., 1993, Profiling in complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA, *Applied Environmental Microbiology*, 59, 695-700.
- Muyzer, G., 1999, DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural Ecosystems, *Current Opinion in Microbiology*, 2, 317-322.
- Muyzer, G., Smalla, K., 1999, Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis in microbial ecology, *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 127– 141.
- Mutlu, M.B., Tuz gölü bakterilerinin karakterizasyonu ve mevsimsel dağılımı, Doktora tezi, Anadolu Üniversitesi, 205 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ñancuqueo, I., and Johnson, D.B., 2012, Selective removal of transition metals from acidic mine waters by novel consortia of acidophilic sulfidogenic bacteria. *Microb Biotechnol.*, 5, 34–44.
- Ni, Y., He, K., Bao, J., Yang, Y., Wan, D., Li, H., 2008. Genomic and phenotypic heterogeneity of *Acidithiobacillus* spp strains isolated from diverse habitats in China, *FEMS Microbiology Ecology*, 64, 248–259.
- Nicholson, R.S., Shain I., 1964, *Analytical Chemistry*, 36, p. 706.
- Nicolle J.L.C., Simmons S., Bathe, S., and Norris, P.R., 2009, Ferrous iron oxidation and rusticyaninin halotolerant, acidophilic “*Thiobacillus prosperus*”, *Microbiology*, 155, 1302–1309.
- Nogales, B., Moore, E. R., Abrham, W. R., Timmis, K.N., 1999, Identification of the metabolically active members of a bacterial community in a polychlorinated biphenylpolluted moorland soil, *Environmental Microbiology*, 1, 199-212.
- Norris, P.R., 1990, Acidophilic bacteria and their activity in mineral sulfide oxidation. In: *Microbial Mineral Recovery* (Ehrlich, H.L. and Brierley, C.L., Eds.), McGraw-Hill, New York, NY, pp. 3-27.
- Norris, PR., Ingledew, WJ., 1992, Acidophilic bacteria: adaptations and applications, In: Herbert RA., Sharp RJ. (ed.), *Molecular biology and Biotechnology of extremophiles*, Royal Society for Chemistry, Cambridge, UK, p. 121-131.
- Norris PR., Clark D.A., Owen J.P., Waterhouse S., 1996, Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus* sp. nov. and other moderately thermophilic mineral-sulphide-oxidizing bacteria, *Microbiology*, 142, 775-783.
- Okibe, N., Gericke, M., Hallberg, KB., Johnson, DB., 2003, Enumeration and characterization of acidophilic microorganisms isolated from a pilot plant stirred tank bioleaching operation, *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1936–1943.
- Olaueson, MM., Stokes, PM., 1989, Responses of the acidophilic alga *Euglena mutabilis* (euglenophyceae) to carbon enrichment at pH 3, *Journal of Phycology*, 25,3, 529–539.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Pace, N. R., 1986, Annual Review of Microbiology, 40, 337-365.
- Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K., 1989, A rapid and sensitive detection of point mutations and genetic polymorphisms using polymerase chain reaction, Genomics, 5, 874– 879.
- Orphan, VJ, Taylor, LT, Hafenbradl, D, DeLong, EF., 2000, Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs, Applied Environmental Microbiology, 66, 700–711.
- Osborn, A.M., Moore, E.R.B., Timmis, K.N., 2000, An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphisms (TRFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics, Environmental Microbiology, 2, 39– 50.
- Ovreas, L., 2003, Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments, Ecology Letters, 3, 236-240.
- Pace, N.R., 1999, Microbial ecology and diversity, ASM News, 65, 328– 333.
- Palmer, M.R., Helvacı, C., Fallick, A.E., 2004, Sulphur, sulphate oxygen and strontium isotope composition of Cenozoic Turkish evaporates, Chemical Geology, 209, 341-356.
- Patrick, M.E., Ollson, J.B., Thacker, R.W., 2011, Phylogenetic Diversity, Host-Specificity and Community Profiling of Sponge-Associated Bacteria in the Northern Gulf of Mexico, 6, 1-16.
- Peeples, T.L., Kelly, R.M., 1993, Bioenergetics of the metal/sulfur-oxidizing extreme thermoacidophile, Metallosphaera sedula, Fuel, 72, 1619.
- Pietrzak R., Wachowska, H., 2004, Thermal analysis of oxidised coals, Thermochim. Acta 419, 247-251.
- Pietsch, W., 1995, Classification problems of European Littorelletea, Annali Di Botanica, Vol 53, 59-64.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Prieto-Ballesteros, O., Martínez-Frías, J., Schutt, J., Sutter, B., Heldmann, J.L., Bell, M.S., Battler, M., Cannon, H., Gómez-Elvira, J., Stoker, C.R., 2008, The subsurface geology of Río Tinto: Material examined during a simulated Mars Drilling Mission for the Mars Astrobiology Research and Technology Experiment (MARTE), *Astrobiology*, 8, 1013-1021.
- Pronk, J.T., Meesters J.W., van Dijken, J.P., Kuenen, J.G., 1990, Heterotrophic growth of *Thiobacillus acidophilus* in batch and chemostat cultures, *Archives of Microbiology*, 153, 392-398.
- Quatrini, R., Appia-Ayme, C., Denis, Y., Jedlicki, E., Holmes, D., and Bonnefoy, V., 2009, Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *BMC Genomics*, 10, 394.
- Rademaker, J.L.W., de Bruijn, F.J., 1997, Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. In: Caetano-Anoll'es, G., Gresshoff, P.M. (Eds.), *DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews*. John Wiley & Sons, New York, pp. 151–171.
- Ram, R.J., VerBerkmoes, N.C., Thelen, M.P., Tyson, G.W., Baker, B.J., Blake II, R.C., Shah, M., Hettich, R.L., Banfield, J.F., 2005, Community proteomics of a natural microbial biofilm, *Science*, 308, 1915–1920.
- Rawlings, D. E. and Johnson, D. B., 2002, Ecology and biodiversity of extremely acidophilic microorganisms. In: *Extremophiles* (Gerday, C. ed.). In: *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*, developed under the auspices of the UNESCO. EOLSS Publishers, Oxford, U.K.
- Rawlings, D.E., Johnson, D.B., 2007, The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia, *Microbiology*, 153, 315–324.
- Reysenbach, A., Liu, L.Y., Banta, A.B., Beveridge, T. J., Kirshtein, J.D., Schouten, S., Tivey, M.K., Von Damm K., Voytek, M. A., 2006, Isolation of a ubiquitous obligate thermoacidophilic archaeon from deep-sea hydrothermal vents, *Nature*, 442, 444-447.
- Rohwerder, T., Sand, W., 2007, Oxidation of inorganic sulfur compounds in acidophilic prokaryotes. *Eng Life Sci*, 7, 301–309.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rooke, J.C., Vandoorne, B., Léonard, A., Meunier, C.F., Cambier, P., Sarmiento, H., Descy, J., Su, B., 2011, Prolonging the lifetime and activity of silica immobilised *Cyanidium caldarium*, *Journal of Colloid and Interface Science*, 356, 159–164.
- Rzhepishevskaya, O.I., Valdés, J., Marcinkeviciene, L., Algora Gallardo, C., Meskys, R., Bonnefoy, V., et al., 2007, Regulation of a novel *Acidithiobacillus caldus* gene cluster involved in reduced inorganic sulfur compound metabolism. *Appl Environ Microbiol.*, 73, 7367–7372.
- Säaf, S., Sundkvist, J.E., and Dopson, M., 2009, Psychrotrophic, mesophilic, and moderate thermophilic removal of reduced inorganic sulfur compounds from process waters. In: *Securing the Future*. Skellefteå, Sweden.
- Schippers, A., and Sand, W., 1999, Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Appl Environ Microbiol.*, 65, 319–321.
- Sahinkaya, E, Gungor, M, 2010, Comparison of sulfidogenic up-flow and down-flow fluidized-bed reactors for the biotreatment of acidic metal-containing wastewater, *Bioresource Technology*, 101, 9508-9514.
- Sahinkaya, E, Yucesoy, Z, 2010, Biotreatment of acidic zinc- and copper-containing wastewater using ethanol-fed sulfidogenic anaerobic baffled reactor, *Bioprocess Biosystem Engineering*, 33, 989-997.
- Sahinkaya, E, Gunes, FM, Ucar, D, Kaksonen, AH., 2011, Sulfidogenic fluidized bed treatment of real acid mine drainage water, *Bioresource Technology*, 102, 683-689.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. ve Maniatis, T., 1989, *Molecular cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, ColdSpring Harbor, New York.
- Sarradin, P., Le Bris, N., Le Gall, C., Rodier, P., 2005, Fe analysis by the ferrozine method: Adaptation to FIA towards in situ analysis in hydrothermal environment, *Talanta*, 66, 1131-1138.
- Satyanarayana, T., Chandralata, R., Shivaji, S., 2005, Extremophilic microbes: Diversity an perspectives, *Current Science*, 89, 78-90.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Schippers, A., Jozsa, P.G., Sand, W., 1996, Sulfur chemistry in bacterial leaching of pyrite, *Applied Environmental Microbiology*, 62, 3424-3431.
- Schrenk, M.O., Edwards, K.J., Goodman, R.M., Hamers, R.J., Banfield, J.F., 1998, Distribution of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*: implications for generation of acid mine drainage, *Science*, 279, 1519-1521.
- Seegerer, A., Neuner, A., Kristjansson J.K., Stetter K.O., 1986, *Acidianus infernus* gen.nov., and *Acidianus brierleyi* comb. Nov.: Facultatively aerobic, extremely acidophilic thermophilic sulfur-metabolizing archaeobacteria, *International Journal of systematic Bacteriology*, 36, 559-564.
- Seegerer, A., Trincone, A., Gahrtz, M., Stetter, KO., 1991, *Stygiolobus azoricus* gen. nov., sp. nov. Represents a Novel Genus of Anaerobic, Extremely Thermoacidophilic Archaeobacteria of the Order Sulfolobales, *International Journal of Systematic and Evolutinary Microbiology*, 41, 4 495-501.
- Selenska-Pobell, S., Kampf, G., Flemming, K., Radeva, G., Satchanska, G., 2001, Bacterial diversity in soil samples from two uranium waste piles as determined by rep-APD, RISA and 16S rDNA retrieval, *Antonie van Leeuwenhoek*, 79, 149-161.
- Sen, A.M., Johnson, D.B., 1999, Acidophilic sulphate-reducing bacteria: candidates for bioremediation of acid mine drainage, In: R. Amils and A. Ballester (ed.), *Biohydrometallurgy and the Environment toward the Mining of the 21st century*, vol.9A, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 709-718 p.
- Silver, M., and Dinardo, O., 1981, Factors affecting oxidation of thiosalts by *Thiobacilli*, *Appl Environ Microbiol.*, 41, 1301-1309.
- Silverman, M., 1967, Mechanism of bacterial pyrite oxidation, *Journal of Bacteriology*, 94, 4, 1046.
- Simşek, C., Gündüz, O., Elçi, A., 2012, Terkedilmiş Balya (Balıkesir) Pb-Zn Maden Atıklarının Ağır Metal ve Doğal Radyoaktivite İçeriği ve Çevre Kalitesi Açısından Değerlendirilmesi, *Journal of Engineering Science and Design*, 2, 1, 43-55.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Slonczewski, J.L., Fujisawa, M., Dopson, M., Krulwich, T.A., 2009, Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in bacteria and archaea. *Adv. Microb. Physiol.*, 55, 1–79.
- Stoker, C.R., Cannon, H.N., Dunagan, S.E., Lemke, L.G., Glass, B.J., Miller, D., Gomez-Elvira, J., Davis, K., Zavaleta, J., Winterholler, A., Roman, M., Rodriguez-Manfredi, J.A., Bonaccorsi, R., Bell, M.S., Brown, A., Battler, M., Chen, B., Cooper, G., Davidson, M., Fernández-Remolar, D., Gonzales-Pastor, E., Heldmann, J.L., Martínez-Frías, J., Parro, V., Prieto-Ballesteros, O., Sutter, B., Schuerger, A.C., Schutt, J., Rull, F., 2008, The 2005 MARTE robotic drilling experiment in Río Tinto, Spain: Objectives, approach, and results of a simulated mission to search for life in the Martian subsurface. *Astrobiology*, 8, 921-945.
- Stum, W., Morgan, J.J., 1981, *Aquatic chemistry*, John Wiley, New York.
- Şahin, Y., 2000, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, 175 s.
- Şanyılmaz M., 2006, Deney tasarımı ve kalite geliştirme faaliyetlerinde Taguchi yöntemi ile bir uygulama, Yüksek Lisans tezi, Dumlupınar Üniversitesi, 150 s.
- Şimşek, C., Gündüz, O., Elçi, A., 2012, Terkedilmiş Balya (Balıkesir) Pb-Zn Maden Atıklarının ağır metal ve doğal radyoaktivite içeriği ve çevre kalitesi açısından değerlendirilmesi, *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*, 2, 1, 43-55.
- Taguchi, G., Wu Y., 1989, *Taguchi methods case studies from the US and Europe*, American supplier Institute Inc., Michigan.
- Taguchi, G., 2005, Chowdhury S., Wu Y., *Taguchi's quality engineering handbook*, John Willey & sons inc. New Jersey.
- Tamzok, N., 2007, Küreselleşme, serbestleşme ve kömür endüstrisi, *Temiz Kömür Teknolojileri ve Yakma Teknikleri Semineri Bildiriler Kitabı*.
- Tan, G., Shu, W., Zhou, W., Li, X., Lan, C., Huang, L., 2009, Seasonal and spatial variations in microbial community structure and diversity in the acid stream draining across an ongoing surface mining site, *FEMS Microbiology Ecology*, 70, 277–285.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tiedje, J.M., Asuming-Brempong, S., Nusslein, K., Marsh, T.L., Flynn, S.J., 1999, Opening the black box of soil microbial diversity, *Applied Soil Ecology*, 13, 109–122.
- Tuovinen, O.H., Kelley, B.C., and Nicholas, D.J., 1975, The uptake and assimilation of sulphate by *Thiobacillus ferrooxidans*, *Arch Microbiol.*, 105, 123–127.
- Türkiye Elektrik İletim A.Ş. (TEİAŞ), 2007, Türkiye Elektrik İstatistikleri, <http://www.teias.gov.tr>, Erişim tarihi: Ekim 2010.
- Türkiye Elektrik İletimi Sektör Raporu, 2009, www.enerji.gov.tr/yayinlar_raporlar/Sektor_Raporu_TEIAS_2009.pdf, Erişim tarihi: 20.02.2011.
- Tyson, G.W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E.E., Ram, R.J., Richardson, P.M., Solovyev, V.V., Rubin, E.M., Rokhsar, D.S., Banfield, J.F., 2004, Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment, *Nature*, 428, 37–43.
- Tyson, G.W., Lo, I., Baker, B.J., Allen, E.E., Hugenholtz, P., Banfield, J.F., 2005, Genome-directed isolation of the key nitrogen fixer *Leptospirillum ferrodiazotrophum* sp nov. from an acidophilic microbial community, *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 6319–6324.
- Urakami, T., Tamaoka, J., Suzuki, KI., Komagata, K., 1989, *Acidomonas* gen. nov., incorporating *Acetobacter methanolicus* as *Acidomonas methanolica* comb. Nov, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39, 50-55.
- Vairavamurthy, A., Manowitz, B., Luther, G.W., Jeon, Y., 1993, Oxidation state of sulfur in thiosulfate and implications for anaerobic energy metabolism. *Geochim Cosmochim Acta*, 57, 1619–1623.
- Valdes, J., Veloso, F., Jedlicki, E., and Holmes, D., 2003, Metabolic reconstruction of sulfur assimilation in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans* based on genome analysis. *BMC Genomics*, 4.
- Valdes, J., Pedroso, I., Quatrini, R., Dodson, R.J., Tettelin, H., Blake, R., et al., 2008 *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications, *BMC Genomics*, 9, 597.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Valdes, J., Quatrini, R., Hallberg, K., Dopson, M., Valenzuela, P.D., and Holmes, D.S., 2009, Draft genome sequence of the extremely acidophilic bacterium *Acidithiobacillus caldus* ATCC 51756 reveals metabolic versatility in the genus *Acidithiobacillus*. *J Bacteriol.*, 191, 5877–5878.
- Vazquez-Duhalt, R., Torres, E., Valderrama, B., Le Borgne, S., 2002, Will biochemical catalysis impact the petroleum refining industry?, *Energy Fuels*, 16, 1239–1250.
- Veith, A., Urich, T., Seyfarth, K., Protze, J., Frazao, C., and Kletzin, A., 2011, Substrate pathways and mechanisms of inhibition in the sulfur oxygenase reductase of *Acidianus ambivalens*. *Front Microbiol.*, 2, 37.
- Viollier, E. et al., 2000, The ferrozine method revisited: Fe(II).Fe(III) determination in natural waters, *Applied Geochemistry*, 15, pp 785-790.
- Vlasceanu L, Sarbu SM, Engel AS, Kinkle BK. (2000), Acidic cave wall biofilms located in the Frasassi Gorge, Italy. *Geomicrobiol J* 17: 125–139.
- Waksman, S.A., and Joffe, J.S., 1922, Microorganisms concerned in the oxidation of sulfur in the soil. II. *Thiobacillus thiooxidans*, a new sulfur-oxidizing organism. *J Bacteriol*, 7, 239–256.
- Wei, CH., Wang, WX., Deng, ZY., Wu, CF., Characteristics of high-sulfate wastewater treatment by two-phase anaerobic digestion process with Jet-loop anaerobic fluidized bed, *Journal of Environmental Sciences (China)*, 2007, 19, 264-70.
- White, A., Davies, M.R., Jones, S.D., Reactivity and characterization of coal maceral concentrates, 1989, *Fuel* 68, 511-519.
- Wilmes, P., Bond, P.L., 2006, Metaproteomics: studying functional gene expression in microbial ecosystems, *Trends in Microbiology*, 14, 92–97.
- Woese, C.R., 1998, The universal ancestor, *PNAS*, 95, 6854-6859.
- World Coal Institute (WCI), 2005, *The Coal Resource - A Comprehensive Overview Of Coal*, London

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Xia, J., Peng, A., He, H., Yang, Y., Liu, X., Qui, G., 2007, A new strain *Acidithiobacillus albertensis* BY-05 for bioleaching of metal sulfides ores, *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 17, 168-175.
- Yahya, Hallberg, K.B., Johnson, D.B., 2008, Iron and carbon metabolism by a mineral-oxidizing *Alicyclobacillus*-like bacterium, *Archives of Microbiology*, 189, 305-12.
- Yenilmez, F., Kuter, N., Emil, MK., Aksoy, A., 2011, Evaluation of pollution levels at an abandoned coal mine site in Turkey with the aid of GIS, *International Journal of Coal geology*, 86, 12-19.
- Yin, H., Cao, L., Qui, G., Wang, D., Kellogg, L., Zhou, J., Dai, Z., Liu, X., 2007, Development and evaluation of 50-mer oligonucleotide arrays for detecting microbial populations in acid mine drainages and bioleaching systems, *Journal of Microbiological Methods*, 70, 165–178.
- Yücel M.A., Yücel D.Ş., Baba A., Çan (Çanakkale) ilçesindeki kömür madenciliği faaliyetlerinin alansal bazda değişiminin coğrafi bilgi sistemi (CBS) ortamında uydu görüntüleri ile belirlenmesi, 65.Türkiye Jeoloji Kurultayı, 2-6 Nisan/April 2012.
- Zammit, C.M., Mutch, L.A., Watling, H.R., Watkin, E.L.J., 2008, Evaluation of quantitative real-time polymerase chain reaction for enumeration of biomining microorganisms in culture, *Hydrometallurgy*, 94, 185–189.
- Zhang, T., Fang, H., 2006, Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70, 281–289.
- Zheng, C., Zhang, Y., Liu, Y., Wu, A., Xia, L., Zeng, J., et al., 2009, Characterization and reconstitute of a [Fe₄S₄] adenosine 5'-phosphosulfate reductase from *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Curr Microbiol*, 58, 586–592.

ÖZGEÇMİŞ

Pınar Aytar 14.12.1982 tarihinde Balıkesir’de doğdu. Balıkesir Atatürk Sağlık Meslek Lisesi’ni bitirdikten sonra Balıkesir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nden birincilikle 2005 yılında mezun oldu. 2007 yılında Balıkesir Üniversitesi Biyoloji Bilim Dalı - Genel Biyoloji Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans programını bitirdi. 2012 yılında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Genel Biyoloji Ana Bilim Dalı’nda Doktora Programını tamamlayarak doktor unvanı aldı. Yüksek Lisans ve Doktora Eğitimi süresince TÜBİTAK-BİDEB’ten yurt içi burs programlarından faydalanmıştır. Doktora sürecinde İngiltere’de Bangor University’de, Bangor Asidofil Araştırma Ekibi ile birlikte akademik çalışmaların bir kısmını yürütmüştür. Temel ilgi alanları, mikrobiyal çeşitlilik, çevresel biyoteknoloji ve endüstriyel biyoteknolojidir.