

Maden Yataklarında Bulunan Bazı Bakterilerin Ağır Metallerin Biyoremidasyonunda Kullanılabilir Potansiyellerinin Belirlenmesi

Tuğba ÖZBUCAK^{1*}, Ömer ERTÜRK¹, Öznur ERGEN AKÇİN¹, Gülaycan POLAT¹, Selahattin ÖZBUCAK²

¹ Ordu Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Ordu
² Dr. Hilmi Güler Bilim Sanat Merkezi, Ordu

(Geliş Tarihi/Recived Date: 17.04.2018; Kabul Tarihi/Accepted Date: 25.05.2018)

Öz

Bu çalışmada Ordu ili sınırları içinde bulunan Cu(bakır)-Pb(kurşun)- Zn(çinko) maden yatağına ait topraklardan izole edilen bazı bakterilerin ağır metallerin biyoremidasyonunda kullanılabilir potansiyelleri araştırılmıştır. Ordu ili içerisindeki maden ocağı yakınından steril şekilde alınan topraktan hazırlanan kültür ortamlarından yedi farklı bakteri izolatu elde edilmiştir. Bu bakteriler mikrobiyolojik teknikler ile saf kültür haline getirilerek, ışık mikroskopunda görüntülenmiştir. Biyokimyasal özellikleri ise Vitek 2 yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışmamızda tespit edilen 7 çeşit bakteriden ağır metal absorbe edebilen *Pseudomonas luteola*, *Paenibacillus polymyxa* ve *Pseudomonas stutzeri* türleri kültür yapılarak çoğaltılmıştır. Elde edilen bakteri izolatlarının gerek bireysel gerekse sinerjik etkisini belirlemek için steril hale getirilen topraklara bu üç bakterinin tekli ve ikili kombinasyonları inkübe edilmiştir. Bu etkileşim (1 tanesi kontrol, 6 toprak örneği) topraktaki Cu(bakır)-Pb(kurşun)-Zn(çinko) ağır metalleri ile organik madde ve Ph değişimi açısından değerlendirilmiştir. Kontrol toprağındaki sonuçlara göre maden yatağı topraklarında en fazla miktarda kurşun daha sonra çinko, en az miktarda ise bakır elementinin bulunduğu tespit edilmiştir. Deneme topraklarında ise ortama ilave edilen bakteri ve bakterilere göre ağır metallerde, organik madde ve pH'da kontrole göre bazı değerlerin arttığı bazı değerlerinde düştüğü tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ağır metal, Biyoremidasyon, *Paenibacillus polymyxa*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas stutzeri*

Determination of Possible Use in the Bioremediation of Heavy Metal of Some Bacteria Found in Mine

Abstract

The aim of this study is to determine the possible use of some bacteria isolated from Cu(copper)-Pb (lead)-Zn(zinc) mine soils found in Ordu province in the bioremediation of heavy metal. For this purpose, 7 kinds of bacteria isolates were obtained in pure cultures fields taken from mine soil. These bacteria were purified by microbiological techniques and observed by a light microscopy. The biochemical properties were determined by Vitek 2 method. From among 7 kinds bacteria determined in our study, *Pseudomonas luteola*, *Paenibacillus polymyxa* and *Pseudomonas stutzeri* species, which can absorb heavy metals, were grown by culture. Single and double combinations of those three bacterial strains were incubated in the sterilized soil to determine both the individual effect and the synergistic effect of the obtained bacterial isolates. This interaction (1 in control, 6 soil samples) has been evaluated in terms of Cu (copper) -Pb (lead) -Zn (zinc) heavy metals and organic matter in the soil and Ph exchange. According to the results of the control soil, the maximum amount of lead in the mineral bed soil and zinc respectively and the copper element as the least amount were detected. In the experimental soil, some values of organic matter in heavy metals were found to fall in some values in comparison with the bacteria added to the medium and some values relative to the control in pH were found to fall in some of the excess values.

Keywords: Bioremidation, Heavy metal, *Paenibacillus polymyxa*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas stutzeri*

*Sorumlu Yazar / Corresponding Author: tsiozbucak@hotmail.com

Giriş

Ağır metaller, yoğunlukları 5 g/cm³'den büyük olan elementlerin oluşturduğu yok edilemeyen bileşiklerdir. Bu kategoriye giren yaklaşık 40 kadar element bulunmaktadır (Alcorlo et al., 2006). Bakır (Cu), Çinko (Zn), Kadmiyum (Cd), Kurşun(Pb), Civa (Hg) ve Nikel (Ni) bu sözü edilen ağır metallerden bazılarıdır. Ağır metaller, toprak, su ve canlı organizmada birikme özelliğinden dolayı ağır metal kirliliğine sebep olabilmektedir. Ancak bu metotlar farklı metaller için farklı verimlilikler sunabilmekte ve çok pahalıya mal olabilmektedir (Miretzky ve ark., 2004; Hou ve ark., 2007; Üçüncü, 2011). Bundan dolayı bu metallerin uzaklaştırılmasında alternatif yöntemler kullanılmaya başlanmıştır. "Biyoremediasyon (Biyolojik İyileştirme)" bunlardan birisi olup 1980'li yılların başında bilim insanları tarafından ortaya atılmış bir terimdir. Bu yöntem etkili, ucuz ve çevre dostu bir yöntem olması ile diğerlerinden ayrılır (Malik, 2004). Biyoremediasyonda rol oynayan mikroorganizmalar funguslar, mayalar ve bakterilerdir (Frazar, 2000; Strong, 2008). Bu yol, doğal biyolojik aktiviteyi kullanarak zararsız çeşitli kirliticileri yok etme imkânı sunan bir seçenektir (Sharma, 2012). Aynı zamanda biyoremediasyon kirlenen ortamı yönetmek ve kirlenmiş toprakları kurtarmak için etkili bir yönetim aracıdır. Biyoremediasyonun başarılı olması, biyolojik iyileştirme yöntemlerinin doğru mikroorganizmalar ve doğru çevresel faktörlerle doğru yerde olmasına bağlıdır (Boopathy, 2000; Ceyhan ve Esmeray, 2012).

Akıncı ve ark. (2016)'na göre Türkiye'de çeşitli bilim dallarında (peyzaj, orman, ziraat, toprak, biyoloji, tıp, maden vb.) ağır metallerin çevresel etkileri üzerine birçok yayın ve araştırma yapılmıştır (Baş ve Demet, 1992; Okcu ve ark., 2009; Özay ve Mammadov, 2013, Kocaer ve Başkaya, 2003; Hamutoğlu ve ark., 2012; Aybar ve ark., 2015; Yurdakul, 2015). Dünya genelinde Evanko ve Dzombak, 1997, Garbisu ve Alkorta 2003, Usman ve ark., 2006; Marques ve ark., 2009, Damodaran ve ark., 2011, Montinaro ve ark., 2012 gibi çeşitli bilim insanlarının ağır metalli toprakların iyileştirilmesi konulu çalışmaları vardır.

Orta Karadeniz Bölgesinde bulunan Ordu İli, jeolojik konumundan dolayı maden yataklarınca zengin bir kuşak içerisinde yer almaktadır. MTA (Maden Teknik Arama), maden yatakları açısından zengin olan ilde volkanik kayaların yaygın olduğunu bildirilmektedir. Özellikle demir, bakır, kurşun, çinko, altın, gümüş ve manganez maden yatakları dikkat çekicidir. Bu özellikleriyle Ordu İli maden arayıcılar için önemli bir yer olmuştur (Anonim, 2011). Ayrıca bölgede gerek özel şirketler gerekse MTA genel müdürlüğü tarafından yapılan çeşitli araştırmaların bulunduğu bildirilmektedir. Bu çalışmanın amacı Ordu ilinin maden yataklarının bulunduğu topraklardaki bakterileri belirleyerek bu bakterilerin ağır metallerin biyoremediasyonunda kullanılabilir potansiyellerini belirlemektir.

Materyal ve Yöntem

Çalışmamızda öncelikli olarak maden yataklarınca zengin bölgeler belirlenmeye çalışılmıştır. Ordu İli çevre durum raporuna göre, ilin farklı bölgelerinde bakır, kurşun, çinko, demir, mangan ve altın maden yatakları bulunmaktadır. Bu yataklar ilin Ünye, Fatsa, Ulubey, Kabadüz, Korgan, Mesudiye, Çambaşı gibi farklı ilçelerinde yayılmış göstermektedir. Bu maden yataklarından Kabadüz ilçesinde bulunan Pb-Zn-Cu maden yatağı işletilmektedir (Anonim, 2011). Bu nedenle çalışmamız maden işletmesinin bulunduğu Kabadüz ilçesinde gerçekleştirilmiştir.

Toprak Örneklerinin Alınması

2016-2017 tarihleri arasında Ordu İli Kabadüz ilçesinde maden yataklarının işletildiği araziden 10 farklı toprak örneği alınmıştır. Toprak örnekleri alınmadan önce steril bir spatula ile yüzey materyalleri süpürülmüş ve yüzeyden 2-5 cm arası derinlikten alınan yaklaşık 1 kg. toprak örneği steril kaplara konularak laboratuvara getirilmiştir. Bu örneklerin bir kısmı analiz için toprak analizleri için kullanılmıştır. Bir kısmı ise 4°C’de bakterilerin izolasyonu için saklanmıştır.

Saf Kültürlerin Hazırlanması

Alınan toprak örnekleri çeşitli ön işlemlerden geçirilerek nutrient agarlı besiyerlerine ekilerek 28-30°C’de 3-4 gün inkübasyona bırakılmıştır (Bülbüloğlu, 2000). İnkübasyon sonunda besiyeri üzerinde oluşan koloniler tek tek tespit edilmiştir. Bunlar arasında koloni morfolojisine ve rengine göre birbirinden farklı olanlar belirlenip bu koloniler alınarak çizgi ekim yöntemiyle besiyerine ekilerek saf kültürler hazırlanmıştır.

Bakteriyel İzolatların Belirlenmesi ve Görüntülenmesi

Birbirlerinden morfolojik olarak farklı olan bu izolatlar basit boyama, gram boyama ve endospor boyama yapılarak incelenmiştir (Benson, 1985). Araştırma alanımızda bulunan topraklarda tespit edilen bu bakteriler ışık mikroskopunda görüntülenmişlerdir. Bakteriyel izolatların biyokimyasal özellikleri ise Vitek 2 sistemiyle belirlenmiştir (Verweij ve ark., 1999; Pincus, 2002). Çalışmamızda tespit edilen bu bakterilerden ağır metal absorbe edebilen ve biyoremidasyon potansiyeli olan *P. luteola*, *P. polymyxa* ve

P. stutzeri türleri kültür yapılarak çoğaltılmıştır. Arazi çalışması sırasında alınan toprakların bir kısmı steril hale getirildikten sonra birisi kontrol olmak üzere 7 farklı kaba eşit bir şekilde bölünmüştür. Aşağıda belirtilen düzende 3 bakteri üç ayrı kaba (2,3,4 numaralı topraklar), bakterilerin kombinasyonlarını da diğer üç kaba (5,6,7 numaralı topraklar) konulmuştur. 1 numaralı toprak kontrol toprağı olarak belirlenmiştir (Şekil 1).

	<i>P. luteola</i>	<i>P. polymyxa</i>	<i>P. stutzeri</i>
1. Toprak-Kontrol			
2. Toprak	+		
3. Toprak		+	
4. Toprak			+
5. Toprak	+	+	
6. Toprak		+	+
7. Toprak	+		+

Şekil 1. Topraklara ilave edilen bakteri kombinasyonları

Bakterilerin mikrobiyal faaliyetlerini gerçekleştirebilmeleri için numuneler 1 ay 20 °C

civarında iklim dolabında, 2 ay kadar oda sıcaklığında bırakılarak belirli aralıklarla sulanmıştır. Bu süre sonunda toprak numuneleri alınarak Bakır (Cu), Çinko (Zn) ve Kurşun (Pb), Organik madde ve pH tayini için analize gönderilmiştir.

Bulgular

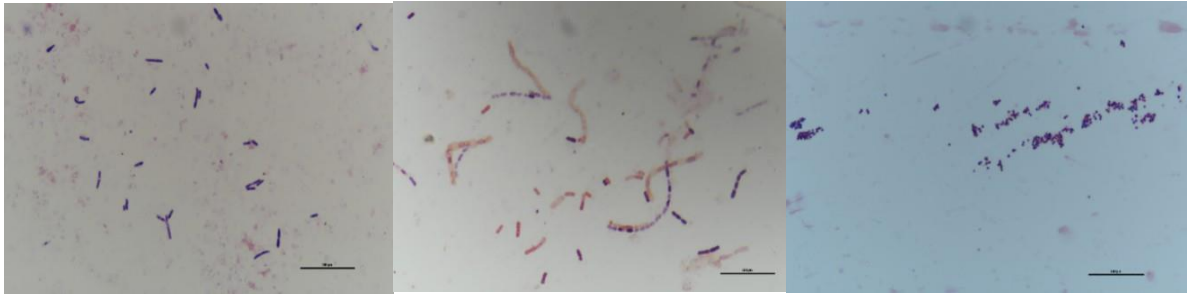
Toprak Örneklerinden İzole Edilen Bakteriler ve Genel Özellikleri

Araştırma alanımızda bulunan topraklarda belirlenen bakterilerden çalışmamızda kullanılan bakterilerin genel özellikleri ve ışık mikroskobu görüntüleri aşağıda verilmiştir.

1-*Pseudomonas luteola* Kodoma ve ark., 1985 (Pseudomonaceae), *P. luteola*, özellikle maden kuyu ve yataklarında bulunabilen fırsatçı, gram negatif, aerob bir bakteridir. *Pseudomonas luteola* endüstriyel atık sularda bulunabilen Cr (krom) ve Al (alüminyum) gibi ağır metalleri absorbe edebilmektedir (Şekil 2-a).

2-*Paenibacillus polymyxa* (Prazmowski 1880) Mace 1889 (Paenibacillaceae), *P. polymyxa*, *Bacillus polymyxa* olarak da bilinen, bitki kökleri, toprak ve deniz diplerinde bulunan, azot tespit edebilen bir bakteridir. Bitki köklerinde bulunan bu bakterilerin oluşturduğu biyofilm bitkiyi patojenlerden korumaktadır. Bakteri aynı zamanda biyoremediasyonda kullanılabilme potansiyeline sahiptir (Şekil 2-b).

3-*Pseudomonas stutzeri* (Lehman ve Neumann 1896) Sijderius 1946 (Pseudomonadaceae), *Pseudomonas stutzeri* gram-negatif bir toprak bakterisidir. Bakteri karbon tetra kloridi indirgeyebildiği için biyoremediasyon çalışmaları için kullanılabilir (Şekil 2-c).



a)

b)

c)

Şekil 2. a) *P. luteola*, b) *P. polymyxa*, c) *P. Stutzeri* türlerinin ışık mikroskobu görüntüleri

Toprak Analiz Sonuçları

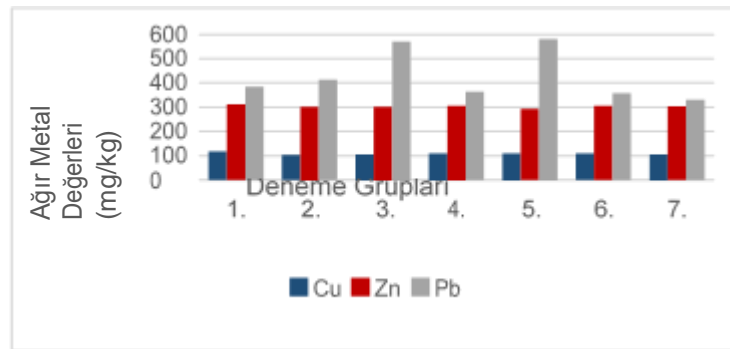
Çizelge 1'de toprak kirliliği kontrol yönetmeliğine (Anonim, 2005) göre verilen sınır değerleri ile mevcut çalışmanın sonuçları verilmiştir. Yapılan toprak analizleri sonucunda

toprağın Kumlu-Tınlı bünyesinde olduğu belirlenmiştir. 1-7 numaralı toprak örneklerine ait yapılan analiz sonuçları ise Şekil 2’de verilmiştir.

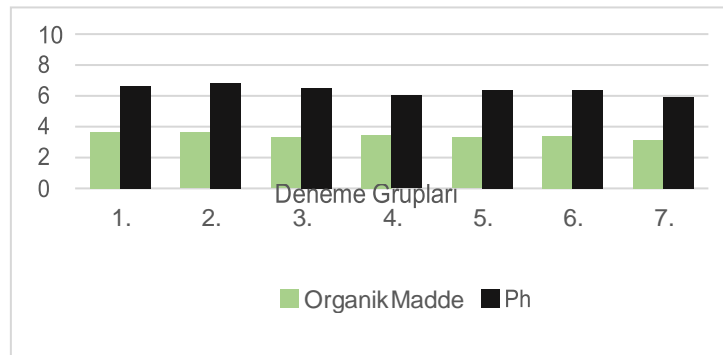
Çizelge 1. Toprak Kirlilik Yönetmeliğine Göre Topraktaki Ağır Metal Sınır Değerleri

Ağır Metal (Toplam)	$6 \leq \text{pH} < 7$ mg. kg-1 Fırın Kuru Toprak	$\text{pH} \geq 7$ mg. kg-1 Fırın Kuru Toprak	Mevcut çalışmanın sonuçları (Kontrol toprağında)
Kurşun (Pb)	70	100	385 mg/kg
Bakır (Cu)	50	100	118.5 mg/kg
Çinko (Zn)	150	200	313.5 mg/kg

Kontrol toprağındaki sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde maden yatağı topraklarında en fazla miktarda kurşun daha sonra çinko, en az miktarda ise bakır elementinin bulunduğu görülmektedir. Diğer topraklarda ise ortamda bulunan bakteri ve/veya bakterilerin ilavesi ile çalışılan ağır metallerde, organik madde ve pH’da kontrole göre azalış veya artışlar tespit edilmiştir. Şekil 3’de bulunan topraktaki bakır (Cu) analizi sonuçlarına bakıldığında bütün gruplarda (2-7 numaralı topraklar) kontrole göre bakır miktarının düştüğü görülmektedir. En fazla düşüş %13.75’lik bir azalma ile *P. luteola* (2 numaralı toprak) ilave edilmiş toprakta görülmüştür. En az düşüş ise % 6.12 ile *P. luteola* ve *P. polymyxa* ilave edilmiş (5 numaralı) toprakta görülmüştür.



Şekil 3. Kontrol ve Deneme topraklarında bulunan Cu, Zn, Pb analiz sonuçları



Şekil 4. Kontrol ve Deneme topraklarında bulunan Organik madde ve Ph sonuçları

Çinko (Zn) analiz sonucunda ise bütün deneme gruplarında çinko miktarında azalma görülmüştür. En fazla azalma % 6.16 ile *P. luteola* ve *P. polymyxa* ilave edilmiş (5 numaralı) toprakta belirlenmiştir. En az düşüş ise %2.04 ile *P. stutzeri* ilave edilmiş (4 numaralı) toprakta tespit edilmiştir. Çalışılan topraklarda bulunan kurşun (Pb) miktarları karşılaştırıldığında 2,3 ve 5 numaralı topraklarda artış, 4, 6 ve 7 numaralı topraklardaki kurşun miktarlarında ise azalış tespit edilmiştir (Şekil 3). Organik madde sonuçlarına bakıldığında kontrol dâhil bütün gruplarda toprakların organik madde bakımından iyi olduğu, kontrole göre en fazla azalışın ise 7 numaralı toprakta olduğu görülmektedir. pH açısından değerlendirildiğinde de kontrol toprağı ve 2 numaralı toprağın nötr, diğerlerinin hafif asidik özellikte olduğu tespit edilmiştir. pH miktarındaki artış ve azalışlar organik madde sonuçları ile benzerlik göstermektedir (Şekil 4).

Tartışma

Çalışmamızın sonucunda Şekil 3’de görüldüğü üzere bakır metalinin farklı bakterilerin ilave edildiği bütün topraklarda kontrole göre değişik oranlarda azalması önemli ve dikkat çekici bulunmuştur. Özellikle *P. luteola* bakterisinin olduğu ortamdaki azalış en fazla orandadır. Onu *P. polymyxa* bakterisinin bulunduğu toprak sonucu izlemektedir.

Gram negatif bir bakteri olan *Pseudomonas* ‘un özellikle bakır, kadmiyum, selenyum gibi çeşitli ağır metallerin detoksifikasyonunda önemli rol oynadığı bildirilmektedir (Sedky ve ark., 2009; Halder ve Basu, 2016; Ceve Emn, 2017). Ayrıca yapılan bazı çalışmalar bazı *Pseudomonas* bakterilerinin özellikle petrol ile kirlenmiş alanların biyoremidasyonunda kullanılabildiğini belirtmektedir (Ceyhan ve Esmeray, 2012).

Çinko analizi ile ilgili sonuçlar değerlendirildiğinde bütün toprak gruplarında kontrole göre azalma olduğu görülmektedir. Çinko için en fazla azalma *P. luteola* ve *P. polymyxa* bakterilerinin bulunduğu topraklarda tespit edilmiştir. *P. luteola*’nın bulunduğu ortamdaki çinko miktarındaki azalış dikkat çekici bulunmuştur. Bunun nedeni *P. luteola*’nın çinkoyu bakırda olduğu gibi ortamdaki uzaklaştırabilmesi olabilir. Topraklara karışan ve buralarda birikme yapan ağır metallerin, mikrobiyal aktiviteye sebep olduğu bildirilmektedir (Vanlı ve Yazgan, 2008). *P. polymyxa* biyoremidasyonda kullanılma potansiyeline sahiptir. Bu bakteri kendisini eksopolisakkarit veya ekstraselüler polimerik madde adı verilen bir bileşik ile çevreler. Bu madde onun bitki köklerine ve toprak partiküllerine tutunmasında ve biyofilm oluşturmasında önemlidir. Bu eksopolisakkarit kolay ve ucuz bir şekilde sucul ortamlardan kadmiyumun uzaklaştırılmasında kullanılabilir (Mokaddem ve ark., 2009). Bizim çalışmamızda bu bakterinin bakır ve çinkonun topraktan uzaklaştırılmasında etkili olduğu görülmüştür.

Ağır metaller ile kontamine olmuş toprakların iyileştirilmesinde kullanılan maliyeti yüksek pek çok teknoloji vardır (Yoon ve ark., 2006). Ancak günümüzde, metallerin mikrobiyolojik anlamda ekstraksiyonu için kullanılan teknikler oldukça sınırlıdır. Çeşitli fizibilite çalışmaları, kirlenmiş toprakların *Thiobacilli* tarafından biyolojik sızma denilen bir teknikte etkin bir şekilde ıslah edilebileceğini göstermiştir (Mulligan ve ark., 2001). Yapılan bir çalışmada radyoaktif elementler ve toksik ağır metallerle kirlenmiş

bir tarım toprağındaki mikroflora aktivitesi toprağın su, oksijen ve bitki besin maddesi içeriğı gibi bazı önemli çevresel faktörlerde uygun değişiklikler yapılarak artırılmıştır. Mikroflora aktivitesi sonucu çözünür hale geçen metal iyonları toprağın periyodik olarak yıkanması sonucu topraktan uzaklaştırılmış ve uygulama sonucu topraktaki ağır metal seviyeleri makul seviyelere düşürülmüştür.

Topraktaki kurşun analiz sonuçlarına bakıldığında 3 toprak grubunda azalma, 3 toprak grubunda ise artışın olduğu görülmektedir. *P. luteola* ve *P. polymyxa* bakterilerinin olduğu topraklarda hem ayrı hem de bir arada bulduklarında kurşun miktarının arttığı tespit edilmiştir. Özellikle her iki bakterinin birlikte olduğu topraktaki artış en fazladır. Kurşun miktarında azalmanın olduğu gruplar ise *P. stutzeri* ve onun kombinasyonlarının olduğu (4, 6 ve 7) topraklardır. Buradaki azalma ağır metal biriktirebilme özelliğinden dolayı *P. stutzeri* bakterisinden kaynaklanmış olabilir. Bu bakterinin karbon tetra klorit gibi zararlı maddeleri parçalayıp karbondioksite dönüştürdüğü de bildirilmektedir (Lyceyl ve ark., 1999).

Bu elementler doğaları gereğı yer kürede genellikle karbonat, oksit, silikat ve sülfür halinde stabil bileşik olarak veya silikatlar içinde hapis olarak bulunurlar. Metallerin toprakta tutunma mekanizmaları, metal iyonlarının killer, organik maddeler gibi toprak bileşenlerinin yüzeyine adsorbe olması ve oksit, karbonat, sülfid, fosfat gibi farklı metal bileşiklerinin çökmesi şeklinde iki temel kategoride sınıflandırmıştır (Kabata-Pendias ve Mukherjee, 2007). Topraktaki Pb' nin çözünürlüğü ve davranışı ortamın pH' sı, toplam Pb içeriğı, topraktaki organik maddelerin varlığı ve redoks koşulları gibi özelliklerden de etkilenmektedir. Kurşun spesifik adsorbsiyon özelliğı nedeniyle toprağı, diğer tüm metallerden daha kuvvetli bağlanmaktadır. Özellikle demir oksit, mangan oksit ve alüminyum oksitler Pb için pH artışı ile birlikte artan bağlanma kapasitesi göstermektedir (Alloway, 1995). Kurşun organik madde içeriğı fazla olan topraklarda, organik madde içeriğı az olan topraklara oranla göre daha düşük çözünürlük göstermektedir. Kurşunun organik maddelerle hareketsiz forma dönüşmesi özellikle yüksek stabiliteye sahip çözünmez metal-organik komplekslerin meydana gelmesiyle olmaktadır. Yaptığımız çalışmada özellikle 2, 3 ve 5 numaralı topraklarda kurşunun kontrol grubuna göre bir miktar artığı tespit edilmiştir. Literatürde böyle bir artışın referansının olmadığı görülmüştür. Yapılan bazı çalışmalarda yukarıda da belirtildiğı üzere kurşunun organik maddenin bulunma miktarına göre çözünürlüğünün değıştiğı tespit edilmiştir. Şekil 4' de kurşun ağır metalinin arttığı durumlarda organik madde azalışının en üst seyide olduğu görülmektedir. Bu durumun nedeni topraktaki bakterilerin organik maddeyi tüketmesi ve organik maddeye bağlı olan kararlı kurşunun serbest forma geçmesi şeklinde açıklanabilir. Bununla birlikte serbest kalan kurşunun (*P.luteola+P.polymyxa*) bakterileri tarafından adsorsiyona uğratılmadığı sonucuna varılmıştır. Yapılan analizde kurşun element formunda aranmıştır. Belki de kontrol grubunda bileşik formunda bulunan kurşun bu iki bakterinin faaliyeti ile element formuna dönüşmüş bu da sonuçların yüksek çıkmasına neden olmuş olabilir.

Toprağın doğal özellikleri, kirleticinin konsantrasyonu ve kontaminasyonunun ölçüsü, başarılı biyoremediasyon olasılığının belirlenmesinde önemlidir (Troy, 1994). Kirleticinin durumu, diğer maddelere sorpsiyonu, taşınımı ve biyolojik parçalanması, topraktaki biyolojik aktiviteyi etkiler. Bu etkiler; toprak pH'ını, iyon değıştirme kapasitesini, nutrient, tuz, ağır metal, mineral ve organik madde içeriğini değıştirebilmektedir (Dindar ve ark., 2010). Toprak organik maddesi yüksek katyon değıştirme kapasitesine sahiptir bu durum ağır metaller ile organik kimyasalların sorpsiyonunda önemli etkiler meydana getirmektedir

(Cheng ve Mulla, 1999).

Toprakların çoğu 5–9 arasında pH değerine sahiptir. Bu pH aralığı pek çok mikroorganizmanın büyümesi için uygun bir aralıktır. Bakterilerin bir çoğunun büyümesi için optimum pH 6,5-7,5 arasındadır. Bizim çalışmamızda da bakterilerin pH aralığı 5.92-6.807 arasında belirlenmiştir. En yüksek Ph değerine *P. luteola* bakterisinin ilave edildiği toprakta en düşük Ph değerine ise *P. luteola* ve *P. stutzeri* bakterilerinin ilave edildiği toprakta rastlanmıştır. Optimum pH değeri substrata göre de değişmektedir (Alexander, 1999). Ayrıca, genellikle toprakta pH ve organik maddenin yüksek olduğu zamanlarda ağır metallerin toprakta bulunuşu ve hareketi düşüktür (Jung ve Thornton, 1996; Roselli ve ark., 2003). Bu durum bizim çalışmamızın sonuçlarını desteklemektedir. Ağır metal adsorpsiyonu ile ilgili daha önceki çalışmalarda ağır metal adsorpsiyonun pH ile arttığı, düşük pH' da, metalin adsorpsiyon kapasitesinin çok düşük olduğu belirtilmiştir (Salehizadeh ve Shojaosadati, 2003; Kim ve ark., 1996). Çünkü büyük miktarda hidrojen iyonu, sorpsiyon alanlarında metal iyonlarıyla yarışmaktadır. Ağır metal alımındaki artış, kanyonlar ve polisakkaritin fonksiyonel gruplarının negatif yükleri arasındaki etkileşime bağlı olabilir (Salehizadeh ve Shojaosadati, 2003; Kim ve ark., 1996). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarda Şekil 4' de görüldüğü üzere ağır metal adsorpsiyonuna paralel olarak pH nın azaldığını göstermektedir.

Organik madde açısından toprağın iyi durumda olduğu belirlenmiştir. Organik madde toprakta yararlı fonksiyonlara sahiptir. Mikroorganizmalar için önemli bir nutrient kaynağıdır ve derinlikle organik madde içeriğinin azalması, mikrobiyal popülasyon yoğunluğunun azalmasına ve dolayısıyla toksik kimyasalların parçalanabilirliğinin de azalmasına yol açmaktadır (Mallawatantri ve ark., 1996). Organik maddenin enerji ve nutrient kaynağı olarak kullanılması biyolojik toprak koşullarını da etkilemektedir (Cheng ve Mulla, 1999).Yapılan çalışmada organik madde miktarı ortama ilave edilen bakterilere göre değişen oranda azalma göstermiştir. Bu da yukarıda belirtildiği gibi organik maddenin besin kaynağı olarak kullanılması sonucu olabilir.

Sonuç

Yapılan çalışmada kullanılan *P. luteola* ve *P. polymyxa* bakterilerinin ayrı bulduklarında özellikle bakır elementini, *P. luteola* ve *P. polymyxa* bakterilerinin bir arada buldukları ortamda ise çinko elementini uzaklaştırmada etkili oldukları belirlenmiştir. Bu iki bakterinin ayrı ve bir arada buldukları ortamlarda ise kurşun miktarının attığı tespit edilmiştir. Bu nedenle, bu çalışma bu bakteriler ile moleküler düzeyde yapılacak çalışmalar ile bunların tolerans ve biyoremidasyon potansiyellerinin aydınlatılması ve incelenmesi çalışmalarına katkı sağlayacaktır.

Kaynaklar

1. Akıncı YC, Yüksek T, Demirel Ö. 2016. Ağır metaller ile kirlenmiş toprağın iyileştirilmesinde Vetiver Grass (*Vetiveria zizanioides* (Linn.) Nash) ve solucanların kullanılması. Süleyman Demirel Üniversitesi Mimarlık Bilimleri ve Uygulamaları Dergisi Araştırma makalesi, 1(1):1-11.
2. Alcorlo P, Otero M, Crehuet M, Baltanás A, Montes C. 2006. The use of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*, Girard) as indicator of the bioavailability of heavy metals in

- environmental monitoring in the River Guadiamar (SW, Spain). Science of the Total Environment, Vol:366, pp. 380– 390.
3. Alexander M, 1999. Biodegradation and bioremediation second edition, Academic Press New York. Alloway BJ, 1995. Heavy metals in soils, Second Edition, Chapman & Hall, New York, p., 368.
 4. Anonim 2005. Toprak kirliliği kontrol yönetmeliği. EK I-A/ Topraktaki Ağır Metal Sınır Değerleri. Anonim 2011. Ordu çevre durum raporu. Ordu Valiliği, Çevre ve Şehircilik Müdürlüğü
 5. Aybar M, Bilgin A, Sağlam B. 2015. Fitoremediasyon yöntemi ile topraktaki ağır metallerin giderimi. Doğal Afetler ve Çevre Dergisi, 1(1-2): 59-65.
 6. Baş AL, Demet Ö. 1992. Çevresel toksikoloji yönünden bazı ağır metaller. Çevre Dergisi, 5: 42-46. Benson HJ, 1985. Microbiological applications, a laboratory manual in general microbiology, Brock, Fourth Edition, Wm C. Brown Publishers, Dubuque, Iowa Boopathy R, 2000. Factors limiting bioremediation technologies. Bioresource Technology, 74: 6367.8:3, 2-7.
 7. Bülbüloğlu Ö, 2000. Çeşitli toprak örneklerinden izole edilen *Bacillus thuringiensis*' lerin izolasyonu, karakterizasyonu ve insektisidal etkilerinin belirlenmesi", 2000. Yüksek Lisans Tezi, KTU Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 1-11
 8. Ce Vessels, Emn, Chirwa. 2017. Reduction of Selenium by *Pseudomonas stutzeri* Nt-I: Growth, Reduction and Kinetics. Journal of J Bioremediation & Biodegradation.
 9. Ceyhan N, Esmeray E. 2012. Petrol kirliliği ve biyoremediasyon. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 5 (1): 95-101.
 10. Cheng HH, Mulla DJ. 1999. The soil environment. In: ed. D. M. Kral et al. Bioremediation of contaminated soils. SSSA Publ. 677 S, Agronomy Monograph no. 37. SSSA, Madison, WI, pp. 1-13,
 11. Damodaran D, Suresh G, Mohan B R 2011. Bioremediation of soil by removing heavy metals using *Saccharomyces cerevisiae*. 2nd International Conference on Environmental Science and Technology, Singapore.
 12. Dindar E, Topaç Sağban, FO, Başkaya HS. 2010. Kirlenmiş toprakların biyoremediasyon ile Islahı. Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi, Cilt 15, Sayı 2.
 13. Evanko CR, Dzombak DA. 1997. Remediation of metals-contaminated soils and groundwater. technology evaluation report, E Series: TE-97-01, Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center.
 14. Frazar C, 2000. The bioremediation and phytoremediation of pesticide-contaminated sites, National Network of Environmental Studies (NNEMS).
 15. Garbisu C, Alkorta I. 2003. Basic concepts on heavy metal soil bioremediation. The European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection, 3(1): 58-66.
 16. Halder D, Basu M. 2016. Role of *Pseudomonas stutzeri* MTCC101 in cadmium bioremediation. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, 5(2): 139-148.
 17. Hassan SH, Kim SJ, Jung AY, Joo JH, Eun Oh S, Yang JE. 2009. Biosorptive capacity of Cd(II) and Cu(II) by lyophilized cells of *Pseudomonas stutzeri*. J. Gen. Appl. Microbiol. Feb;55(1):27-34.
 18. Hamutoğlu R, Dinçsoy A.B, Cansaran-Duman D, Aras S. 2012. Biyosorpsiyon,

- adsorpsiyon ve fitoremediasyon yöntemleri ve uygulamaları. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 69(4): 235-53.
19. Hou W, Chen X, Song G, Wang Q, Chang CC. 2007. Effects of copper and Cadmium on heavy metal pollutant waterbody restoration by Duckweed (*Lemna minor*). Plant Physiology and Biochemistry, Vol:45, pp.62-69.
 20. Jung MC, Thornton I. 1996. Heavy metal contamination of soils and plants in the vicinity of a lead-zinc mine, Korea. Appl Geochem, 11:53-9.
 21. Kabata-Pendias, A., Mukherjee, A.B. 2007. Trace elements from soil to human, Springer Berlin Heidelberg and Business Media, 1-519.
 22. Kim SY, Kim JH, Kim CI, Oh OK. 1996. Metal adsorption of the polysaccharide produced from *Methylobacterium organophilum* Biotechnol. Lett., 18 (1996), pp. 1161-1164.
 23. Kocaer FO, Başkaya HS. 2003. Metallerle kirlenmiş toprakların temizlenmesinde uygulanan teknolojiler. Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi, 8(1): 121-131.
 24. Lycely Del C, Sepúlveda-Torres, Narayanan Rajendran, Michael J. Dybas · Craig S. Criddle. 1999. Generation and initial characterization of *Pseudomonas stutzeri* KC mutants with impaired ability to degrade carbon tetrachloride. Arch Microbiol., 171:424-429.
 25. Malik A. 2004. Metal bioremediation through growing cells. Environment International, Vol:30, pp.261- 278.
 26. Mallawatantri AP, McConkey BG, Mulla DJ. 1996. Characterization of pesticide sorption and degradation in macropore linings and soil horizons of Thatuna Silt Loam. J. Environ. Quality 25:227-235.
 27. Marques AGC, Rangel AOSS, Castro PL (2009). Remediation of heavy metal contaminated soils: Phytoremediation as a potentially promising clean-up technology. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 39(8): 622-654.
 28. Miretzky P, Saralegui A, Cirelli AF. 2004. Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires, Argentina). Chemosphere, Vol:57, pp. 997-1005.
 29. Mokaddem H, Sadaoui Z, Boukhelata N, Azouaou N, Kaci Y. 2009. Removal of cadmium from aqueous solution by polysaccharide produced from *Paenibacillus polymyxa*. Journal of Hazardous Materials. 172(2-3): 1150- 1155.
 30. Montinaro S, Concas A, Pisu M, Cao G. 2012. Remediation of heavy metals contaminated soils by Ball milling. Chemical Engineering Transactions, 28: 187-192.
 31. Mulligan C N, Yong R N, Gibbs BF. 2001. Remediation technologies for metal contaminated soils and groundwater: an evaluation, Engineering Geology, 60, 193-207.
 32. Okcu M, Tozlu E, Kumlay AM, Pehlivan M. 2009. Ağır metallerin bitkiler üzerine etkileri. Alınları, 17(B): 14- 26.
 33. Özay C, Mammadov R. 2013. Ağır metaller ve süs bitkilerinin fitoremediasyonda kullanılabilirliği. BAÜ Fen Bil. Enst. Dergisi, 15(1): 67-76.
 34. Pincus DH, 2002. Microbial identification using the biomérieux Vitek 2 system, Biomérieux Inc., Hazelwood, MO, USA.

35. Rosselli W, Keller C, Boschi K. 2003. Phytoextraction capacity of trees growing on metal contaminated soil. *Plant Soil*, 256:265–72.
36. Salehizadeh H, Shojaosadati SA. 2003. Removal of metal ions from aqueous solution by polysaccharide produced from *Bacillus firmus*, *Water Res.*, 37, pp. 4231-423.
37. Sharma S, 2012. Bioremediation: Features, Strategies and applications. *Asian Journal of Pharmacy and Life Science*, 2(2): 202-213.
38. Strong PJ, Burgess J E. 2008. Treatment methods for wine-related ad distillery wastewaters: a review. *Bioremediation Journal*, 12: 70-87.
39. Troy MA, 1994. Bioengineering of Soils and Groundwater. P. 173-201. In: K.H. Baker and D.S Herson (ed.). *Bioremediation*, McGraw-Hill, New York.
40. Usman AR, Kuzyakov Y, Lorenz K, Stahr K. 2006. Remediation of a soil contaminated with heavy metals by immobilizing compounds. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 169: 205-212.
41. Üçüncü E, 2011. Su Mercimeği (*Lemna minor* Linneaus 1753) Kullanarak Farklı Konsantrasyonlardaki ağır metal (Cu, Cr, Pb) karışımlarının laboratuvar ortamında biyoremediasyonu. Yüksek Lisans Tezi, 84 s.
42. Vanlı Ö, Yazgan M. 2008. Ağır metallerle kirlenmiş toprakların temizlenmesinde fitoremediasyon Tekniği. Verweij PE, Breuker IM, Rijs AJ. 1999. Comparative study of seven commercial yeast identification systems. *Journal of Clinical Pathology*, 52:271–273.
43. Yurdakul İ, 2015. Kirlenmiş topraklarda ve sularda bitkisel iyileştirme teknikleri ve önemi. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 2: 55-62.
44. Yoon J, Cao X, Zhou Q, Ma L. 2006. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on contaminated Florida site. *Science of the Total Environment* 368 (2006) 456–464.