



***Pseudomonas putida* TARAFINDAN ÜRETİLMİŞ
MANGAN OKSİTLER İLE SULU ORTAMDAN
FARMASOTİK GİDERİMİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Çevre Müh. Semih CÖMERT

Anabilim Dalı: Çevre Mühendisliği

Bilim Dalı: Çevre Bilimleri

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Özlem TEPE

TEMMUZ-2018

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Pseudomonas putida* TARAFINDAN ÜRETİLMİŞ MANGAN OKSİTLER İLE
SULU ORTAMDAN FARMASOTİK GİDERİMİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Çevre Müh. Semih CÖMERT

(142112102)

Anabilim Dalı: Çevre Mühendisliği

Bilim Dalı: Çevre Bilimleri

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Özlem TEPE

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 27 Haziran 2018

TEMMUZ-2018

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Pseudomonas putida TARAFINDAN ÜRETİLMİŞ MANGAN OKSİTLER İLE
SULU ORTAMDAN FARMASOTİK GİDERİMİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Çevre Müh. Semih CÖMERT

(142112102)

Anabilim Dalı: Çevre Mühendisliği

Bilim Dalı: Çevre Bilimleri

Tezin Enstitüye Veriliş Tarihi: 27.06.2018

Tezin Sunum Tarihi: 11.07.2018

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Özlem TEPE (F.Ü)

Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Arzu YADİGAR DURSUN (F.Ü)

Dr. Öğr. Üyesi Mehtap TANYOL (M.Ü)

TEMMUZ-2018

ÖNSÖZ

Bu çalışmaya başlamamda ve çalışmamın tüm aşamalarında benimle yakından ilgilenen, değerli bilgileri ile beni yönlendiren, benden her türlü desteği ve yardımı esirgemeyen, kendisiyle çalışmaktan onur duyduğum ve her konuda kendisini örnek alacağım kıymetli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Özlem TEPE'ye minnet ve şükranlarımı sunmayı bir borç bilirim.

Çalışmamın yürütülmesinde maddi destek sağlayan, FÜBAP'a ve sağladığı çalışma olanaklarıyla Çevre Mühendisliği Bölümüne şükranlarımı sunarım.

Her konuda beni desteklediğini bildiğim ve her zaman yanımda olacağına inandığım değerli aileme ve Nida TORAMAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Semih CÖMERT
Elazığ-2018

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
ŞEKİLLER LİSTESİ	VIII
TABLolar LİSTESİ	X
KISALTMALAR LİSTESİ	XI
1. GİRİŞ	1
2. BİYOJENİK METAL ve METAL OKSİTLER.....	3
2.1. Biyojenik Metal ve Metal Oksitlerin Üretimi.....	3
2.1.1. Bakterilerle Nanopartiküllerin Sentezi	4
2.1.2. Mantarlarla Nanopartiküllerin Sentezi	6
2.1.3. Bitkilerle Nanopartiküllerin Sentezi	7
2.1.4. Aktinomisetler ve Mayalarla Nanopartiküllerin Sentezi	8
2.2. Biyojenik Metal ve Metal Oksit Türleri	9
2.2.1. Biyojenik Mangan Oksitler	9
2.2.2. Biyojenik Demir Oksitler	11
2.2.3. Paladyum – Platinyum	12
2.2.4. Altın ve Gümüş.....	13
2.3. Çevre Mühendisliğindeki Uygulama Alanları.....	13
2.3.1. Metal Biyosorpsiyon, Biyoiyileştirme ve Biyogerikazanın	13
2.3.2. Katalitik Kirletici Madde Degradasyonu ile Biyosorpsiyon	16
2.3.3. Organik Kirleticilerin Katalitik İndirgemesi	16
2.3.3.1. Katalitik Dehalojenasyon.....	16
2.3.3.2. Katalitik 4-Nitrofenol Degradasyonu	18
2.3.4. Diğer Organik Bileşiklerin Katalitik Arıtımı.....	18
2.3.5. Katalitik Cr(VI) Giderimi	20
2.3.6. Membran Arıtım Prosesleri İçin Biyo-Sentezlenen NP'ler	21
2.3.7. Göze Çarpan Konular: Biyo-Çökeltim Stratejilerinin Optimizasyonu.....	22
3. MANGAN VE MANGAN OKSİTLER.....	23
3.1. Mangan Mineralojisi.....	23

3.2.	Mangan Kimyası ve Jeokimyası	23
3.3.	Mangan Biyolojisi ve Biyokimyası	25
3.4.	Biyolojik Mangan Oksitin İlk Çalışmaları	26
3.4.1.	Mangan Okside Eden Bakterilerin İzolasyonu	26
3.4.2.	Mn (II) Oksidasyonu ve Enerji	26
3.4.3.	Bakteriyel Mn (II) Oksidasyonunun Endüstriyel Yönleri	27
3.4.3.1.	Tarım.....	27
3.4.3.2.	İçme Suyu Arıtımı	27
3.4.3.3.	Ra Giderimi	28
3.5.	Biyolojik Mangan Oksidasyonu	28
3.5.1.	Ortamdaki Mn (II) oksidasyonunun Ölçülmesi	28
3.5.2.	Leptothrix Discophora	29
3.5.3.	<i>Bacillus SG-1</i>	29
3.5.4.	<i>Pseudomonas Putida MnB1</i>	29
4.	TEPKİ YÜZEY METODU	31
4.1.	Tepki Yüzey Metodu	31
4.2.	Deney Sayısının ve Model Katsayıların Hesaplanması.....	34
4.3.	Tepki Yüzey Metodu (TYM) için Kullanılan Tasarım Modelleri.....	34
4.4.	Regresyon Analizi	35
4.4.1.	Bağımlı değişken	35
4.4.2.	Bağımsız Değişken	35
4.4.3.	F- Testi.....	36
4.4.4.	Anova.....	36
4.4.5.	Uyum Eksikliği (Lack of Fit)	37
4.4.6.	Artık Analizi	37
5.	MATERYAL VE METOT.....	38
5.1.	Mikroorganizma ve Büyüme Şartları	38
5.2.	Biyojenik Mangan Oksit Üretimi	38
5.3.	Kesikli Deneyler	39
5.4.	İki Adımlı Ekstraksiyon.....	40
5.5.	Biyojenik Mangan Oksitlerin Karakterizasyonu	40
5.6.	Parasetamol Analizi	41

6.	BULGULAR VE TARTIŞMA	42
6.1.	<i>Pseudomonas putida</i> ile Biyogenik Mangan Oksit Üretimi	42
6.1.1.	Biyogenik Mangan Oksit Üretimine pH'ın Etkisi	42
6.1.2.	Biyogenik Mangan Oksit Üretimine Sıcaklık Etkisi	44
6.1.3.	Biyogenik Mangan Oksit Üretimine Başlangıç Mn (II) Konsantrasyonunun Etkisi	46
6.2.	Biyogenik Mangan Oksitin Karakterizasyonu	48
6.3.	Biyogenik Mangan Oksitler İle Parasetamol Giderimi	55
6.3.1.	Biyogenik Mangan Oksitler İle Parasetamol Giderimi Üzerine pH'ın Etkisi	55
6.3.2.	Biyogenik mangan oksitlerle parasetamol giderimi üzerine biyogenik mangan oksit miktarının etkisi	58
6.3.3.	Biyogenik Mangan Oksitler İle Parasetamol Giderimi Üzerine Parasetamol Konsantrasyonunun Etkisi	60
6.4.	Tepki Yüzey Yöntemi ile Ortam Optimizasyonu	62
6.5.	Parasetamol Giderim Mekanizması	70
6.6.	LC-MSMS İle Parasetamol Dönüşüm Ürünlerinin Belirlenmesi	72
7.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	75
	KAYNAKLAR	79
	ÖZGEÇMİŞ	82

ÖZET

Parasetamol, ağrı kesici ve ateş düşürücü olarak yaygın bir şekilde kullanılan farmasotik bir maddedir. Bu çalışmada, *Pseudomonas Putida* bakterisinin manganı oksitleyerek oluşan mangan oksitlerce farmasotiklerin giderilmesi araştırılmış ortam pH'ı, parasetamol konsantrasyonu ve biyogenik mangan oksit miktarının giderim üzerine etkileri incelenmiştir. Giderim farklı şartlar ve miktarlar kullanılarak yapılmış ve parasetamol giderim ortamı tepki yüzey metodu ile optimize edilmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında *Pseudomonas Putida* bakterisi için uygun üretim ortamı hazırlanmış ve daha sonra üretilen bakteri kültürü biyogenik mangan oksit üretim ortamına (1: 10 oranında) aktarılmıştır. Bakterilerin mangana alıştırılması aşamalı olarak bir dizi deney ile gerçekleştirilmiştir.

Mangan oksidasyonu üzerinde sıcaklık ve pH'ın etkisi incelenmiştir. Bu amaçla pH 6-8 aralığında değiştirilirken sıcaklık ise 23, 28 ve 40 °C'de incelenmiştir. En yüksek Mn (II) oksidasyon yüzdesinin elde edildiği sıcaklık 28 °C, pH ise 7 olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızın bir diğer aşamasında başlangıç Mn (II) konsantrasyonunun Mn (II) oksidasyonu üzerindeki etkisini belirlemek için 28 °C'de ve pH 7'de, 5-100 mg/L arasında değişen 6 farklı Mn (II) konsantrasyonunda gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızın bir sonraki aşamasında parasetamol giderimi üzerine pH, biyogenik mangan oksit miktarı, parasetamol konsantrasyonunun etkisi belirlenmiştir.

Araştırmanın son aşamasında ise tepki yüzey metodu ile ortam optimize edilmeye çalışılmıştır. Modelin istatistiksel analizi, varyans analiz modeli (ANOVA) ile yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Farmasotik, Parasetamol, *Pseudomonas Putida*, Mangan, Mangan Oksit, Biyogenik Mangan Oksit, Oksidasyon, Tepki Yüzey Metodu, ANOVA

SUMMARY

Investigation of pharmaceutical removal from aqueous medium with manganese oxides produced by *Pseudomonas putida*

Paracetamol is a commonly used pharmaceutical agent for pain reliever and fever reducer. In this study, the removal of pharmaceutical using manganese oxides oxidized by *Pseudomonas putida* bacteria was investigated and the effects of solution pH, paracetamol concentration and biogenic manganese oxide amount were investigated.

At the beginning of the study, a suitable production medium for the *Pseudomonas putida* bacteria was prepared and then the produced bacterial culture was transferred to the biogenic manganese oxide production medium (1: 10 ratio). The adaptation of the bacteria to the manganese was carried out in a gradual series of experiments.

The effect of temperature and pH on manganese oxidation was investigated. For this purpose, the solution pH was changed between pH 6-8 and the temperature was examined at 23, 28 and 40 ° C. The highest Mn (II) oxidation percentage was obtained at 28 °C and pH 7.

In another step of our study, to determine the effect of the initial Mn (II) concentration on Mn (II) oxidation, a series of Mn (II) oxidation experiments were carried out at 28 ° C and pH 7 with six different Mn (II) concentrations ranging from 5-100 mg/L.

The effect of pH, biogenic manganese oxide, paracetamol concentration on paracetamol removal was determined at the next stage of our study.

In the last phase of the study, It has been tried to optimize the paracetamol removal medium by the response surface method. Statistical analysis of the model was done by ANOVA.

The removal was made using different conditions and quantities and the paracetamol removal medium was optimized by the response surface method.

Key Word: Pharmaceuticals, Paracetamol, *Pseudomonas Putida*, Manganese, Manganese Oxide, Biogenic Manganese Oxide, Oxidation, Response Surface Method, ANOVA

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1.	Biyojenik MnO_2 ile katalizlenmiş organik mikrokirletici oksidasyonunun kavramsal modeli	10
Şekil 2.2.	Doğal bir çevrede oluşan Demir okran	12
Şekil 3.1.	Sulu çözeltide mangan stabilitesi diyagramı	24
Şekil 4.1.	a. Maksimum nokta için tepki yüzey grafiği ve izohips eğrileri b. Minimum nokta için tepki yüzey grafiği ve izohips eğrileri c. Eyer noktası için tepki yüzey grafiği ve izohips eğrileri	33
Şekil 6.1.	Farklı pH'ta reaksiyon süresine göre Mn (II) yüzdeleri	43
Şekil 6.2.	Farklı sıcaklıklarda oksitlenmiş, adsorbe edilmiş ve süpernatantta kalan Mn (II) yüzdeleri	45
Şekil 6.3.	Zamanla süpernatantta kalan, adsorplanan ve oksitlenen Mn (II) yüzdeleri	48
Şekil 6.4.	<i>Pseudomonas putida</i> tarafından üretilen biyojenik mangan oksitlerin X-ışını difraktogramı	49
Şekil 6.5.	Biyojenik mangan oksit örneğinin FTIR spektrumları	50
Şekil 6.6.	Biyojenik mangan oksitlerin SEM-EDX görüntülerini	51
Şekil 6.7.	Biyojenik mangan oksitten alınan geniş XPS spekturumları ve Mn 2p XPS spektrumları	54
Şekil 6.8.	Farklı çözelti pH'ında parasetamol giderim verimlerinin zamanla değişimi	55
Şekil 6.9.	Farklı çözelti pH'larında Mn (II) konsantrasyonunun zamanla değişimi	57
Şekil 6.10.	Zamana karşı $\ln (C/C_0)$ grafiği	58
Şekil 6.11.	Parasetamol gideriminde biyojenik mangan oksit miktarının etkisi	59
Şekil 6.12.	Farklı biyojenik mangan oksit miktarlarında parasetamol giderimi süresince ortama salınan Mn (II) konsantrasyonunun değişimi	59
Şekil 6.13.	Zamana karşı $\ln (C/C_0)$ grafiği	60
Şekil 6.14.	Farklı başlangıç parasetamol konsantrasyonlarındaki giderim yüzdeleri	61

Şekil 6.15.	Parasetamol giderimi sırasında farklı parasetamol konsantrasyonlarında salınan Mn (II) konsantrasyonunun değişimi.....	62
Şekil 6.16.	Parasetamol giderimi için gözlenmiş değerlere karşı hesaplanmış tahmini değerlerin değişimi.....	65
Şekil 6.17.	Referans noktasına göre seçilmiş bir değere göre parasetamol gideriminde bağımsız değişkenler olan A, B ve C'nin etkisini gösteren perturbation grafiği.....	66
Şekil 6.18.	Parasetamol giderim veriminde; pH (A) ve parasetamol konsantrasyonu (B) ve biyojenik mangan oksit miktarının (C) etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri	67
Şekil 6.19.	Farklı etkiler altında parasetamol giderimi	71
Şekil 6.20.	Biyojenik mangan oksitlerle parasetamol gideriminin şematik gösterimi.....	71
Şekil 6.21.	Biyojenik mangan oksitlerle parasetamol giderimin 0., 2., 4., 6., ve 8. gününde oluşan ara ürünlerin LCMSMS kromatogramları.....	78

TABLÖLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. En fazla çalışılmış mangan oksitleyen bakteri türleri	10
Tablo 3.1. Farklı ortamlardaki Mn miktarları.....	24
Tablo 5.1. <i>P. putida</i> 'nın üretimi için seçilen zengin besi ortamı bileşimi.....	38
Tablo 5.2. Biyojenik mangan oksit üretimi çalışmalarında kullanılan besin ortamı	39
Tablo 6.1. Merkezi Kompozit Tasarım (MKT)'a göre bağımsız değişkenlerin kodlanmış ve gerçek değerleri.....	63
Tablo 6.2. MKT'a göre deney tasarımı ve gözlenen parasetamol giderim yüzdeleri	63
Tablo 6.3. Ortam bileşenlerinin bir fonksiyonu olarak parasetamol giderim veriminin ikinci dereceden polinom (kuadratik) modeli için varyans analizi	64

KISALTMALAR

AAS	: Atomik adsorpsiyon spektrometresi
BioMnOx	: Biyogenik mangan oksit
BMO	: Biyogenik mangan oksit konsantrasyonu
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
MKT	: Merkezi kompozit tasarım
NP	: Nanopartiküler
SEM-EDX	: Taramalı Elektron Mikroskobu
TYM	: Tepki yüzey metodu
XRD	: x- ışını kırınımı

1. GİRİŞ

Küreselleşen dünyamızda gelişen teknoloji ile birlikte son 40 yıl içerisinde ilaç sektörüne yapılan yatırımlar giderek artmaktadır. Türkiye’de ilaç tüketimi % 81.5 yerli üretim ile % 18.5 ise ithalatla karşılanmaktadır. Türkiye’de yerli ve ithal olarak 5000 çeşit ilaç bulunmaktadır (ÇŞB, 2013). İlaçlar bazı yollar ile çevreye verilmektedir. Tedavi amacı ile kullanılan ilaçlar küçük bir yapı değişikliğiyle idrar veya dışkıyla atılıp çevreye karışabilir. İlaç üretimindeki proses atık suları, çöplere dökülen ilaçlar, içme sularının kirlenmesine neden olabilir. Arıtma tesislerinde bu farmasotiklerin bazıları arıtılabilirken bazıları da arıtma tesisi çıkışından alıcı ortama karışabilir. Bu farmasotikler kolayca arıtma tesislerinde aktif farmasötik bileşikler haline dönüşebilir. Çevrede bulunan ilaç atıkları, dirençli ve endokrin sistemine bozucu etki yapan maddeler gibi biyolojik olarak aktif madde olarak sayılan tehlikeli bileşiklerin öncülerindendir. Ayrıca hiç kullanılmamış farmasotiklerin direkt atılmasıyla toprak ve yeraltı suyu kirliliği olarak da karşımıza çıkabilmektedir. Klasik evsel atık su arıtma tesisleri organik maddeler ile azot ve fosfor gibi maddelerin giderimi üzerine projelendirilmesi yapılmıştır. Günümüzde kullanılan birçok ilaç ise atık su arıtma tesislerinde farklı kimyasal yapılarından dolayı çok az arıtmakta yada hiç arıtılamamaktadır. Parasetamol dünya genelinde yaygın şekilde kullanılan ağrı kesici ve ateş düşürücü ilaçtır. Yüksek metabolizasyonuna rağmen çok yaygın bir şekilde kullanıldığından dolayı her yıl yaklaşık olarak 292-585 ton arasında atıksu arıtma tesislerine ulaşmaktadır. Mevcut atıksu arıtma tesislerinde parasetamol giderimi tam olarak gerçekleşmemektedir.

Mikroorganizmaların, metallerin oksidasyon halini değiştirme potansiyeline sahip olduğu bir asırdır bilindiği halde, bu proseslerin yeni uygulamalara ışık tutacağı gerçeği sadece son yıllarda anlaşılmış ve biyolojik olarak üretilmiş metal katalizör ve reaktiflere dayalı yeni arıtım metotları geliştirilmiştir. Bu biyojenik metaller yüksek spesifik yüzey alanı ve yüksek reaktivite gibi partiküler karakteristiklerinden dolayı, adsorbent, katalizör, oksidant ve reduktant olarak çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır. Bu metotlar; dirençli kirleticilerin giderimi, sediment ve atıksu akımlarından elektrik üretimi, yeni biyokatalizörlerle metal geri kazanımı ve metalle kirlenmiş toprak ve suların ıslahını kapsamaktadır.

Bakteriyolojik olarak üretilmiş metalik ya da mineral nanopartiküllerin kullanımı; hem pahalı olmayan üretim, bakteriyel biyomas üzerinde partiküllerin stabilizasyonu ve kimyasal dönüşüm proseslerine yardımcı olabilen bakteriyel bir metabolizma gibi biyolojik hem de spesifik bir yüzey alanı, daha yüksek bir katalitik ve kimyasal aktivite gibi fizikokimyasal nedenlerden dolayı kimyasal olarak üretilen nanopartiküllere karşı bazı avantajlar sunmaktadır (Francis vd, 2011). İnovatif su arıtım teknolojilerinde biyolojik olarak üretilmiş mangan oksitler, biyojenik demir türleri ve sıfır değerlikli paladyum (Pd), platin (Pt), altın (Au) ve gümüş (Ag) gibi biyometaller kullanılmaktadır.

Biyojenik paladyum nanopartiküllerin, halojenli organik bileşiklerin redüktif degradasyonu için etkili bir katalizör olduğu kanıtlanmıştır. Biyojenik gümüş nanopartiküller, uzun-kalıcı antimikrobiyal ve antiviral aktivitesinden dolayı dezenfektan madde olarak kullanılmaktadır. Demir türleri de, organik mikrokirleticilerin redüktif degradasyon yeteneğine sahiptir. Mangan oksitleyen bakterilerle üretilmiş biyojenik mangan oksitler de çeşitli kirleticilerin gideriminde kullanılmaktadır. Biyojenik mangan oksitler abiyotik mangan oksitlerden daha yüksek reaktiviteye ve metal sorpsiyon kapasitesine sahiptir. Şu ana kadar yapılan çalışmalarda biyojenik mangan oksitlerin sulu çözeltilerden parasetamol gideriminde kullanımına dair bir araştırmaya henüz rastlanmamıştır. İşte bu bilgilerden hareketle önerilen tez kapsamında *Pseudomonas putida* bakterisi ile biyojenik mangan oksit üretilcek ve üretilen biyojenik mangan oksitlerle sulu çözeltilerden parasetamol giderimi üzerine çeşitli parametrelerin etkileri incelenecek, tepki yüzey metodu kullanılarak optimum şartlar belirlenecek, önemli ara ürünler tespit edilerek giderim mekanizmaları açıklanmaya çalışılacaktır. Elde edilecek sonuçlarla düşük maliyetli inovatif materyallerin mikrokirleticilerin gideriminde uygulanabilirliği ortaya koyulacaktır.

2. BİYOJENİK METAL ve METAL OKSİTLER

2.1. Biyogenik Metal ve Metal Oksitlerin Üretimi

Organizmalar yüksek seviyede metal içeren çevrede hayatta kalmak için onlarla başa çıkacak mekanizmalar geliştirerek adapte olmaktadır. Bu mekanizmalar toksik metalin kimyasal doğasını değiştirmeyi kapsamaktadır. Nanopartikül oluşumu belirli bir metale karşı direnç mekanizmasının yan ürünüdür ve bu onların üretiminin alternatif bir yolu olarak kullanılabilir. Nanopartiküller eşsiz termal, optik, fiziksel, kimyasal, manyetik ve elektriksel özelliklere sahiptir. Bu özellikler; biyosensörlerin, elektroniklerin, katalizörlerin ve antimikrobiklerin üretilmesi için faydalınabilir. Metalik nanopartiküller önemli ve geniş çapta kullanılmış bir grup materyallerdir. Nanopartikül sentezlenme yolu ve onların potansiyel kullanımları arasında önemli bağlantılar vardır. Gümüş nanopartiküller (AgNP) antibakteriyel özellikler sergilemek için çeşitli çalışmalarda kullanılmaktadır. Örneğin, gümüş ve altın gibi nanopartiküller gram pozitif ve gram negatif bakterilerin inhibisyonunda etkili olduğu görülmüştür.

Nanopartiküllerin hazırlanması için en yaygın metot; genelde az masraflı ve yüksek hacimli ıslak-kimyasal tekniklerdir. Ancak nanopartikül üretiminde toksik solvent ihtiyacı ve kimyasallarla bulaşma onların biyomedikal uygulamalarda kullanımını sınırlar. Bundan dolayı birçok endüstride kullanıma müsaade edecek yeşil, toksik olmayan metalik nanopartikül sentezleme yoluna ihtiyaç vardır. Bu ise biyolojik metotların kullanımıyla başarılmaktadır.

Birçok bakteri, mantar ve bitki metalik nanopartikül sentezleme yeteneğine sahiptir. Hücre içi ya da hücre dışı sentez, gelişme sıcaklığı, sentezleme süresi, ekstraksiyon kolaylığı ve örnekten uzaklaştırılmış yüzdeye karşı sentezleme yüzdesi, biyolojik nanopartikül üretiminde önemli rol oynar. Doğru biyolojik metodu bulma birçok değişkene bağlıdır. Metal nanopartikülün tipi hayati bir etmedir. Çünkü genelde organizmalar az sayıdaki metallere karşı rezistans geliştirmektedir.

Doğal biyogenik metalik nanopartikül sentezi iki kategoriye ayrılabilir. İlki metal iyonlarının biyolojik olarak daha stabil formlara kimyasal olarak indirgenmesi olan biyoindirgenmedir. Birçok organizma katabolik metal indirgemeyi kullanma yeteneğine sahiptir yani metal iyonlarının indirgenmesine bir enzimin oksidasyonu eşlik etmektedir. Bu, bulaşmış örnekten sonra güvenli olarak uzaklaştırılabilen stabil ve inert metalik

nanopartiküller oluşturur. İkinci kategori biyosorpsiyondur. Bu bir su ya da toprak örneğinden organizmaya (hücre duvarına) enerji gerektirmeden metal iyonlarının bağlanmasını kapsar. Belirli bakteri, mantar ve bitkiler peptitler ya da metal iyonlarına bağlanan modifiye olmuş hücre duvarına sahiptir. Bunlar nanopartikül formunda daha stabil kompleksler oluşturabilir (Panditos ve Horsfal, 2014).

Biyojenik yaklaşımlarla metal ve metal oksitlerin hazırlanması ilginç fırsatlar sunabilir. Bu yaklaşım günümüzde yaygın bir şekilde uygulanmadığı halde, çevresel olarak yararlı şartlar altında iyi bilinen materyallerin hazırlanması için özgün yöntemler geliştirilebilir. Biyojenik materyallerin oluşumunun anlaşılması; istenen özellikli materyallerin hazırlanmasında iyileştirilmelere yol gösteren laboratuvar sentezini de geliştirebilir. Ayrıca mikrobiyal mineralizasyona dayanan yaklaşımlar kolaylıkla sentezlenemeyen yüksek spesifik yüzey alanına sahip demir ve mangan oksitleri oluşturmak için uygulanmaktadır. Performansı etkileyen parametreler olan oksidasyon safhası, kristal fazı ve morfolojilerin kontrolü de elde edilebilir (Hargreaves ve Alharthi, 2015).

2.1.1. Bakterilerle Nanopartiküllerin Sentezi

Mikroorganizmalar arasında prokaryot bakteriler nanopartikül sentezinde en fazla dikkat çekmeyi başarmıştır (Mandal vd., 2006). Bakteri tercihinin sebepleri; çevrede yüksek oranda bulunmaları, ekstrem şartlara adapte olma yeteneği (Panditos ve Horsfal, 2014) ve onların nispeten kolay manipülasyonudur (Thakkar vd., 2010). Bakteriler çalışmalar için iyi bir seçimdir. Bakteriler hızlı gelişir ve kultivasyonu pahalı değildir. Sıcaklık, oksijenlendirme ve inkübasyon süresi gibi gelişme şartları kolaylıkla kontrol edilebilir. He vd. tarafından yapılan bir çalışmada, inkübasyon sırasında gelişme ortamında pH'ın değişimiyle farklı boyut ve şekilde nanopartiküllerin üretildiği keşfedilmiştir. Böyle özelliklerin kontrolü önemlidir, çünkü nanopartiküllerin değişen boyutları optik, katalizör ya da antimikrobiyal gibi farklı uygulamalar için gereklidir (Panditos ve Horsfal, 2014).

Johnston vd. *Delftia acidovorans* bakterisiyle saf altın nanopartiküllerin üretimini araştırmış ve küçük ribosomal olmayan peptit (delftibactin) üretiminin altın nanopartikül üretiminden sorumlu olduğunu rapor etmiştir. Johnston vd., delftibactin üretiminin *Delftia acidovorans*'ın toksik altın iyonlarına direnç mekanizmasıyla bağlantılı olduğuna inanmışlardır. Delftibactine bağlı inert altın nanopartiküllerin üretimiyle, altın artık hücreler için hiçbir toksisite problemi oluşturmaz. Johnston grubu metalik

nanopartiküllerin oluşumundan sorumlu mekanizmayı ve farklı bakterilerde onun nasıl değişebileceğini ilk defa rapor etmiştir. Başka bir grup bakterilerle altın nanopartiküllerin sentezinde alternatif bir metot ileri sürmüştür. He vd., *Rhodopseudomonas capsulate* bakterisiyle 10-20 nm boyutunda altın nanopartiküllerinin hücre dışı oluşumunu gözlemlemiş ve bu nanopartiküllerin NADH-bağılı reduktaz yoluyla sentezlendiğini ileri sürmüştür.

Pd (paladyum), katalitik olarak oldukça aktif metallerin bir toplamı olan Platinyum grubu metallerin bir üyesidir ve halojensizleştirme ve hidrojenlendirme reaksiyonları için katalizör olarak öncelikle kullanılmaktadır. Son yıllarda, sıfır değerlikle Paladyum (Pd⁰) nanopartiküllerin, ağır metallerle oldukça kirlenmiş Alp bölgelerinde bulunan bir bakteri kullanılarak sentezlenebildiği gösterilmiştir. Çevrede bulunan ağır metallere dirençli bakteri çeşitlerinden olan *Pseudomonas* hücrelerinin katalitik olarak aktif nanopartiküllerin senteziyle alakası olduğu bulunmuştur. Macaskie vd., *Escherichia coli*'nin bakteride bulunan hidrogenazlar yardımıyla Pd⁰ nanopartiküller sentezleyebileceğini de öne sürmüşlerdir. Yukarıda bahsedilen her iki çalışmada, Pd nanopartiküllerin bakterinin hücre zarında oluşmuş olduğu bulunmuştur. Pd nanopartiküllere kolaylıkla ulaşılabilmesinden bu onları cazip kılmıştır.

Bacillus licheniformis bakterisinin hücre içi AgNP'ler ürettiği gözlenmiştir. Gümüş iyonlarının ilavesinden sonra kültürün rengi AgNP'lerin varlığına işaret eden koyu bir kahverengiye dönüşmüştür. Kalimuthu ve grubu nanopartiküllerin gerçekten Ag'ten yapıldığını ve onların çözeltide disperse olduğunu anlatmıştır. Ancak nanopartiküller hücre içinde sentezlendiğinden Kalimuthu ve grubu ek olarak ekstraksiyon yapmak zorunda kalmıştır. Pugazhenthiran vd., benzer sonuçlar gözlemiştir. Hücre içi AgNP'lerin *Bacillus sp.* üyelerinin AgNO₃ içeren ortama kültürlendiği zaman oluştuğunu bulmuştur. Reaksiyon yavaştır ve inkübasyon süresi 7 gündür. Bu endüstriyel amaçlar için uygun değildir. İlave ekstraksiyon adımına rağmen, Kalimuthu vd. tarafından önerilen metot endüstriyel olarak daha önemlidir. Ancak AgNP'lerin endüstriyel biyo üretimi için en büyük potansiyele sahip bir yaklaşım Shaverdi vd. tarafından uygulanmıştır. Metal iyonlarının canlı bir kültüre ilavesine tezat olarak kültür santrifüjlenmiş ve süpernatantın metalik nanopartikül oluşturma yeteneği test edilmiştir. Bu hücre dışı oluşum tipi daha uygundur. Çünkü hem saflaştırma basit hem de üretim hızında artış gözlenmiştir.

Sintubin vd. tarafından yapılmış ilginç bir çalışmada laktik asit bakterileriyle AgNP üretimine odaklanmış ve birçok bakteri türü test edilmiştir. AgNP üretiminin iki adımlı

prosesi önerilmiştir. İlkinde, Ag iyonları biyosorpsiyon yoluyla hücre duvarında birikmiş ve sonra bu iyonların indirgenmesi metalik nanopartikülleri oluşturmuştur. Sintubin vd., hücre duvarının nanopartiküller için ortam pH'nın artmasıyla gözlenen agregasyonun önlenmesiyle onları stabilitesini koruyan bir kaplama maddesi olarak hareket ettiğini ileri sürmüştür. Nanopartikül sentezinde pH'nın etkisi He vd. tarafından araştırılmış ve pH'nın değişmesiyle farklı boyut ve şekillerde nanopartiküller oluşmuştur.

Ag ve AuNP'ler anti mikrobiyal yeteneklerinden dolayı önemli olduğu halde birçok çalışma uranyum gibi diğer metallerde de yapılmaktadır. Bakır nanopartiküllerin sentezi (CuNP) geçmişte zordu. Cu nanometre ölçekte stabil değildir ve hızlıca bakır oksit'e (CuO) oksitlenmektedir. Cu nanopartikül sentezinden sonra kullanılacaksa stabil olması gerekmektedir. 2013'te *Morganella morganii* kullanılarak biyolojik yollarla saf elemental Cu nanopartiküller üretiminin mümkün olduğu bir çalışmada ortaya çıkarılmıştır. Ramanathan ve grubu bakterinin Cu iyonları alımı ve iyonların ya bir metal iyon reduktaz ya da benzer bir proteine bağlanmasıyla hücre içi olarak Cu nanopartiküllerinin sentezlendiğini belirtmiştir. Bu iyonun sonra hücre dışı olarak biriken ve hemen hücrenin dışına çıkan metalik Cu⁰'a indirgenmesine sebep olmuştur (Pantodis ve Horsfall, 2014).

2.1.2. Mantarlarla Nanopartiküllerin Sentezi

Son yıllarda, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum sp.*, *Trichothecium asperellum*, *T. viride*, *Phaenerochaete chrysosporium*, *F. solani* USM 3799, *F. semitectum*, *A. fumigatus* ve birçok mantar metalik nanopartikül sentezinde kullanılmaktadır. Fungal misel ağı, bitki materyali ve bakterilerle karşılaştırıldığında biyoreaktör ve diğer reaktörlerde hidrodinamik basınç, karıştırma ve diğer şartlara direnebilir. Redüktif proteinlerin hücre dışı salgılanması daha fazladır ve aşağı akışlı sistemlerde kolaylıkla işletilebilir. Ayrıca hücre dışında çöken nanopartiküller gereksiz hücre bileşenini içermemektedir ve çeşitli uygulamalarda doğrudan kullanılabilir (Narayanan ve Sakthivel, 2010).

Mukherjee vd., hücre içi AgNP sentezini *Verticillium* mantarı kullanarak çalışmış ve fungal biyomasın Ag⁺ iyonlarına maruz kaldığında metal iyonlarının hücre içi indirgenmesine neden olduğunu gözlemiştir. Fungal hücrelerin ince bölümlerinin elektron mikroskopisi analizleri muhtemelen hücre duvarı membranında bulunan enzimlerle metal iyonlarının indirgenmesinden dolayı AgNP hücre duvarı yüzeyi altında oluştuğunu ortaya çıkarmıştır. Araştırmacılar, fungal hücre yüzeyinde AuCl₄⁻ tuzağının, miselli hücre duvarında mevcut olan enzimlerde lizin artıkları gibi pozitif olarak yüklü gruplarla

elektrostatik etkileşimle oluştuğunu yorumlamıştır. Bhainsa ve D'Souza filamentli mantar *Aspergillus fumigatus* kullanarak ekstraselular AgNP sentezini rapor etmiştir. Sentez prosesi hızlı ve ayrıca AgNP, gümüş iyonunun hücre filtratı ile temasının ilk dakikalarında oluşmuştur (Thakkar vd., 2010).

Bimetalik Au-Ag alaşımları da *F. oxysporum* tarafında sentezlenebilir. *F. oxysporum* biyoması eşmolar HAuCl_4 ve AgNO_3 çözeltilerine maruz kaldığı zaman değişen mol fraksiyonlarında oldukça stabil Au-Ag alaşım nanopartikül sentezlenebileceği ortaya çıkarılmıştır (Mandal vd., 2006). *F. oxysporum*'in gelişme ortamına uygun tuzlar ilave edildiği zaman kadmiyum sülfür (CdS), kurşun sülfür (PbS), çinko sülfür (ZnS) ve molibden sülfür (MoS) nanopartiküller ürettiği de gösterilmiştir (Pantidos ve Horsfall, 2014).

Manyetik özelliğe sahip yaygın bir demir oksit olan magnetit (Fe_3O_4)'in patojenik mantar *F. oxysporum* ve *Verticillium* sp ile üretildiği de gösterilmiştir. Magnetit nanopartiküllerin manyetik rezonans görüntüleme gibi medikal ve manyetik kayıt aletleri gibi medikal olmayan uygulamalarda kullanımı konuşulmaktadır. Birçok çalışmada kullanılan mantarlar patojenik olduğundan bu tür mantarların kullanımı risklidir. Gerçekte, *T. reesei* gıda, hayvan yemi, ilaç, kağıt ve tekstil endüstrileri gibi sektörlerde zaten yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Pantidos ve Horsfall, 2014).

Bansel, patojenik mantar olan *Fusarium oxysporum* kullanarak, baryum titan, manyetit, zikonyum, titanyum ve silisyum dahil nanopartiküler oksitlerin sentezine öncülük etmiştir (Bansel vd., 2008).

2.1.3. Bitkilerle Nanopartiküllerin Sentezi

Bakteri ve mantarlarla metalik nanopartikül sentezi son 30 yılda oldukça yoğun bir şekilde çalışılmasına rağmen bu konuda bitkilere az odaklanılmıştır. Son yıllarda, bitki ya da bitki ekstraktı kullanılarak metalik nanopartiküllerin sentezi birçok araştırmada uygulanmıştır. Bu alan, nispeten yeterli derecede keşfedilmemiştir ve umut verici sonuçlar sunmaktadır (Pantidos ve Horsfall, 2014).

Richardsan vd., karbonhidrat ve protein içeren yaprak ekstraktının gümüş iyonları için indirgeyici bir madde olarak hizmet gördüğünü nakletmişlerdir. Huang vd., *Cinnamomum camphora* yaprak ekstraktında bulunan redüktif biyomoleküllerin varlığında gümüş nanopartiküllerin sentezini FTIR ile doğrulamıştır. FTIR spektrasında, çeşitli heterosiklonlanlardan türemiş $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$, $-\text{C}-\text{O}-$, $-\text{C}=\text{C}-$ ve $-\text{C}=\text{O}-$ benzeri fonksiyonel

gruplarının varlığı gözlenmiştir. Bu biyoaktif bileşiklerin gümüş nanopartiküller için indirgen ya da kaplama maddesi olarak hareket ettiği farzedilmiştir. Liv vd., bitkilerde gümüş nanopartiküllerin üretimini açıklamak için tanıma-indirgeme-sınırlı nükleasyon (çekirdeklenme) ayrıca bir büyüme modeli önermiştir. Tanıma fazında gümüş iyonları elektrostatik etkileşim boyunca *Capsicum annum*'da bulunan protein yüzeyinde tuzağa düşürülür sonra muhtemelen proteinler gümüş iyonlarını indirger, gümüş çekirdeklenmesine sebep olur (Duran vd., 2011).

AuNP'lerin ekstraselular sentezi limon otu bitkisinden (*Cymbopogon flexuosus*) elde edilen ekstraktlar kullanılarak örneklenmiştir. Küre şekilli AuNP kümeleri, sıvı-benzeri ekstrakt altın tetraklorit (AuCl_4^-) ile inkübe edildiği zaman elde edilmiştir. Bu akışkanlığa, bitki ekstraktında bulunan aldehit ve ketonların nanopartikülle yüzey kompleksleşmesi katkı sağlar. Neem bitkisi sıvı besiyeri (*Azadirachta indica*) Au, Ag ve heriki metal iyonlarının tuzlarıyla eşzamanlı olarak karıştırılmış ve üretim yaklaşık olarak 2 saatte durağan bir noktaya ulaşan bir sentez hızına sahiptir (Pantidos ve Horsfall, 2014).

Song vd., *Diopyros kaki* yaprak ekstaraktı kullanarak PtNP üretimini denemiş ve Pt iyonlarının % 90'dan daha fazlasının yaklaşık olarak 2.5 saatte nanopartiküllere indirgendiğini ifade etmiştir. Song ve grubu Pt iyonlarının amin, alkol, keton ve karboksilik asitler gibi yaprak ekstaraktı içinde bulunan fonksiyonel gruplardan dolayı indirgendiğini öne sürmüştür. Bu enzimle gerçekleştirilmiş bir proses değildir ve FTIR analizinde hiçbir protein piki bulunmamıştır (Pantidos ve Horsfall, 2014).

2.1.4. Aktinomisetler ve Mayalarla Nanopartiküllerin Sentezi

Aktinomiset *Thermomonospora sp.*'nin küresel altın nanopartikül sentezlediği bulunmuştur. FTIR analizleri nanopartikül yüzeyinde kaplama ve stabilize maddesi olarak proteinin amid (I) ve (II) bantlarının varlığı ile doğrulanmıştır. Bu partiküller 6 aydan daha fazla süre stabildir. Ökaryot mikroorganizmalardan olan mayaların da yarı iletkenlerin sentezi için çoğunlukla kullanılabileceği keşfedilmiştir. *Candida glabrata*, metal-tiolat kompleksi oluşturarak (metal iyonlarının toksisitesini nötralize edilmesiyle) küresel şekilli peptit bağlı CdS quantum kristallerini üretmiştir (Narayanan ve Sakthivel, 2010).

2.2. Biyojenik Metal ve Metal Oksit Türleri

2.2.1. Biyojenik Mangan Oksitler

Mangan (Mn) dünyada en bol bulunan ikinci geçiş elementidir. Karasal çevrede mangan, Mn (II), Mn (III) ve Mn (IV) olarak bulunmaktadır. Mn (II)'nin Mn (IV)'e iki-elektronlu oksidasyonu, termodinamik olarak aşağıdaki denkleme göre oksijen varlığında gerçekleşir (Tebo vd., 2004).



Mangan yüksek konsantrasyonlarda toksiktir ve birçok enzimatik reaksiyonda gerekli bir kofaktördür. Mn (II)'nin Mn (III/IV)'e oksidasyonu elementi çözülmüş türlerinden çok düşük çözünürlüklü katı bir faza dönüştürür. Böylece manganın oksidasyonu, mobilitesini (hareketlilik), biyolojik yararlanımını ve jeokimyasal döngüsünü önemli ölçüde etkiler (Zeiner vd., 2006). Ancak abiyotik mangan oksidasyonu sadece çok yüksek bir pH'da olduğundan dolayı doğada çok sık olarak oluşması beklenmez (Tebo vd., 1997).

Mangan oksitler (MnO₂), topraklarda, sedimentlerde ve deniz çevrelerinde yaygın oksidatif bir maddedir. Son yıllarda, MnO₂, fenolik bileşikler, aromatik N-oksitler, tetrasiklinler ve sentetik hormon 17 α -etinilestradiol gibi organik mikrokirleticileri gidermek için uygulanmaktadır. Ayrıca mangan oksitler, Co (II), Cr (III) ve Pu (III) gibi iz metallerin oksidasyonunda da kullanılmaktadır. Bileşiklerin oksit yüzeye sorpsiyonu ve takiben elektron transferini içeren bir mekanizma gerçekleşmektedir (Zeiner vd., 2006; Forrez vd., 2010).

Bakteriler ve mantarlar gibi çeşitli mikroorganizmaların, çözülmüş Mn (II)'i çözünmez Mn (IV) oksitlere oksitlediği bilinmektedir. Mn (II)'nin mikrobiyal oksidasyonu abiyotik oksidasyondan (birinci derece hız sabiti: 10⁻³-10⁻⁵/h) daha yüksek bir hızda (birinci derece hız sabiti: 10⁻¹⁰-10⁻²/h) olduğundan, biyojenik mangan oksitlerin üretimi son zamanlarda biyoteknolojinin ilgisini çekmektedir. En fazla çalışılmış mangan oksitleyen bakteri türleri (MOB) Tablo 2.1'de özetlenmiştir (Hennebel vd., 2008).

Tablo 2.1. En fazla çalışılmış mangan oksitleyen bakteri türleri (Hennebel vd., 2008)

Mangan oksitleyen bakteri türleri

Leptothrix discophora

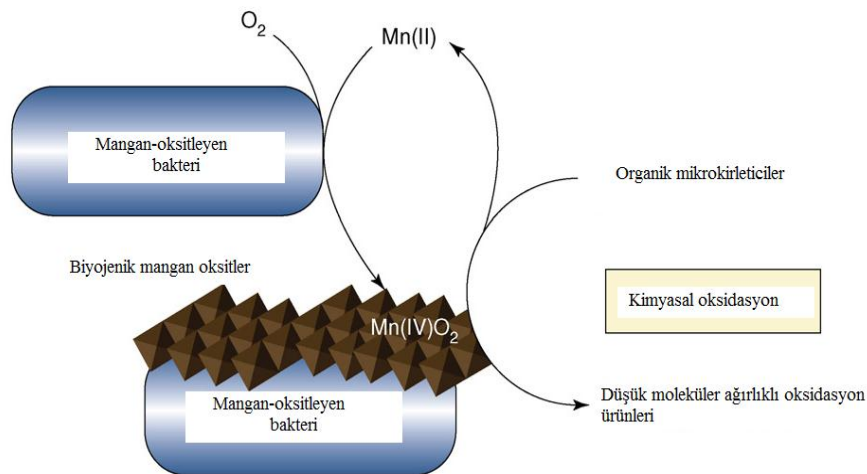
Pseudomonas putida MnB1

Pseudomonas putida GB-1

Spores of *Bacillus* sp. SG-1

Pedomicrobium sp. ACM

Bio-MnO_x terimi, biyolojik olarak üretilmiş mangan (III, IV) oksitleri ifade etmektedir. Mangan oksidasyonunun biyokimyasal mekanizması, tek elektron transferi yoluyla Mn⁺²'i Mn (III) oksitlere oksitleyen bakteriyal multibakır oksidazlara dayanmaktadır. Mangan(III) oksit multibakır oksidazlar veya O₂ ile doğrudan reaksiyon yoluyla Mn (IV) oksitlere oksitlenmektedir. Hem Mn (III) hem de Mn (IV) oksitler hücre yüzeyinde ve etrafında çökmektedir. Organik mikrokirletici varlığında, mangan oksitler elektron alıcı olarak hareket etmekte ve mikrokirletici oksitlenirken Mn⁺²'ye indirgenmektedir (Şekil 2.1). Bakteriler tarafından üretilen nano boyutlu mangan oksitler (Mn (III) ve Mn (IV)), yüksek spesifik yüzey alanlarına ve çok sayıda Mn (IV) boşluklarına sahip olduğundan dolayı mükemmel sorpsiyon ve oksidasyon özelliği gösterirler. Mikrobiyolojik olarak üretilmiş mangan oksitlerin atıksulardan mikrokirleticileri uzaklaştırmak için kullanımı ilginç bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır (Furgal vd., 2015).



Şekil 2.1. Biyojenik MnO₂ ile katalizlenmiş organik mikrokirletici oksidasyonunun kavramsal modeli (Furgal vd., 2015).

Biyojenik mangan oksitler abiyotik mangan oksitlerden daha yüksek reaktiviteye ve metal sorpsiyon kapasitesine sahiptir. Sentetik δ -MnO₂ 58 m²/g ve ticari olarak bulunan mangan oksit toz ve granül pirolüsit sırasıyla 47 m²/g ve 0.048 m²/g spesifik yüzey alanına sahip iken *Pseudomonas putida* ve *Leptothrix discophora* SS-1 tarafından üretilmiş mangan oksitlerin sırasıyla 98 m²/g ve 224 m²/g spesifik yüzey alanına sahip olduğu tespit edilmiştir. Biyolojik olarak üretilmiş yüksek yüzey alanlı mangan oksitler Pb (II), Zn (II), Co (II) ve Ni(II) gibi pozitif olarak yüklü ağır metaller için daha yüksek sorpsiyon kapasitesine sahiptir (Hennebel vd., 2008).

2.2.2. Biyojenik Demir Oksitler

Mikro organizmalar, demiri çeşitli amaçlarla ve biyokimyasal döngü etkisinde çokça kullanılabilirler. Fe (II), göl tortularında ve birçok anoksik akiferlerde baskın elektron alıcılarıdır. Katabolik demir indirgeyici bakteriler (DIRB), organik bileşiklerin solunumu için elektron alıcı olarak Fe (III) oksit çökeltilerini kullanabilirler. Bu yüzden son zamanlarda, kirletici maddelerin değişimi için, Fe indirgeyici çevrelerde kullanımının artması dikkat çekmiştir. Demir solunumunun bir sonucu olarak hem yeni olan biyojenik mineral formunun içine katılan hem de minerallerin etrafında yüzey adsorpsiyonu için çözeltilerde birikebilen Fe (II) üretilir. Oksitleyici şartlar altında, demir oksitleyici bakteriler, arkler ve mantarlar Fe (II)'yi enerji üretimi için bir elektron verici olarak kullanırlar. Bu mikro organizmalar tarafından Fe giderimi ve oksidasyonunu anlamak için uygulanmıştır. Fakat sadece birkaç çalışma şimdiye kadar biyo teknolojik uygulamalarda biyojenik demir türlerinin faydalı olduğunu göstermiştir.

Biyojenik olarak üretilen demir oksit ve demir oksihidroksit, katalitik uygulamalar açısından önemli konulardır. Özellikle *Leptothrix* tarafından üretilen demir oksihidroksit üzerine odaklıdır. *Leptothrix* filamentli bir mantardır. Doğal bir çevrede oluşan demir okranın (koyu sarı renk) bir örneği Şekil 2.2'de gösterilmiştir. Fotoğrafın ilginç bir özelliği, su yüzeyi üzerinde var olan bir filme benzer bir yağın oluşmasıdır. Film jelatinli sulu çamur ile ilişkili, biyojenik olarak üretilmiş demir metallerin varlığını gösterebilen bir biyofilmdir. Demir okra ayrıca, su arıtım sistemlerinde oluşabilir ve bu yerlerde problem oluşturabilir (Hargreaves ve Alharthi, 2015).



Şekil 2.2. Doğal bir çevrede oluşan Demir okran (Hargreaves ve Alharthi, 2015).

2.2.3. Paladyum – Platinyum

Pd'nin çökmesi ve giderilmesi ve de yanı sıra reaksiyonlarını gidermede katalizör olarak kullanılmasında 2 mikroorganizma kullanılmaktadır (SRB ve IRB). Llyod ve arkadaşları, *Desulfovibrio desulfucons* tarafından Pd (0)'dan Pd (II)'e biyolojik olarak yükseltgendiğini göstermiştir. De Wint ve arkadaşları, *Shewanella oneidensis*'in bu durumda hücre duvarı üzerinde ve periplasmasında sıfır değerlikli Pd nano parçacıklarının oluşarak, çöktüğünü ve giderildiğini göstermiştir. Bu araştırmacılar ayrıca, Pd'nin hücre kuru ağırlık oranını değiştirerek hücre duvarı üzerindeki nano parçacık boyutları ile ilgili biyo-Pd üretimini en uygun hale getirmişlerdir.

Yer altı suyunda ve kirlenmiş toprağın arıtımı için (de-) hidrojenasyon, indirgenme ve dehalojenasyonunda bir katalitik olarak biyo-Pd'nin uygulanması iyi bir şekilde belgelenmiştir. Örneğin bir biyo-Pd katalizörü ile polikloropipenliz'in klorosuzlaştırılması, De Windt ve Baxter-Plant tarafından tarif edilmiştir.

Trikloretilen, heksaklorosiklon heksan (HCH), polibromo difenil eterler (PBDEs), ve kloro fenoller gibi diğer halojen bileşikler biyo-Pd ile dehalojelenme yapabilir. Ayrıca inorganik kirleticilerin biyo-Pd ile giderildiği daha az toksik ve daha durağan Cr(III) için mutajenik ve kanserojen Cr(VI) nın giderilmesi Mabbet tarafından ve zararlı kloridleri için toksik perkloratın indirgenmesi De Wint tarafından gösterilmiştir.

Pt'nin mikrobiyal indirgenmesi üzerinde fazla bir bilgi yoktur. Pd giderimi için yetenekli olan sülfür indirgeyici bakteriler ve *Shewanella* bakterileri, Pt çökmesi ve

giderimi içinde kullanılabilir. Ayrıca siyanobakteri *Anabaena*, *Calothrix* ve *Leptolyngbya*, Pd'nin yanı sıra sıfır değerlikli Pt'nin hücre içi nano parçacık üretimini sağlarlar.

Platinyumu biyolojik olarak çöktürebilen potansiyel bir uygulama henüz bulunmamıştır. Fakat Pt'nin önemli olması sebebiyle yakın gelecekte Pt gidermede uygulanacak mikrobiyal proseslerin geliştirilmesi beklenmektedir (Hennebel vd., 2008)

2.2.4. Altın ve Gümüş

Demir azaltıcı arkelerin ve bakteri türlerinin geniş olarak kullanılması, çözünmez Au(0)'dan, çözünür Au giderilebileceğini göstermiştir. Bu türler; *Anabaena*, *Calothrix* ve *Leptolyngbya*, *Pyrobaculum islandicum*, *Pyrococcus furiosus*, *Thermotoga*, *Escherichia coli* ve *Desulfovibrio desulfuricans*. Au nano maddelerinin sentezi ve geri dönüşümündeki biyolojik metotlar, klasik fizikokimyasal tekniklere alternatif olarak ortaya çıkmıştır. İlk olarak, Au'nun mikrobiyal geri dönüşümü sadece saf Au çözeltilerinden ($AuCl_4^-$) değil değerli atıklar ve elektronik hurda sızıntı sularından nano parçacıkların sentezi ve altının geri kazanımı da gerçekleştirilmiştir. Bu işlem özellikle çok önemlidir, çünkü elektronikler ve takı sektörleri altının dünya geneli tüketiminin %50'nden daha fazla bir kısmından sorumludur.

Gümüşün mikrobiyal giderimi üzerine yoğun olarak çalışılmıştır. Çünkü metal yaygın olarak anti mikrobiyal olarak bilinir. Birkaç Ag dayanıklı mikroorganizmanın Ag iyonlarının çökmesi ve giderilmesi üzerine dayandırılarak detoksifikasyon mekanizmaları geliştirilmiştir.

Ag (0) nano parçacıklarının sentezinde *Pseudomonas stutzeri*, *Lactobacillus*, *Aeromonas* ve *Enterobacteria* bakterilerinde ve *Aspergillus flavus* ve *Phanerochaete chrysosporium* mantarları kullanılmaktadır (Hennebel vd., 2008).

2.3. Çevre Mühendisliğindeki Uygulama Alanları

2.3.1. Metal Biyosorpsiyon, Biyoyileştirme ve Biyogirikazanın

Oksidasyon-redüksiyon prosesleri hücresel metabolizmalar için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle diğer kimyasal bileşikler okside etmek veya gidermek için yetenekli biyomoleküller, canlı hücrelerin her birinde bolca bulunur. Birçok mikroorganizma, çevrelerini detoks etmek için bir aktif mekanizma olarak çözülmüş metalleri konsantre etmek ve bağlamak için kabiliyetlidir. Diğer biyolojik prosesler hatta

ölü biyokütle ile, bir elektron vericisinin oksidasyonu ile basit bir şekilde metal giderimi yapılabilir.

Bazı biyo polimerler ve biyo-atık maddeleri ile birlikte mayalar, bakteriler, mantarlar ve alglerin biyo kütlesi, değerli metalleri konsantre edici ve bağlayıcı olarak bilinir. Biyosorpsiyon olarak adlandırılan bu işlem, sulu çözeltilerden çeşitli çözünmüş metalleri geri kazanmak için yaygın kullanılan kimyasal metotlara, ucuz bir alternatif olarak gösterilebilir.

Chakraborty ve arkadaşları, AuNP'lerden Au konsantre etmek ve bağlamak için alglerin ve siyanobakterilerin yetenekli olduğunu göstermiştir. NP oluşum prosesleri, bir partiküler türe hastır ve onlar, *Lyngbya majuscula* ve *Spirulina subsala* türünden olan siyanobakterileri ve temiz su yeşil algi *Rhizoclanium hieroglyphicum*'u kullanarak NP oluşturur. Bir yosun olan *Fucus vesiculosus* tarafından biosorpsiyona uğrayan işlem esnasında AuNP'lerin oluşumu, Mata ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir. Bu araştırmacılar, biyogiderim prosesinin aşamalarını tartışmışlar ve NP oluşumu üzerine pH'ın bağlılığını tanımlamışlardır.

Pleurotus platypus makromantarının ölü biyokütleleri, Das ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada Ag'nin biyosorpsiyonu için kullanılmıştır. Mantar biyokütlesi 20 C'de 200 mg/L Ag(I)'nin varlığında pH 6 'da 46,7 mg/L yüksek Ag alımı belirlenmiştir. Bu araştırmacılar ayrıca, biyosorpsiyon prosesinin kinetik ve termodinamik analizini detaylandırarak sunmuştur (Schröfel vd., 2014).

Zhang ve arkadaşları, atık suda Ag arıtımı için fakültatif anaerobik bakteri *Aeromonas SH10*'un kullanıldığını göstermiştir. Bu çalışmada, biyokütlenin, AgNP olan Ag^+ ve $Ag(NH_3)_2$ iyonlarını biriktirdiğini göstermiştir.

Değiştirilmiş biyokütle-polietilenemin (PEI) tarafından geri kazanılan platinyumun bir örneği, Wan ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Bu çalışmada PEI, ortaya çıkan atık sudan platinyum toplamak için kullanılan maddelerin ve *E. coli* biyokütlesinin yüzeyine eklenmiştir. Modifiye edilmiş biyokütlelerin sonraki yakımından, külden platinyumun % 98,7 geri dönüşümü elde edilmiştir. Au geri kazanmak için, kahverengi makroalg *Sargassum*, benzer bir çalışmada kullanılmıştır ve % 90'dan daha büyük bir verim rapor edilmiştir (Schröfel vd., 2014).

İçme suyunda doğal olarak oluşan arseniğin toksik konsantrasyonu, Güneydoğu Asyada büyük bir halk sağlığı problemidir. Selvakumar ve arkadaşları, As(V)'i gidermek için bir AgNP sorbenti geliştirilmesi sayesinde bu problemler için umut verici bir çözüm

olduğunu tanımlamıştır. Çalışmada bir yeni maya türü olan *Saccharomyces cerevisiae*'nin indirgeme kabiliyeti, metalleri ayırmak için kullanılmıştır. Sonuç olarak, Sinha ve arkadaşları manganın giderimi ile aynı anda MnO_2 NP'lerini oluşturan *Bacillus* türlerinin ağır metale dayanıklı olduğunu göstermiştir.

Hekzavalent krom bileşikleri, tehlikeli toksinlerdir, oysa Cr (III) iyonları ve bileşikleri nispeten toksik değildir. Yapılan diğer çalışmalar, kromu gidermek için biyolojik olarak sentezlenen PdNP'ler kullanılmıştır (Schröfel vd., 2014).

Geçmiş yıllarda, tıpta, optik cihazlarda, elektronikler ve katalizlerde değerli metallerin kullanımında önemli ilerlemeler olmuştur. Değerli metallerin arasında platinyum grubu metalleri (Platinyum, Rodyum, rutenyum, ve paladyum) yaygın bir şekilde katalizör olarak uygulanmaktadır. Örneğin, otomobillerde zararlı gaz emisyonlarını azaltmak için, katalitik dönüştürücülerin kullanımının artması nedeniyle bunların kullanımı daha fazla kısıtlanmıştır. Özellikle Pd, çok yaygın bir şekilde kullanılan katalizör haline gelmiştir. Bu sınırlı kaynaklar, aşırı pahalı uçuculuğa neden olur. Bu yüzden, sudan paladyumun geri kazanımı gereklidir. Bu geri dönüşüm teknikleri, hidro ve piro metalurjik proseslerdir. Bu proseslere, önemli yatırımlar, emek ve zaman gereklidir.

Kimyasal sentezler için umut verici bir alternatif, bakteriler tarafından metallerin biyo-indirgenme tortularının kullanılmasıdır. Bu biyoteknolojik yaklaşım, nano maddelerin uygun üretim metodu olarak servis edilebilir. Bunun yanı sıra paladyum ve diğer metaller için etkili bir geri kazanma tekniğidir (Schröfel vd., 2014).

Leptothrix ve *Galionella* Fe oksidasyonunu gerçekleştirmektedir. Bu bakteriler redoks ve spesifik pH şartları altında çözünmüş Fe (II)'yi ve Fe (III) oksit çökeltisini oksitleyebilir. Biyolojik oksidasyonla ağır metal adsorpsiyonunda etkili adsorbentler olan özellikle *Lepidocrite* ve ayrıca goethite (α -FeOH) üretilir.

Nelson vd. *Leptothrix discophora* SS-1 tarafından üretilmiş biyojenik mangan oksitlerin abiyotik Mn (IV) (hidro) oksitlerden 5 kat daha fazla ve pirolüsit oksitlerden 500-5000 kat daha fazla Pb (II) (Mn molu başına) adsorpladığını belirlemiştir (Nelson vd., 1999).

Toner vd., *Pseudomonas putida* MnB1 tarafından üretilmiş bir biyofilm içinde biyojenik mangan oksitlere Zn (II)'nin sorpsiyonunu araştırmış ve adsorpsiyon kapasitesini 0.37 mol Zn (II)/mol Mn (IV) olarak tespit etmiştir. *Acremonium sp.* KR21-2 tarafından üretilmiş mangan oksitlerin adsorpsiyon kapasitesi ise 0.3 mol Zn (II)/mol Mn (IV) olarak tespit edilmiştir. Biyojenik mangan oksitler Ni (II) ve Co (II) için de yüksek sorpsiyon

kapasitesi göstermiştir. Bu sorpsiyon verimleri, kimyasal olarak sentezlenmiş mangan oksitlerden yaklaşık olarak 10 kat daha yüksektir (Hennebel vd., 2008).

Wang vd., derin deniz mangan oksitleyen bakteri *Brachybacterium* sp. tür Mn32 tarafından üretilmiş biyojenik mangan oksitlerin Zn (II) ve Ni (II) adsorplama kapasitesinin yüksek olduğunu yaptıkları çalışma ile ortaya çıkarmıştır (Wang vd., 2009.).

Meng vd. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, sucul ortamlardan kadmiyum adsorpsiyonunda mangan oksitleyen bakteri *Bacillus* sp. WH4 tarafından üretilmiş biyojenik mangan oksitlerin abiyotik mangan oksitlerden daha etkili bir adsorbent olduğu belirlenmiştir (Meng vd., 2009).

2.3.2. Katalitik Kirletici Madde Degradasyonu ile Biyosorpsiyon

Metalik NP'ler, yüzey alanı başına düşen ağırlığının fazla olması nedeniyle, kataliz için özellikle heterojen kataliz için yaygın olarak kullanılır. Metalik NP katalizinin önemli sakıncası maliyetidir; altın, platinyum ve paladyum gibi metaller çok pahalıdır ve bunları NP'lere dönüştürmek aşırı enerji gerektirir. Birleştirilen biyosentetik yaklaşımlar, değerli metal içeren atıksulardan biyo-sorpsiyon yoluyla katalitik olarak aktif NP'ler üretebilir. Katalizör oluşumuyla biyolojik metal gideriminin birleşimi, De Carte ve Hennebel tarafından tanımlanmıştır. Burada biyosentezlenen metalik NP'ler, katalitik dehalojenasyon, organik oksidasyon yada metal giderimi için kullanılmıştır. Birçok çevresel giderim uygulamalarında, biyolojik olarak sentezlenen PdNP'ler kullanılmıştır (Schröfel vd., 2014).

2.3.3. Organik Kirleticilerin Katalitik İndirgemesi

2.3.3.1. Katalitik Dehalojenasyon

Paladyum merkezli katalizörler, aromatik bileşikler halojensizleştirmek için yeteneklidir. Bu reaksiyon, endüstri ve araştırmalarda organik sentez için ve ayrıca kirletici madde gideriminde çok önemlidir. Halojenli organik bileşikler; dirençli, biyoakümülatif ve toksik kirleticilerdir (PBT). Toksik maddeler (PBT bileşikleri), doğada doğal olarak bozulmaya uğramaz. Bu yüzden gelişmiş prosesler, bu bileşiklerin dehalojenlenmesi için önemlidir. Halojenli organik toksik maddeler; klordan, DDT, dieldrin ve heksaklorobenzen, poliklorlubifeniller (PCB) gibi yasaklanan pestisitler, elektronik cihazlarda önceden soğutma gazları, yağlar ve yumuşatıcılar olarak kullanılan bileşiklerdir.

Baxter-plant ve arkadaşları, biyosentezlenen PdNP'leri, *Desulfovibrio desulfuricans*'ın varlığında paladyumun giderilmesiyle elde etmiş ve bunu klorofenolün ve çeşitli PCB'lerin giderimi işleminde kullanmıştır. Bunge ve arkadaşları hücrelerin yokluğundaki giderimin PdNP'nin oluşacağı anlamına gelmeyeceğini belirtmiştir. Bu prosesler, format gibi elektron vericileri gerektirir. *Shewanella oneidensis*, diğer klorlu organik bileşikler ve PCB'nin dehalojelenmesi için biyosentez PdNP'ni kullanan diğer bir cins bakteridir. De Windt ve arkadaşları, *S.oneidensis*in periplazmik boşluğu içerisinde ve hücre duvarı üzerine çökelen PdNP'ni tanımlamışlardır. Çökelti ve sulardaki PCB etkili bir şekilde halojensizleştirilmiştir. Ayrıca, biyolojik olarak sentezlenen PdNP'nin katalitik aktivitesinin yaygın paladyum katalizör tozundan 100 kat daha büyük olduğu ortaya çıkarılmıştır (Bunge vd). Diğer çalışmalarda, yaygın yeraltı suyu kirleticisi olan trikloretilen (TCE)'nin klorsuzlaştırılması için paladyum hücrelerinin kullanıldığını gösterilmiştir.

Hennebel ve arkadaşları, biyolojik olarak sentezlenen PdNP tarafından TCE'nin katalitik klorsuzlaştırılması için 2 tane reaktör geometrisi tanımlamışlardır. Bunlar, bir poliüreten köpükte PdNP ile gömülü sabit bir yatak reaktörü ve pilot ölçekli bir membran reaktörüdür. Bu araştırmacılar, baskın bir ürün olan etan ile 22 saat sonunda TCE'nin % 98'ini gidermiştir. Günde biyo PdNP'ün gramı başına 1.059 mg TCE giderilmiştir

Diğer araştırmacılar, çay ekstraktı ile biyosentezlenen Fe ve Fe/Pd NP'leri kullanılmıştır. Daha sonra, TCE'nin katalitik degradasyonu için polimer membranlar sabitlenmiştir. Buradaki araştırmacılar, reaksiyon oran sabitinin biyometalik Fe/PdNP'ler için daha yüksek olduğunu bulmuştur (Schröfel vd., 2014).

Biojenik Fe oksit tarafından klorsuzlaştırma reaksiyonu, *G. metalliredurens* tarafından CCl_4 'ün enzimatik indirgenmesine göre 260 kat daha hızlı gerçekleştiği tahmin edilmiştir. Ayrıca sıfır değerlikli Fe ile bakteriyel etkileşim sonucu üretilen biyojenik Fe oksit, pestisit ve klorlu çözücüler içeren organik kirleticilerin dehalojelenme reaksiyonlarında etkili olduğunu göstermiştir. Bakteriler kendi kendilerine Fe (0) taneciklerini üretecek kadar yetenekli değildirler. Fakat biyojenik taneciklerle etkileşim yaparlar. Aslında bakteriyel Fe azaltımı, Fe (III) ün katmanlarını çözücü hale getirebilir (Hennebel vd., 2008).

2.3.3.2. Katalitik 4-Nitrofenol Degradasyonu

Son yüzyılın ortalarında farmasotikler, sentetik pestisitler, boyalar ve patlayıcıların hızlı kullanımı ve gelişmesi, su ve topraktaki toksik-nitro aromatik kirleticilerin bir mirası olarak sonuçlanmıştır. 4-nitrofenol (PNP) gibi bileşiklerin katalitik giderimi için kullanılan teknolojiler etkilenen çevrenin restore edilmesine yardımcı olabilir. Ayrıca, PNP'nin degradasyonu görünür UV spektrofotometre gibi yaygın olarak kullanılan ve ucuz olan optik metotlar kullanılarak kolayca ölçülebilir. PNP'nin katalitik indirgenmesi, biyolojik olarak sentezlenen NP'in katalitik indirgeme kapasitesini ölçmek için yaygın bir test yöntemi haline gelmiştir.

Biyosentezlenen NP'ler ile çalışılarak, PNP'nin giderimini ilk olarak Sharma tarafından yayınlanmıştır. *Sesbania drummondi* bitkisinin fidanları bitki dokularında sonradan oluşan kararlı AuNP'lerinde ve hidrojen tetraklorür çözeltisinde büyümüştür. AuNP'lerince zengin bu bitki dokuları, sodyum borohidridin varlığında PNP giderimi için bir kataliz etkisi olarak kullanılmıştır.

Daha sonra diğerleri, katalitik PNP giderimi için gerekli olan biyosentez metal grubu NP'nin eldesi için bitki maddelerini kullanmıştır. Hang ve arkadaşları, tıbbi bitki ve Çin otlarının 21 türünü kullanarak kapsamlı bir çalışma gerçekleştirmiştir. Bu bitkiler 4 gruba ayrılmış ve onların yaprakları, çiçekleri, meyveleri, sulu HAuCl₄ çözeltisinde 30 dk bekletilerek, NP biyosentezi için kullanılmıştır. Boyutlarının küçük olması nedeniyle, *Cacumen platyclodi* yaprakları kullanılarak hazırlanan AuNP'leri, katalitik PNP giderimi için kullanılmıştır.

Bakteriler ayrıca, PNP giderimi için gerekli olan biyometalik Pd, Au NP'lerin biyosentezi için kullanılır. Hosseinkhani ve arkadaşları, *Cupriavidus necator* hücrelerinin yüzeyi üzerinde biyo-destekli Pd (0) ve Au (0) NP'leri oluşturmuştur. Biyometalik parçacıklar, biyo destekli hem Au(III) hemde Pd (II) tuzunun eklenmesinin ardından oluşturulmuştur. Biyometalik NP'ler, bir çekirdek kabuğu yapısına sahip olmamalarına rağmen, monometalik nano parçacıklar ile karşılaştırıldığında, PNP dönüştürmede süper katalitik bir etki göstermiştir (Schröfel vd., 2014).

2.3.4. Diğer Organik Bileşiklerin Katalitik Arıtımı

Diğer organik bileşikler, biyo-sentezlenen NP kullanılarak etkili bir biçimde indirgenmiştir. Demir ve altın NP'ları sulu çözeltiye boyaları uzaklaştırmak için kullanılmıştır. Bir çalışmada, yeşil çay ekstraktı vasıtasıyla biyo-sentezlenen FeNP'leri,

turuncu metil boya ve mavi metilenin sulu çözeltilerinin deklorizasyonu için bir fenton katalizi gibi kullanılmıştır.

Sodyum borhidritin indirgenmesiyle oluşan demir NP'leri ile karşılaştırıldığında, biyosentezlenen demir NP'leri daha hızlı ve daha çok boya giderimi gerçekleştirmiştir. Gupta ve arkadaşları sulu çözeltilerde Sn (II)'nin varlığında, mavi metilen boyasının katalitik giderimi için gerekli olan biyo-sentez AuNP'nı elde etmek için yeşil çay ekstraktı kullanmıştır. Araştırmacılar, mavi metilenin giderimi için, AuNP'nın küçük bir miktarının aktivasyon enerjisini azalttığını ve boyanın gideriminin düşük sıcaklıkta bile gerçekleşebileceğini göstermiştir.

Zhou ve arkadaşları, PbS kullanarak kırmızı kumaş boya maddesinin fotokatalitik degradasyonu ve bakterinin 2 türü üzerinde ZnS oyuk nano yapılarının oluştuğunu belirtmiştir. UV ışığının varlığında, boyanın fotokatalitik degradasyonu, *Coccinia grandis* yapraklarının sulu ekstraktından hazırlanan AgNP'ler tarafından gerçekleştiğini göstermiştir (Schröfel vd., 2014).

Kuvvetli adsorpsiyon kapasitelerine ilaveten, mangan oksitler inorganik bileşikler için kuvvetli bir oksidant olarak da işlev görmektedir. Tani vd., As (III)'ün oksidasyonu ve As (III/V)'in adsorpsiyonunda *Acremonium* KR21-2 tarafından üretilmiş biyojenik mangan oksitlerin kullanımını ispatlamışlardır (Tani vd.). Liao vd., mangan (II) oksitleyen bakteri *Marinobacter* sp. Mn17-9 tarafından üretilmiş biyojenik mangan oksitlerin; oldukça toksik As(III)'ü daha az toksik As(V)'e oksitleme yeteneğine sahip olduğunu ortaya çıkarmışlardır (Liao vd., 2013).

Biyojenik mangan oksitler, organik mikrokirleticileri okside etmek için de kullanılmaktadır. Mangan oksitlerin doğum kontrol haplarının aktif bir bileşeni olan 17a-etilenestradiol (EE2)'ü oksitleme potansiyeli, mineral MnO₂ granülleriyle doldurulmuş sürekli akışlı bir reaktörde araştırılmış ve östrojenik aktivitenin % 81.7'i sentetik atıksudan uzaklaştırılmıştır. EE2 yalnızca MnO₂ granüllerine adsorplanmamış aynı zamanda östrojenik aktivitesiz bileşiklere degrade olmuştur. Yazarlar, oluşan Mn (II)'nin mikrobiyal mangan oksitleyen topluluk tarafından Mn (IV)'e mikrobiyal olarak yeniden okside olduğunu ileri sürmüştür. Sonuç olarak bu kendini yenileyen biyojenik mangan döngüsü, düşük maliyetli atıksu arıtımı sunmuştur. Forrez vd. de, MOB ve nitrifiye edici bakterileri içeren sürekli akışlı bir reaktörde EE2 gideriminde biyolojik olarak üretilmiş mangan oksitlerin etkisini araştırdıkları çalışmalarında % 57'e varan EE2 giderim verimi elde etmişlerdir. Hem biyojenik mangan oksitlerin hem de amonyak oksitleyen bakterilerin EE2

degradasyonunu gerçekleştirdiği görülmüştür (Hennebel vd., 2008; Sabirova vd., 2008; Kim vd., 2012).

Tu ve diğ., (2014), mangan oksitleyen bakteri *Pseudomonas* sp. G7 ile biyogenik mangan oksitler sentezlemiş ve ciprofloksasin oksidasyonu için kullanmıştır. Sonuçta, bu materyallerin suda biyolojik olarak parçalanamayan farmasotik kimyasalların giderimi için kullanılabileceğini göstermiştir. Meerburg vd. yaptıkları çalışmada, biyogenik mangan oksitler ve biyogenik gümüş nanopartiküllerini diklofenak ve klorlanmış formu 2-anilinofenilasetatin oksidatif giderimi için kullanmış ve diklofenak kirleticisinin *Pseudomonas putida* MnB6 tarafından mangan oksidasyonu sırasında hızlıca degrade olduğunu, biyogenik mangan oksitler ve gümüş türleri kullanıldığı zaman verimin arttığını gözlemlemişlerdir (Meerburg vd., 2012).

Yine Furgal vd., *Pseudomonas putida* tarafından üretilmiş biyogenik mangan oksitlerin mikrokirletici giderim etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında, steroid hormon östrojen ve 17- α etilestradiol tamamen uzaklaştırılmış, diklofenak ise % 26 oranında giderilmiştir (Furgal vd., 2015).

Forrez ve diğ., (2010) steroidal olmayan anti inflamatuvar ilaç diklofenak giderimini biyolojik olarak üretilmiş mangan oksitler (BioMnOx) kullanarak araştırmış ve nötral pH'da BioMnOx'lerle diklofenak oksidasyonunun kimyasal olarak üretilmiş MnO₂'lerle gerçekleştirilen oksidasyondan 10 kat daha hızlı olduğunu ortaya çıkarmıştır. Forrez vd.yaptıkları başka bir çalışmalarında, biyogenik metaller mangan oksitler (BioMnOx) ve bio-paladyum, laboratuvar ölçekli membran biyoreaktörlerde atıksu arıtma tesislerinden mikrokirletici giderimi için uygulanmış ve 14 mikrokirletici BioMnOx-MBR'da giderilmiştir (Forrez vd., 2011).

2.3.5. Katalitik Cr(VI) Giderimi

Biyolojik olarak sentezlenen NP'ler için diğer çevre uygulaması, nispeten toksik olmayan Cr (III)'ün güçlü oksidant Cr (VI)'nın katalitik giderimidir. Son birkaç çalışmada, sürekli akış şartları altında Cr (III) için Cr (VI)'yı etkili olarak giderebilen *E. coli*, *Desulfavibrio*, *Serratia* ve *Clostridium* gibi bakteri türleri tarafından biyosentezlenen PdNP'ları gösterilmiştir. Örneğin, Deplanche ve arkadaşları Cr (VI)/Cr (III) giderimi için biyosentezlenen katalizörün aktivitesini *E. coli* tarafından kodlanan hidrojenazın 3 tipinin nasıl etkilendiğini değerlendirmiştir. Bu çalışma ayrıca, Pd (II) gideriminde, hidrojenazın ilgisini belirtmiştir.

Macaskie ve arkadaşları, katalitik Cr (VI)/Cr (III) giderimi için gerekli olan PdNP'lerinin biyosentezini gerçekleştiren *E.coli* ve *Desulfovibrio*'yu karşılaştırmıştır. Mabbett ve Macaskie atıksu arıtımında bu işlem için *Desulfovibrio*'yu kullanmıştır. Buradaki araştırmacılar, biyosentezlenen PdNP'nin hem kimyasal olarak giderilen paladyumdan hemde canlı *Desulfovibrio* biyokütlesinden daha etkili bir giderim katalizi olduğunu bulmuştur.

Beauregard ve arkadaşları, gözenekli poliüretan köpüğüne biyo-PdNP'lerin yapışmasına aracılık eden, bir biyofilm formunda *Serratia* bakteri türünü kullanmıştır. Köpük, bakterinin büyümesini desteklemek için bir iskele olarak kullanılmış ve manyetik rezonans görüntüleme, Cr (VI)/Cr(III)'ün indirgenmesini direkt olarak izlemek için kullanılmıştır. Çünkü Cr (VI)_{aq} paramanyetik değildir ve Cr (III)_{aq} paramanyetiktir

Son olarak Chidambaram ve arkadaşları, *Clostridium pasteurianum* bakterileri aracılığıyla biyosentezlenen PdNP'leri kullanılarak Cr(VI) gideriminin gerçekleştiğini göstermiştir. Bu çalışma eşsizdir, çünkü diğerlerinin aksine *C.pasteurianum* grubu, akifer malzemeler üzerinde büyür ve katalitik indirgenme deneyleri, doğal bir akifer çevrede gerçekleşmiştir. Bu çalışma, akiferler içerisine enjekte edilen Pd(II) vasıtasıyla Cr (VI) giderimi için bir seçenek sunmuştur (Schröfel vd., 2014).

2.3.6. Membran Arıtım Prosesleri İçin Biyo-Sentezlenen NP'ler

Biyolojik kirlenmeyi azaltmak için teknolojiler, membrana dayalı su arıtım proseslerinin performansını büyük oranda arttırabilir. Zhang ve arkadaşları, polietersülfan membranları üzerinde *Lactobacillus fermentum* tarafından oluşturulan biyogenik AgNP'lerinin biyolojik kirlenmeyi engellediğini ortaya çıkarmıştır. Membranlar, bir atık su modelinden, *E. coli* hücrelerini ve organofosfat pestisitlerini gidermek için kullanılmıştır. Araştırmacılar, membranın yapısını ve performansını ölçmüş ve *E.coli* ve *P.aeruginosa* bakterileri kullanılarak biyo-kirlilik değerlendirilmiştir. Nano fonksiyonlandırılmış membran tabakası, iyi bir anti bakteriyel aktivite göstermiş ve 9 haftalık test esnasında membran yüzeyi üzerinde biyofilm oluşumu önlenmiştir (Schröfel vd., 2014).

2.3.7. Göze Çarpan Konular: Biyo-Çökeltim Stratejilerinin Optimizasyonu

Biyojenik mangan oksitin, ileri atık su arıtımı için kullanımı zaten ispatlanmıştır. Fakat mangan oksitleyen bakteriler kullanarak gerekli yüksek miktarlarda Mn oksit sentezi için, istenen kristal türlerini üretebilecek bu bakterilerin ideal fizikokimyasal şartlarına ilişkin derin kapsamları bakış açılarına ihtiyaç vardır. Çalışmaların çoğu deniz bakterisi *Bacillus* sp. ile gerçekleştirilmiştir. Zhang ve arkadaşları, *Leptothrix discophara* tarafından oksitlenen Mn (II)'oksidasyon kinetiğinde Cu(II)'nin varlığı, başlangıç Mn (II) konsantrasyonu, sıcaklık, pH, O₂'nin etkisini araştırmıştır. Bir biyo reaktör ortamında uygun şartlarda biyojenik Mangan oksiti kolay olarak üreten ve hızlı bir şekilde büyüyen *Pseudomona putida* bakterisi için karşılaştırılabilir veriler eksiktir. Bu organizmanın büyük ölçekli biyo teknolojik uygulamaların stabil performansını ve hızlı olarak uyum sağlamalarını elde etmek için uygun Mn oksit üretim şartlarına ihtiyaç vardır. Kristal oluşumu ve hücre yüzeyinde kuru hücre ağırlığı ve metal arasındaki oranın etkisi, diğer önemli faktörlerdir. Ek olarak, biyo katalizör yüzeyinin elektriksel yükü ve onun pH'a bağımlılığı araştırılmalıdır, çünkü kimyasal olarak üretilen Mn oksitler arasında bir fark beklenmektedir (Hennebel vd., 2008).

3. MANGAN VE MANGAN OKSİTLER

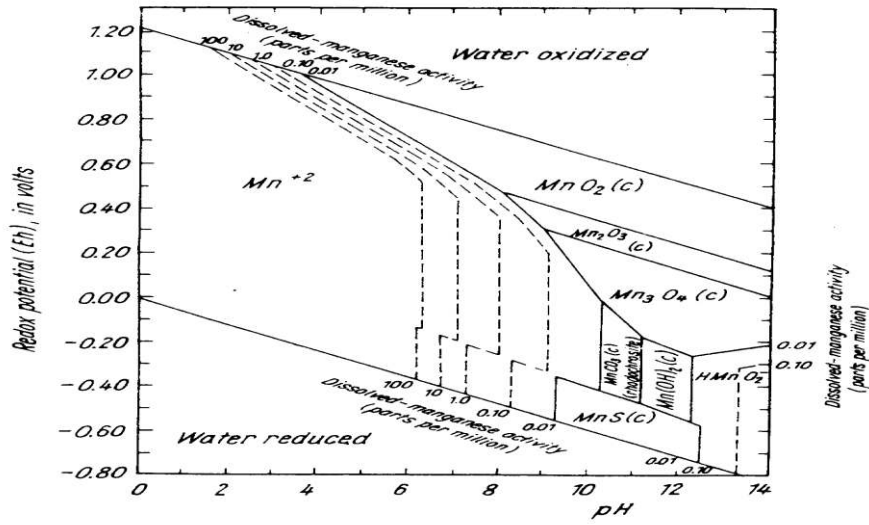
3.1. Mangan Mineralojisi

Mn yataklarının hidrotermal, tortu, kalıntı ve başkalaşıma uğrayan 4 jeolojik tipi vardır. Dünyada var olan en geniş ve en önemli yatakları Rusya, Brezilya, Güney Afrika, Gaban ve Avustralya'da bulunan hem tortu hem kalıntılardır. Ayrıca okyanus tabanları üzerinde yaklaşık 3 trilyon ton manganın, mangan yumrusu formu olduğu tahmin edilmektedir. 300'den fazla mineral içeren manganın sadece birkaç tanesi önemlidir. Oksitler ve oksihidroksitler en geniş yatakları oluşturur.

3.2. Mangan Kimyası ve Jeokimyası

Mn fazlasıyla çok yönlü bir elementtir ve 0, +2, +3, +4, +6 ve +7 oksidasyon seviyelerinde bulunabilir. Fakat doğada 3 halde bulunabilir: Mn (II) Mn (III) ve Mn (IV). İndirgenmiş form olan Mn (II), çözünür ve suların çoğunda bulunan manganın ana formudur ve anoksik şartlar altında kararlı yapıdadır. Mn (III) çok kararlı değildir ve çoğunlukla özel ortamlarda bulunur. Örneğin bazı mantarlar, selüloz indirgeme mekanizmalarında Mn (III) kullanır. Oksik şartlar altında manganın kararlı formu olan Mn (IV), çözünmez oksitler ve oksihidroksitlerin çeşididir.

Mn kimyasını etkileyen en önemli faktör, çevrede bulunan oksijen ve pH arasındaki kararlılık sınırlarıdır (Şekil 3.1). Manganın kimyasal oksidasyonu yüksek pH ve yüksek Eh şartları altında daha avantajlıdır ve 10'dan yüksek pH değerinde hızlıca kimyasal oksidasyon oluşur. Oysa oksidasyonun reaksiyonuyla doğru orantılı yüksek aktivasyon enerjisi nedeniyle çok yavaşta olsa nötral pH'da da meydana geldiği tahmin edilir.



Şekil 3.1. Sulu çözeltide mangan stabilitesi diyagramı

Sonuç olarak Mn (II)'nin kimyasal olarak oksitlenmesi Fe(II)'den çok daha yavaştır. Hızlı oksidasyon oranlarının nedeni ise çevrede gözlenen biyolojik oksidasyondur. Bu özel durumun nedeni sık sık meydana gelen, çevredeki manganın redoks dönüşümleri ve manganın çok hassas çevresel değişimleriyle indirgenmesi ve oksitlenmesidir. Çevredeki Mn konsantrasyonu çok değişkendir. Aşağıdaki Tablo 3.1.'de birkaç farklı çevre için tipik konsantrasyon listelenmiştir.

Tablo 3.1. Farklı ortamlardaki Mn miktarları

ORTAM	ppm	Mol Mn/Lt
Toprak ve Taş (toplam Mn)	200 - 3000	3.5 mM - 55 mM
Göl Suyu	0.004 - 0.2	72 nM - 3.5 µM
Göl Tortusu	103 - 105 (10%)	20 mM - 1.8 M
Okyanus Su Yüzeyi	10-4 - 10-3	1 nM - 20 nM
Nehir Suyu	102 - 103	1 mM - 20 mM
Yüzey Suyu	1 - 10	20 µM - 200 µM
Karasal Bitkiler	20 - 500	360 µM - 9 mM

Mangan oksitler bazı tortu ve toprakların % 10'unda bulunurken okyanus suları, 1nM'den daha az Mn içerir. Bunun nedeni manganın su kolonlarında oksitlenmesidir. İndirgenmiş ortamlarda, mangan oksitler kararlı değildir ve çok çabuk Mn (II)'e indirgenirler. Bazı göl ve fiyortlar gibi tabaklı su yapılarının derinliklerinde Mn (II)'nin geniş konsantrasyonları birikir ve anaerobik hale gelir. Bu durumlarda Mn (II), oksijen

sülfid ara yüzünün üstünde dağılır ve ara yüzün üstünde Mn oksit parçacıklarının birçoğu birikir.

Mn oksitler güçlü oksidantlardır ve toprakta oksijen dışında karşılaşılan en güçlü okside olabilen maddedir. pH 7’de demir oksitten daha fazla okside olurlar. Mn oksitler büyük ölçüde reaktiftir ve fenol gibi organik ısıya dayanıklı bileşiklerin değişik biçimlerine okside olabilirler.

Mangan oksitin kimyası, yüzey kimyasal reaksiyonlar tarafından domine edilmiştir. Mn oksit yüzeyleri negatif yüklüdür ve sonuç olarak yüzeylerinde çeşitli katyonları adsorbe ederler ve mineral kafeslerine diğer metalleri dahil ederler. Bakır, kobalt, kadmiyum, çinko, kurşun, radyum, toryum gibi birçok iz elementi temizler.

Aslında Mn oksit tarafından temizlenen iz elementleri, iz metalinin çözünür formunun ortamdaki tamamen uzaklaştırılmasında oldukça etkilidir. Mn oksitle beraber kapalı kum filtrelereli, sudaki istenmeyen katyonların giderilmesi için farklı durumlarda kullanılır. Örneğin Schweppes LTD tarafından içki imalatı için kullanılan su, bazı filtreler aracılığıyla arıtılır. Buna benzer filtrelerde, içme suyundan radyumun giderilmesi için başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

3.3. Mangan Biyolojisi ve Biyokimyası

Mangan, tüm hayat formları için gerekli bir elementtir. Süperoksit dismutazlatalar, pirüvat karboksilaz içeren birçok enzimler için önemli bir kofaktördür. Manganın oksitlenme potansiyeli fotosentezde olduğu gibi su moleküllerinin oksijene oksidasyonunu katalize ettiği durumlarda Mn rol oynadığı zaman elektron transferindeki kritik rolleri ölümsüzleştirir.

Bitkilerdeki Mn eksikliği ciddi bir problemdir. Buna biyolojik olarak mevcut olan Mn (II) neden olur. Toprakta manganın çoğu Mn (IV) olarak bulunur ve pH yüksek olduğu zaman yada manganın aktif biyolojik oksidasyonu olduğu zaman meydana gelir. Mn eksikliğinden muzdarip olan bitkilerin yaprak nekrozu gelişir. Diğer iz elementler gibi manganda çok yüksek konsantrasyonlarda toksik olduğu için düşük konsantrasyonlarda gereklidir. Kronik Mn zehirlenmesini (CMnP) ilk olarak 1837’de Cooper tanımlamıştır ve 1900’lü yılların başında tekrar gözlemlemiştir. Parkinson hastalığının etkilerine benzer ve merkezi sinir sistemine benzer hasar sonucu geniş nöronal kayıplar meydana gelir. İnsanlar üzerindeki çalışmalarda, uzun zaman periyotlarında içme sularındaki farklı Mn konsantrasyonlarında, CMnP ve sudaki Mn konsantrasyonu arasındaki korelasyonun

saptanması amaçlanmıştır. Amerika’da manganın yasal konsantrasyon sınır değeri, içme sularında 0.05 mg/L olarak belirlenmiştir. Eğer bu limit aşılsa Mn (II) oksidasyon ve filtrasyon vasıtasıyla sulardan giderilmelidir.

Mn (II)’nin yüksek konsantrasyonları bakteriler için mutajenik ve toksik olabilirken, bazı mikroorganizmalar Mn oksitlenmesi ve onu indirgeme kabiliyetine sahip olabilir. Mn indirgenmesi açık bir şekilde mangan oksidin bir elektron alıcı olarak kullanıldığı zaman enerji üretimi için amaçlanabilir.

3.4. Biyolojik Mangan Oksitin İlk Çalışmaları

3.4.1. Mangan Okside Eden Bakterilerin İzolasyonu

1901’de D.D. Jackson, bakteriyel olaylar sayesinde Mn çökmesi üzerine bir makale yayınladı. O zamandan beri Mn oksitleyen bakteriler, toprak ve tortu içeren tüm yerlerden izole edilmiştir. Fakat biz hala Mn oksidin doğası üzerine onun yararları, amaçları ve mekanizmasının ne olduğuna dair çok az bir bilgiye sahibiz.

3.4.2. Mn (II) Oksidasyonu ve Enerji

M.W. Beijerinck konu üzerine bir makale yayınladığı zaman, Mn (II) oksidasyonunda bir enerji kazanımı olduğunu göstermeye çalışıyordu. Termodinamiksel olarak, bu basit bir konu değildir. Gerçekleşen kesin bir reaksiyon ve üretimin doğası dikkate alınması gereken bir faktördür. Oksidasyon mekanizmasının bilinmeyişiinden dolayı gerçekte meydana gelen reaksiyon türünü aydınlatmanın kolay bir yolu yoktur. Biyolojik Mn (II) oksidasyonunun üretimi, iyi tanımlanamayan farklı oksitler ve oksihidroksitlerin bir karışımıdır. Fakat, oksijenin gerekli olduğunu, reaksiyonun yüksek pH’da hızlandığını ve MnO’nin basit bir üretim olduğunu farzederek bu reaksiyonu kullanabiliriz;



Yapılan ilk çalışmaların çoğu Fe ve Mn biriktiren bakterileri oluşturan kılıf (*Leptothrix discophora*) üzerine odaklanan konuların incelendiğini göstermektedir. Bu organizma genellikle aerobik-anaerobik ara yüzlü olan habitatlarda ve geniş Fe ve Mn çöktelleri toplayan habitatlarda oluşur. Bu organizmada Mn ototrafisi literatüründe birkaç rapor bulunmaktadır.

Daha sonraki çalışmalarda, ortamda Mn (II) varlığının aslında *L.discophora*'nın büyümesini inhibe ettiğini göstermiştir. Ve şu anda bu türün ototrofik büyüme yeteneğine sahip olduğu varsayımını destekleyen hiçbir veri bulunmamaktadır. Kepkay ve Nealson (1987) *Pseudomonas* izolatını bir kemostatta yalnızca enerji kaynağı olarak Mn (II) ve bikarbonattan başka herhangi bir karbon kaynağı olmadan büyötmüştür.

3.4.3 Bakteriyel Mn (II) Oksidasyonunun Endüstriyel Yönleri

Daha önce belirtildiği gibi, Mn (II) oksidasyonu modern endüstride pek çok etkiye sahip önemli bir süreçtir. Bazı durumlarda, Mn'nin bakteriler tarafından biyolojik olarak oksidasyonu söz konusu sanayide pratik sonuçlar doğurur.

3.4.3.1. Tarım

Bitkiler tarafından çözünür iyon bulunduğu için Mn (II)'nin toprak tarafından okside olduğu daha önce belirtilmiştir. 'Mangan Eksikliği'manganın bol miktarda oluşabileceği ve sağlıklı büyüme için gerekli olmayan miktarda bitki için mevcut olmadığı bir durumdur. Mn eksikliği genelde, topraktaki bakteri ve fungal Mn (II) oksidasyonunun bir sonucudur. Mn ayrıca bitkilerin hastalık duyarlılığında önemli bir rol oynar. Yulaflarda gri leke ve bezelyelerde bataklık lekelerinin gelişimi, Mn eksikliğinden kaynaklanır ve toprağa Mn (II) eklenerek iyileştirilebilir.

3.4.3.2 İçme Suyu Arıtımı

Zemin suyundaki bakteri Fe ve Mn (II) oksidasyonu genellikle oksit çökeltilerinin varlığına neden olur. Bazı durumlarda su, içme için uygun olmaz. Jackson (1901) tarafından bu durumlara uygun iki durum tanımlandı; Togel gölü su kaynakları ciddi biçimde kirlenmişti ve Maas nehrinde aynı şekilde kirlilik içeriyordu. Daha az ciddi vakalarda, sudaki Mn çökeltilerinin varlığı, yıkanan giyim ve sıhhi tesisat demirbaşlarının boyanmasına boru hatlarının tıkanmasına neden olur. Çoğunlukla bu, çok düşük veya hatta saptanamayan Mn (II) konsantrasyonu içeren suda oluşur. Başka bir Mn (II) oksidasyonu ile ilgili problem, Mn (II) oksidasyonunun metal korozyona etkisidir. Linhardt (1994), bir hidroelektrik santralinde türbin bıçakları üzerindeki biyolojik etkiyle Mn oksitlerin çökeltilmesinin CrNi çeliğinin kutuplaşmasına neden olduğunu ve bununda klorür kaynaklı çukurlaşma korozyonuyla sonuçlandığını bildirmektedir.

Bununla birlikte, içme suyundaki bakteriyel Mn (II) oksidasyonu, fazla Mn'yi gidermek içinde kullanılır. Birçok Avrupa ülkesi kimyasal Mn (II) oksidasyonuna alternatif olarak biyolojik Mn (II) oksidasyon süreçlerini kullanmaya başlamıştır. Buralarda, su iki haftadan iki aya kadar önce büyük tanklarda havalandırılır ve daha sonra geri kazanılan çamur Mn oksitleyici bakterilerle, kum filtrelerinden süzülür. Kum taneleri su içinden geçerken Mn oksit ile kaplanır ve suda çok az Mn bırakılır. Mn (II) ayrıca su filtrelerinden geçerken oksit yüzeyinin üzerine oksitlenir.

3.4.3.3. Ra Giderimi

Mn oksitler, radyumun toksik miktarlarını sudan çıkarmak için başarıyla kullanılmıştır. Mangan oksitlerin içme suyundan uzaklaştırılmasında kimyasal olarak kullanılanlara benzer biyolojik filtreler kullanılarak veya daha iyi sonuçlar elde edilebilir. Mathur ve Dwivedy (1988) mangan oksitleri çöktüren bir Mn oksitleyici bakteri olan *Arthrobacter sp.* ile zehirli miktarlarda Mn (II) ve Ra içeren bir uranyum değirmeni atığını giderdiklerini raporlamışlardır. Neredeyse radyumun tamamı oksit tarafından uzaklaştırılmış ve sonuçta Mn (II)'nin %92'sini ve Radyumun %95'inin atık sudan uzaklaştırıldığı tespit edilmiştir.

3.5. Biyolojik Mangan Oksidasyonu

Son yıllarda Mn (II) oksidasyon oranlarının ölçülmesi için yeni tekniklerin tanıtılması ve moleküler biyolojik tekniklerin alana uygulanması, yeni heyecan verici bulgularla sonuçlanmıştır.

3.5.1. Ortamdaki Mn Oksidasyonunun Ölçülmesi

Radyoizotop ^{54}Mn 'yi ve sadece oksitlerin yüzeyine bağlı olan gerçekten oksitlenmiş Mn (IV) ve değiştirilebilir Mn (II) arasında ayrım yapabilen bir teknik kullanarak, Mn (II) oksidasyon oranı ölçülmüştür. Bazı ortamlarda bakteriyel aracılı oksidasyon oranı MnO_2 koloidal yüzeyinde otokatalitik Mn (II) oksidasyonu için hesaplanandan 5-6 kat kadar daha hızlıdır. Bu bulgu ve ferromangan mineralleri içeren hemen her ortamda Mn oksitleyici organizmaların bolluğu, Mn ve diğer iz metallerin jeokimyasal döngüsünde bu biyolojik işlemin önemini gösterir.

3.5.2. *Leptothrix Discophora*

Bir aksenik kültür olarak yetiştirildiğinde, bakteri oluşturan kılıfın ortak bir özelliği, kılıf oluşturma yeteneğini kaybetme eğilimleridir. *L.discophora* SS1, bu tür spontan bir mutanttır. Bu mutantın ortam içine Mn (II) oksitleyici protein salgılandığı bulunmuştur. Bu proteinin, vahşi tipli türdeki kılıf içine dahil edildiğine inanılmaktadır. Protein ağırlığı ~110.000 daltona eşittir ve Mn oksitleyici aktivitesi siyanür, azid, 0-fenontrolin, civa klorür ve pronaz tarafından inhibe edilir. Bu protein, ortamdan ona karşı bir antikor yükseltmek için yeterli miktarda izole edilir ve saflaştırılır. Bu antikor, bir çalışmada bir klonu izole etmek için kullanılmıştır ve varsayılan bir Mn oksitleyici protein kodlayıcı gen mof-A tanımlanmıştır.

3.5.3 *Bacillus* SG-1

Sucul *Bacillus* türü SG-1'in olgun, sabit sporları (fakat vejetatif olmayan hücreler) Mn (II)'yi bağlar ve oksitler. Van Waasbergen ve diğerleri (1993) Mn (II) oksidasyon mekanizmasını sporlar ile inceleyerek genetik bir yaklaşım kullanmışlardır. Transpozan mutajenezini kullanarak 27 bağımsız, oksitleyici olmayan fakat yinede sporlaşan SG-1 mutantlarını izole ettiler. Sınırlama analizi ve bu mutantların sekanslanması, kromozomun (Mnx bölgesi olarak adlandırılan) bir bölgesi içindeki eklerin 17'sini lokalize etmiştir.

3.5.4. *Pseudomonas putida* MnB1

Pseudomonas putida MnB1, bir su boru hattındaki mangan çökeltilerinden, Schweisfurth (1973) tarafından izole edilen, taze su gram-negatif bir bakteridir. İlk olarak Schweisfurth tarafından *P. manganoxidans* olarak isimlendirildi. Ancak daha sonra basitçe *Pseudomonas* sp. olarak yeniden sınıflandırıldı ve sadece son zamanlarda bir *Pseudomonas putida* türü olduğu ileri sürüldü. Çok benzer *Pseudomonas* türleride topraktan ayrıştırılmıştır.

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada DePalma, mangani oksitleme yeteneğinin *Pseudomonas putida* türünde ortak bir özellik olarak görüldüğünü kanıtlamıştır. Biyolog sistemini kullandı ve geçmişte literatürde *Pseudomonas* olmayanlar olarak tanımlanan mangan oksitleyici türlerin bazılarının da florasan *Pseudomonas* olabileceğini buldu.

Jung ve Schweisfurth (1979), MnB1 türünün hücresiz ekstraktlarında çözünebilir bir proteinle Mn (II) oksidasyonunu rapor ettiler ki bunlar durağan fazın başlangıcında katalizsiz olarak başladı ve reaksiyonda O₂ gerektirmedi.

Mn (II) oksidasyonunu uyarmak için hücrelerin Mn (II) oksidasyon analizlerinden 2 saat önce aç bırakılması gerekti. Bu konu daha önce farklı Mn oksitleyici bakterilerle gösterilmiştir. Oksidasyon sadece hücresiz ekstraktların çözünür fraksiyonunda saptanmıştır, bu da proteinin sitoplazmik veya periplazmik olduğunu göstermektedir. Başlangıçta Schweisfurth tarafından yapılan testler DePalma (1993) tarafından tekrarlanmış ve sonuçlar biraz farklı çıkmıştır. DePalma oksidasyon için oksijenin gerekli olduğunu ve proteinin enzimatik davranışa işaret eden bir katalitik aktivite gösterdiğini bulmuştur. DePalma ayrıca Mn (II) oksidasyon aktivitesinin tercihen çoklu besleyici veya glikoz açlığı ile uyarıldığını ortaya çıkarmıştır (Caspi, 1996).



4. TEPKİ YÜZEY METODU

4.1. Tepki Yüzey Metodu

Tepki Yüzey Metodu (Response Surface Methodology) ya da TYM (RSM), problemlerin modellenmesi ve analizlenmesi için faydalı matematiksel ve istatistiksel tekniklerin toplamıdır. Bu yöntem, birden fazla faktörün etkilediği birkaç tepkinin optimum değeri alması için optimizasyon yapabilmektedir. Tepki Yüzey Metodu 3 aşamadan (dizayn ve deneyler, tepki yüzey modelleme ve işlemin veya ürünün optimizasyonu) oluşmaktadır (Gönen ve Aksu, 2009). Yöntem ilk kez Box ve Wilson tarafından 1951’de ortaya atılmıştır. Örneğin bir prosesin verimini maksimum yapacak x_1 ve x_2 ’nin seviyelerini bulmak amacıyla proses verimi x_1 ve x_2 ’nin bir fonksiyonu olarak şu şekilde ifade edilebilir:

$$y = f(x_1, x_2) + \epsilon \quad (4.1.)$$

Burada ϵ tepkide gözlenmiş olan hatayı ifade eder. Eğer beklenen tepki $E(y) = f(x_1, x_2) = \eta$ olarak belirtilirse, tepki yüzeyi olarak ifade edilen yüzey şu şekilde gösterilir:

$$\eta = f(x_1, x_2) \quad (4.2.)$$

Tepki yüzeyler, genelde grafiksel olarak gösterilmektedir. Tepki yüzeyin şeklini görselleştirmeye yardım etmek için tepki yüzeyin kontur eğrileride çizilir. Kontur eğrisinde sabit tepkinin hatları x_1 ve x_2 düzleminde çizilir. Her bir kontur, tepki yüzeyin belirli bir yüksekliğine tekabül eder.

Çoğu tepki yüzey metodu problemlerinde tepki ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkinin şekli belirsizdir. Tepki yüzey metodunda ilk adım, tepki (y) ve bağımsız değişkenler seti arasındaki gerçek fonksiyonel ilişki için uygun bir yaklaşım bulmaktır. Genelde bağımsız değişkenlerin bazı bölgelerinde düşük dereceli bir polinom kurulur. Eğer tepki bağımsız değişkenlerin lineer bir fonksiyonuyla modellenmişse, yaklaşım fonksiyonu aşağıdaki eşitlikte verildiği gibi birinci derece bir modeldir.

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \epsilon \quad (4.3.)$$

Burada; y, Bağımlı değişken; $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$, Bağımsız değişken; β_0 , Sabit değer; $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \dots, \beta_n$, Regresyon katsayıları olarak ifade edilmektedir.

Eğer sistemin tepki yüzeyinde bir eğrilik varsa, ikinci derece bir model gibi yüksek dereceli bir polinom kullanılmalıdır. İkinci dereceden model ise aşağıdaki eşitlik ile ifade edilmektedir:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \epsilon \quad (4.4.)$$

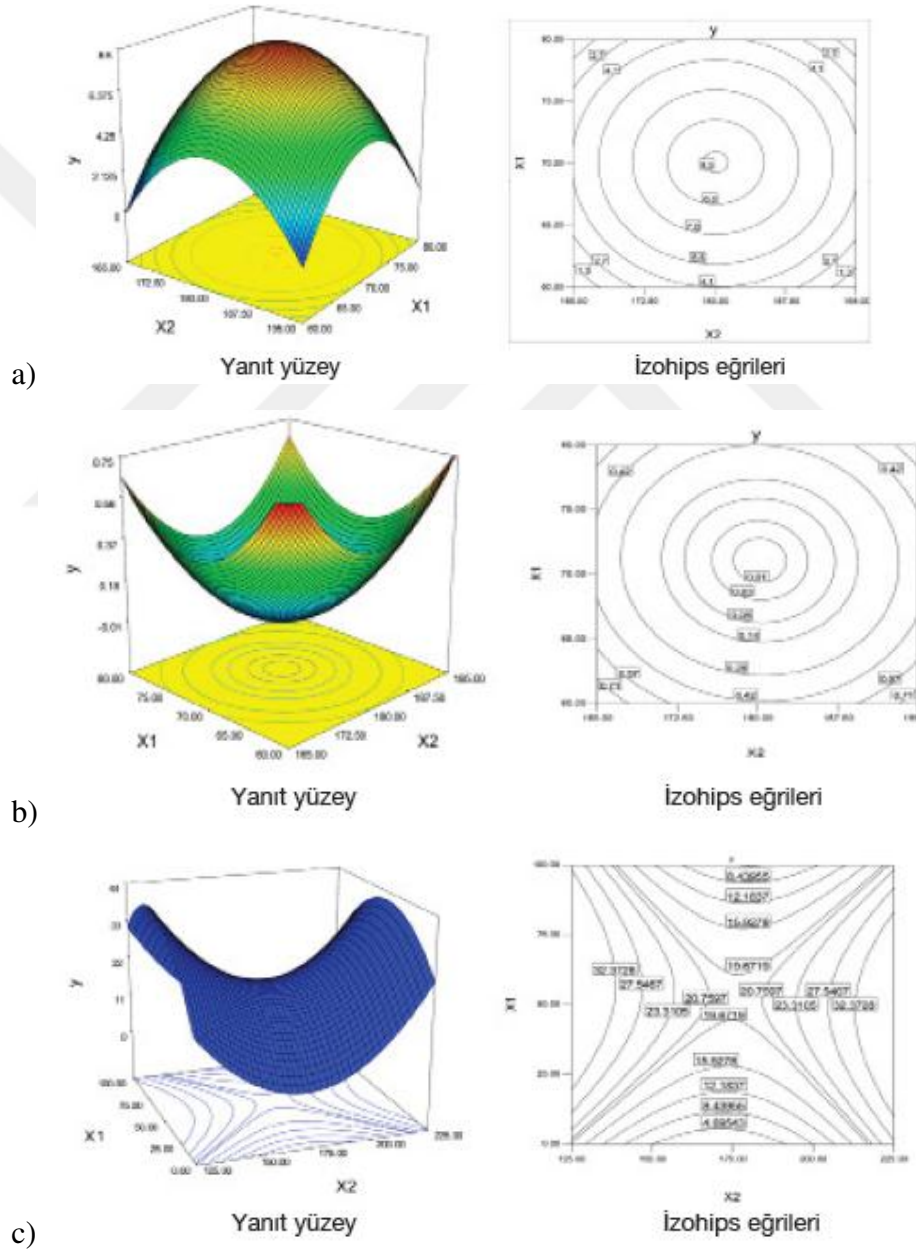
Çoğu tepki yüzey metodu problemlerinde bu modellerin her ikisi ya da biri kullanılır. Polinom model, bağımsız değişkenlerin tam boşluğu üzerinde gerçek fonksiyonel ilişkinin tam bir yaklaşımı değildir, fakat nispeten küçük bölgeler için genelde çok iyi çalışır.

En küçük kareler metodu, yaklaşım polinomlarında parametreleri hesaplamak için kullanılmaktadır. Daha sonra uyum yüzeyi kullanılarak tepki yüzey analizleri gerçekleştirilir. Eğer uyum yüzeyi gerçek tepki fonksiyonunun uygun bir yaklaşımı ise, uyum yüzeyinin analizi gerçek sistemin analizi için uygun bir denkliktir. Eğer verileri toplamakta uygun deneysel yöntemler kullanılmışsa model parametreleri çok verimli bir şekilde hesaplanabilir (Montgomery, 2009).

Tepki yüzey yöntemi uygulaması için üretilmiş çoğu paket program ikinci dereceden polinom model kullanmaktadır. İkinci dereceden polinom bir modelde sadece bir tane bölgesel minimum veya bölgesel maksimum noktası olduğu için optimizasyon çalışmasında ikinci dereceden polinom bir model kullanımı kolay bir yaklaşımdır. Eğer ikinci dereceden bir modele uygun değilse yanıtın veya bağımsız değişkenlerin transformasyonu yapılarak veya bağımsız değişkenlerin aralıkları uygun bir şekilde değiştirilerek yanıtın eğiliminin bu model ile açıklanması sağlanmalıdır. Biyokimyasal proseslerde sıcaklığın etkisi simetrik veya simetrik olmayan çan şeklindeki eğrilerle açıklanabilmektedir. Özellikle simetrik olmayan eğriler için, sıcaklığın etkisini ikinci dereceden polinom bir model ile açıklamak mümkün değildir.

Tepki yüzey metodunda çizilen her bir izohips eğrisi, bir bağımsız değişken merkezdeyken, diğer iki değişkenin sonsuz sayıdaki kombinasyonlarını vermektedir. Katsayılarla bağlı olarak izohips eğrilerinin dairesel, eliptik ya da eğer şeklinde olması; maksimum nokta, minimum nokta, (eyer noktası (saddle point)) durgun tepe ya da yükselen/azalan tepe koşullarını verebilmektedir. Maksimum nokta, minimum nokta ve

eyer noktası için tepki yüzey grafikleri ve izohips eğrileri sırasıyla Şekil 4.1. (a-c)'de gösterilmiştir. Tepki yüzeyinin dairesel olması, değişkenler arasındaki etkileşimin ihmal edilebilir olduğunu, elips ya da eyer şeklindeki yüzeyler iç etkileşimin önemli olduğunu göstermektedir. En küçük elips ya da dairesel şekil ile sınırlandırılmış yüzey, öngörülen en yüksek veya en düşük yanıtı belirtmektedir. Ancak bu yaklaşım çok sayıda bağımlı ve bağımsız değişkenin (dört veya daha fazla) bir arada incelendiği durumlar için kullanışlılığını kaybetmektedir. Ayrıca, tepkilerin çok farklı skalaya sahip olması aynı grafik üzerinde gösterilmelerini de zorlaştırmaktadır (Koç ve Kaymak-Ertekin, 2009).



Şekil 4.1.a. Maksimum nokta için tepki yüzey grafiği ve izohips eğrileri b. Minimum nokta için tepki yüzey grafiği ve izohips eğrileri c. Eyer noktası için tepki yüzey grafiği ve izohips eğrileri

4.2. Deney Sayısının ve Model Katsayıların Hesaplanması

Deney tasarımı yapılırken kaç deney yapılacağı aşağıdaki denklemlerle hesaplanır,

$$N = 2^k + 2k + n_0 \quad k < 5 \quad (4.5.)$$

$$N = 2^{k-1} + 2k + n_0 \quad k > 5 \quad (4.6.)$$

N = Deney sayısı

k = Bağımsız değişken sayısı

n_0 = Merkezdeki deney sayısını ifade eder.

Bağımsız değişken düzeyleri (α)'de Eşitlik 5.7. ve 5.8. yardımı ile hesaplanır.

$$\alpha = 2^{k/4} \quad k < 5 \quad (4.7.)$$

$$\alpha = 2^{(k-1)/4} \quad k > 5 \quad (4.8.)$$

Bağımsız değişkenler kullanılarak, n tane gözlenen verinin gösterimi aşağıdaki gibidir.

$$\begin{pmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & x_{11} & x_{12} & \cdots & x_{1k} \\ 1 & x_{21} & x_{22} & \cdots & x_{2k} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & x_{n1} & x_{n2} & \cdots & x_{nk} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \beta_0 \\ \beta_1 \\ \vdots \\ \beta_k \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \varepsilon_0 \\ \varepsilon_1 \\ \vdots \\ \varepsilon_n \end{pmatrix} \quad (4.9.)$$

$$y = X\beta + \varepsilon$$

β katsayı vektörü, en küçük kareler farkı yöntemi kullanılarak elde edilen yukarıdaki eşitlik ile hesaplanır.

4.3. Tepki Yüzey Metodu (TYM) için Kullanılan Tasarım Modelleri

Tepki yüzey metodu; tepki (response) değişkenine etki eden çok sayıda değişkenin olması durumunda; problemlerin analiz edilmesinde kullanılan istatistiksel tekniklerin ve matematiksel ifadelerin birleşimidir. Yeni ürünün formülasyonunda, var olan ürün tasarımının iyileştirilmesinde, süreç tasarımında, sürecin geliştirilmesinde ve iyileştirilmesinde yaygın olarak kullanılır. Tepki yüzey metodu için kullanılan tasarım modelleri Doehlert Matrix (DM), Merkezi Bileşke Tasarımı (CCD: Central composite design) ve üç boyutlu dizayn modeli olan Box-Behnken tasarımı (BBD)'dir. Ancak ikinci

dereceden modeller içermesi ve üç boyutlu grafikler çizilebilmesi nedeniyle CCD ve BBD tasarımları daha çok kullanılmaktadır.

CCD merkezi bileşke tasarımında, yüksek ve düşük değerler arasında değişen bağımsız değişken değerleri vardır. Yönteme uygunluk açısından, bağımsız değişkenler -1 ve +1 arasında değişmelidir. Bunun için en küçük değer -1 ve en büyük değer +1 olarak tanımlanır. Orta değer olarak ise 0 değeri alınır. Bir merkezi bileşke tasarımı, -1 ve +1 aralığında değişen bir kübün köşelerinde küp noktaları, kübün dışında yıldız noktaları ve orijinde merkez noktaları içermektedir (Erşan, 2011).

4.4. Regresyon Analizi

Tepki değişkeni veya bağımlı değişken olarak tanımlanan “y” ve bağımsız değişken veya regresör olarak tanımlanan n adet “ $x_1, x_2 \dots x_n$ ” arasındaki sebep sonuç ilişkisini matematiksel olarak ortaya koyan yönteme regresyon analizi denilmektedir. Regresyon analizi sonucunda bağımlı değişken bağımsız değişken cinsinden ifade edilerek, bir eşitlik elde edilmekte ve farklı olaylar ile ilgili tahminler yapılabilmektedir.

4.4.1. Bağımlı Değişken

Tepki değişkeni veya yanıt olarak da adlandırılmaktadır. Çalışmada elde edilen parasetamol giderimi bağımlı değişken olarak değerlendirilmektedir.

4.4.2. Bağımsız Değişken

Regresör olarak ta tanımlanan, bağımlı değişken üzerinde etkisi olan değişkenlerdir. Çalışmada katı substrat, amonyum sülfat ve maya özütü konsantrasyonları bağımsız değişken olarak değerlendirilmektedir.

Regresyon analizi sonucu elde edilen fonksiyon istatistiksel bir fonksiyon olduğundan her x değerine karşılık gelen y değeri aynı olmayıp regresyon denklemi ile elde edilen değer etrafında yer alan ve normal dağılıma benzer dağılım gösteren değerleri içerebilmektedir. Bu nedenle regresyon analizi sonucunda bulunan denklemin geçerliliği belirli bir güven aralığında ifade edilmektedir. Çalışmada kullanılan güven aralığı ise % 95 ($\alpha=0.05$) olarak belirlenmiştir.

4.4.3. F- Testi

Normal dağılıma sahip iki kitlenin standart sapmalarının eşit olduğu hipoteze denilmektedir. Standart sapmaların eşit olması halinde iki kitle karşılaştırılabilmektedir.

p-değeri

H_0 : Model uygundur

H_1 : Model uygun değildir

Hipotezler tanımlandığında H_0 hipotezinin reddedilmesini sağlayan en küçük anlamlılık seviyesine p-değeri denilmektedir. İstatistiksel değerlendirmede modelin ortaya çıkardığı parametrelerin modele olan katkısının anlamlı veya anlamsız olarak değerlendirilmesinde kullanılan bir değerdir.

4.4.4. Anova

Regresyon modelinin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını değerlendirmek amacıyla kullanılan tabloya denilmektedir. Bu tabloda yer alan F-değeri modelin açıkladığı değişimin (modelin kareler toplamı) açıklanamayan değişime (hataların kareler toplamı) oranı olmaktadır. ANOVA tablosunda $p < 0.05$ olması durumunda kurulan modelin anlamlı olduğu anlaşılmaktadır.

Korelasyon katsayısı olarak ifade edilen R, bağımlı değişken ile bağımsız değişken arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Bu değer -1...+1 arasında değişmekte olup bağımlı değişken ile bağımsız değişken arasında +1'e yakın bir korelasyon olması istenen bir durumdur. R^2 ise kurulan modelde bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkeni ne kadar açıkladığını yüzde olarak ifade etmektedir. Her ne kadar R^2 modelin açıklanma yüzdesini ifade etse de modele katkısı olmayan terimlerin modelden çıkartılmasıyla daha doğru bir sonuç elde edilir. Elde edilen yeni R^2 değerine ise düzeltilmiş R^2 denilmektedir. Tahmin Edilen R^2 ise modelin yeni olayları tahmin edebilme yeteneğini gösteren bir değer olmaktadır.

PRESS değeri ise (Predicted Error Sum of Squares) modelin tahmin hatalarının bir ölçüsü olarak değerlendirilmektedir. Modelde seçilen bir deney noktası için tahmin edilen değer $\hat{y}_i$ olmak üzere o nokta için bulunan tahmin hatası $e = y_i - \hat{y}_i$ olarak bulunmaktadır. n tane ölçüm noktası için oluşan PRESS değeri ise;

$$PRESS = \sum_{i=1}^n e_i^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (4.10.)$$

olmaktadır. Model seçilirken bu değerin küçük olması istenmektedir.

4.4.5. Uyum Eksikliği (Lack of Fit)

Seçilen modelin uygunluğunu belirlemek amacıyla yapılan teste uyum eksikliği denilmektedir.

H_0 : Model uygundur

H_1 : Model uygun değildir

Hipotezler tanımlandığında elde edilen F-değeri F-tablosunda yer alan değerden büyükse H_0 hipotezi reddedilir. Bu durumda başka bir model seçilmelidir. Uyum eksikliğinin önemli olması istenmeyen bir durum olduğundan uyum eksikliği tablosunda en yüksek p-değerine sahip olan model seçilmelidir.

4.4.6. Artık Analizi

Regresyon analizi ile elde edilen modelin ortaya çıkardığı hata terimleri analiz edilerek modelin tahminlemede kullanılıp kullanılmayacağına karar verilir. Modelden elde edilen hataların dağılımı normal dağılıma uygun olmalıdır. Söz konusu hatalar normal dağılıma uygun bir dağılım gösteriyorsa oluşturulan model tahminlemede kullanılabilecektir (Beyazıt ve Oğuz, 1998; Şen, 2002; Demiryürek, 2009).

5. MATERYAL VE METOT

5.1. Mikroorganizma ve Büyüme Şartları

Bu çalışma boyunca, biyojenik mangan oksitlerin üretimi için National Center for Agricultural Utilization Research (Microbial Genomics & Bioprocessing Research Unit, Illinois, USA)'den temin edilen NRRL B-14878 kodlu *Pseudomonas putida* bakterisi kullanılmıştır. Liyofilize halde getirilen bakteri kültürü ilk olarak, patates dekstroza agarda 30 °C'deki etüvde aktive edilmiş ve daha sonra mikroorganizma büyüme ortamına (zenginleştirme ortamı) aktarılmıştır. Büyüme ortamının içeriği Tablo 5.1.'de verilmiştir. 20 dakika boyunca 121 °C'de otoklavlama ile steriltenip üretime hazırlanan zengin besi ortamına 1/10 oranında bakteri aşılınmış, üretim, 100 mL çalışma hacmine sahip 250 mL'lik erlenlerde, pH=7, 30 °C sıcaklıkta ve 100 rpm hızındaki çalkalayıcılarda gerçekleştirilmiştir. Bu besi ortamında üretilen bakteri kültürü daha sonra biyojenik mangan oksit üretim ortamına (1: 10 oranında) aktarılmıştır.

Tablo 5.1. *P. putida* 'nın üretimi için seçilen zengin besi ortamı bileşimi

Bileşen	Miktar (g/L)
Glukoz	3.0
Pepton	2.0
Maya özütü	2.0
KH ₂ PO ₄	1.0
K ₂ HPO ₄	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.05

5.2. Biyojenik Mangan Oksit Üretimi

Biyojenik mangan oksit üretimi çalışmalarında Boogerd ve de Vrind (1987) tarafından tarif edilen besi ortamı kullanılmış ve bileşimi Tablo 5.2.'de verilmiştir. Biyojenik mangan oksit üretimi 100 mL çalışma hacminde 250 mL'lik erlenlerde yürütülmüştür. Zengin besi ortamında 24 saat boyunca üretilen bakteri kültürü biyojenik mangan oksit üretim ortamına 1: 10 oranında aktarılmış ve erlenler 28 °C ve 150 rpm'de 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra MnCl₂ ile hazırlanan Mn (II) stok çözeltisinden istenen miktarda eklenmiştir. Bakterilerin Mn'e adaptasyonu, mikrobiyal aktiviteyi arttırmak için önemli bir işlemdir. Bu doğrultuda, *P. putida* 'nın Mn (II)'a alıştırılması

aşamalı olarak bir dizi deney ile gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, biyogenik mangan oksit üretim ortamı hazırlanmış ve bakteri kültürü bu ortama aktarılarak 28 °C’de inkübe edilmiştir. 24 saat sonra Mn (II) (nihai konsantrasyon 1 mg/L) eklenmiş ve inkübasyona devam edilmiştir. Mn (II), ortamda kahverengi parçacıklar olarak görülen biyogenik mangan okside oksitlenmiştir. İkinci aşamada, 1 mg/L Mn içeren ortamda inkübe edilen kültür, hazırlanan biyogenik mangan oksit üretim ortamına 1/10 oranında aktarılmış, 24 saatlik inkübasyondan sonra, Mn (II) (nihai konsantrasyon 2 mg/L) ilave edilmiş ve inkübasyona devam edilmiştir. Mn konsantrasyonu aynı şekilde arttırılmaya devam edilmiş Mn (II) konsantrasyonundaki artışla, oksitlenmiş Mn konsantrasyonu artmış ve böylelikle bakteri mangana alıştırılmıştır.

Tablo 5.2. Biyogenik mangan oksit üretimi çalışmalarında kullanılan besin ortamı

Bileşen	Miktar	Sterilizasyon
Maya ekstraktı	500 mg/L	Otoklavlama
Glukoz	900 mg/L	Otoklavlama
CaCl ₂ .2H ₂ O	141 mg/L	Otoklavlama
MgSO ₄ .7H ₂ O	409 mg/L	Otoklavlama
FeCl ₂ .4H ₂ O	2 mg/L	Otoklavlama
HEPES tampon	2383 mg/L	Filtre ile sterilizasyon
Casamino asit	500 mg/L	Filtre ile sterilizasyon
İz element çözeltisi	1 mL/L	Filtre ile sterilizasyon
İz element çözeltisi bileşenleri:		
CuSO ₄ .5H ₂ O	10 mg/L	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	44 mg/L	
CoCl ₂ .6H ₂ O	20 mg/L	
NaMoO ₄ .2H ₂ O	13 mg/L	

5.3. Kesikli Deneyler

pH'in Mn'nin oksidasyonu üzerindeki etkisi, 6 ila 8 arasındaki pH birim aralıklarında, 28 °C’de ve 10 mg/L başlangıç Mn (II) konsantrasyonunda değiştirilerek araştırılmıştır. Başlangıç pH’ını ayarlamak için H₂SO₄ ve NaOH kullanılmıştır. Sıcaklığın Mn (II)’nin oksidasyonu üzerindeki etkisi de 23, 28 ve 40 °C’de, pH 7’de ve 10 mg/L başlangıç Mn (II) konsantrasyonunda belirlenmiştir. Başlangıç Mn (II) konsantrasyonunun Mn (II) oksidasyonu üzerindeki etkisini belirlemek için, bir dizi Mn (II) oksidasyon deneyi, 28 °C’de pH 7’de, 5 ila 100 mg/L arasında değişen altı farklı Mn (II)

konsantrasyonunda gerçekleştirilmiştir. 10 mL'lik numuneler, belirli zamanlarda alınmıştır ve 5 dakika boyunca 5000 rpm'de santrifüjlenmiştir.

5.4. İki Adımlı Ekstraksiyon

CuSO₄ ve hidroksilamin hidroklorür çözeltileri kullanarak iki adımlı ekstraksiyon uygulanmıştır. Bu ekstraksiyon dizisi, biyojenik mangan oksitlerde sorplanmış ve oksitlenmiş Mn (II)'nin ayrılması için kullanılmıştır. 10 mL sıvı kültür alınmış ve 5 dakika 5 000 rpm'de santrifüjlenmiş, durusu, 0.22 µm PTFE bir filtreden süzölmüş ve çözünmüş Mn (II) konsantrasyonu AAS kullanılarak ölçölmüştür. Kahverengi çökelti (mangan oksit parçacıkları ve bakteriyel kütle, biyojenik mangan oksitler), 3 kez safsu ile yıkanmış ve daha sonra 10 mL 10 mM CuSO₄ ile çözüldükten sonra bir orbital çalkalayıcıda 150 rpm'de 25 °C'de 12 saat boyunca karıştırılmıştır. Bu işlem, adsorbe edilmiş Mn (II)'nin biyojenik mangan oksitlerden ayrılması için yapılmıştır (Tani vd, 2004). Çözelti daha sonra aynı şekilde santrifüjlenmiş, süzölmüş ve filtrattaki Mn (II) konsantrasyonu, AAS'de ölçölmüştür. Ekstrakte edilen Mn (II), adsorplanmış fraksiyon olarak adlandırılmıştır. 10 mM CuSO₄ ile ekstraksiyondan sonra kalan çökelti safsu ile yıkanmış ve 10 mL 50 mM hidroksilamin hidroklorür içinde 150 rpm'de orbital bir çalkalayıcıda 25 °C'de üç saat boyunca karıştırılmıştır. Karışım 5000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiş ve 0.22 µm 'lik PTFE bir filtreden süzölmüş ve süzöntünün Mn (II) konsantrasyonu, daha önce tarif edildiği gibi bir AAS kullanılarak ölçölmüştür. Ekstrakte edilen Mn iyonları oksitlenmiş fraksiyon olarak adlandırılmıştır.

5.5. Biyojenik Mangan Oksitlerin Karakterizasyonu

Bakteri tarafından üretilen biyojenik mangan oksit; X-ışını kırınımı (XRD), Fourier Transform Infrared Spectrophotometresi (FTIR) ve Taramalı Electron Mikroskopu (SEM-EDX) ile karakterize edilmiştir. FTIR spektrumları, Thermo Scientific marka Nicolet™ İS™ 5 model cihaz ile 400-4000 cm⁻¹ arasında kaydedilmiştir. XRD deseni, Bruker marka D8 powder model bir X-ray Diffractometer ile elde edilmiştir. Yüzey morfolojisi ve tekstürü ZEISS marka EVO MA 10 model Scanning Electron Mikroskopu (SEM-EDX) ile karakterize edilmiştir. Biyojenik mangan oksit örneklerindeki manganın oksidasyon hali XPS (PHI 5000 Versa Probe) ile ölçölmüştür. XPS data analizi OriginPro (Origin2018b, deneme sürümü) kullanılarak yapılmıştır.

5.6. Parasetamol Analizi

Parasetamol analizi Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) (Shimadzu) ile gerçekleştirilmiştir. Metotta mobil faz olarak metanol/safsu/asetik asit (35/65/0.1, v/v/v) karışımı kullanılmıştır. Akış hızı 0.4 mL/dk., dedektör dalga boyu: 243 nm ve örnekleme hacmi ise 30 µL olarak ayarlanmıştır. Kolonun tipi C18 5 µm, 150x4.6 mm ve alıkonma süresi 5.31 dakikadır.

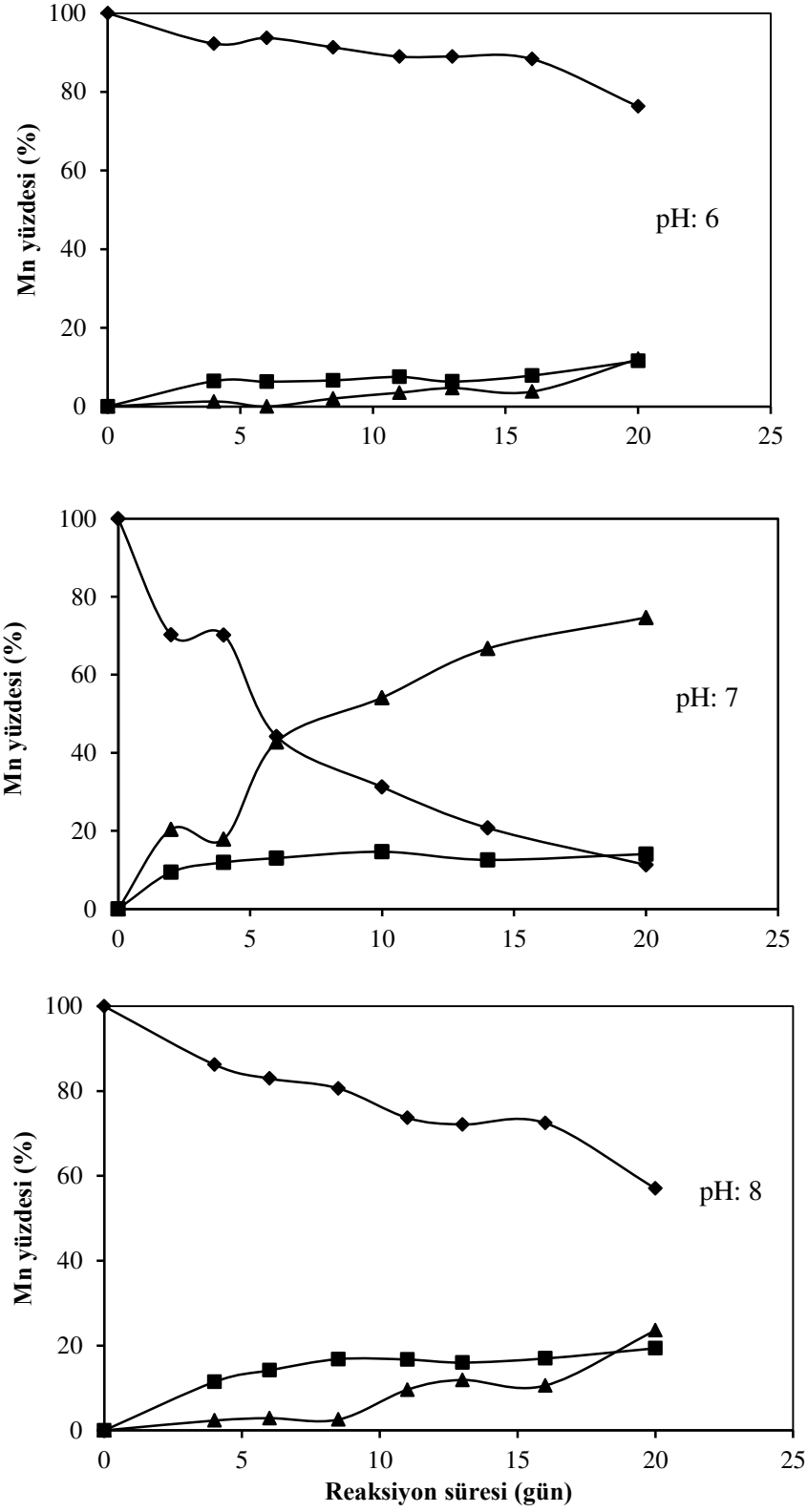


6. BULGULAR VE TARTIŞMA

6.1. *Pseudomonas putida* ile Biyojenik Mangan Oksit Üretimi

6.1.1. Biyojenik Mangan Oksit Üretimine pH'ın Etkisi

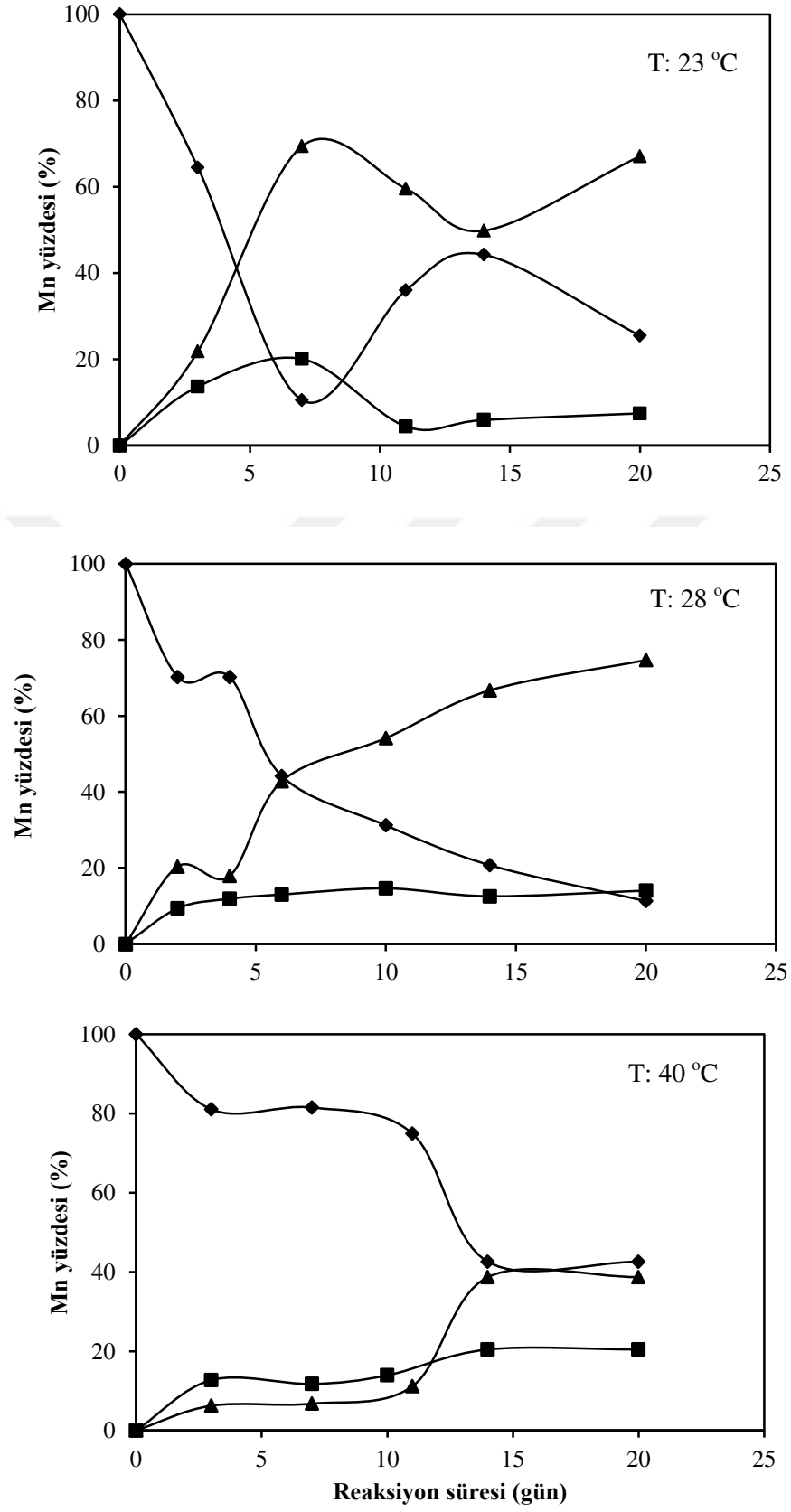
P. putida 'nin Mn (II)'ı oksidize etme yeteneği üzerine pH'ın etkisi pH 6,7 ve 8'de 28 °C'de ve 10 mg/L başlangıç Mn (II) konsantrasyonunda araştırılmıştır. Durusuda kalan, adsorbe edilen ve oksitlenen Mn (II) yüzdeleri, materyal metot bölümünde tarif edildiği gibi tespit edilmiştir. Farklı pH'ta reaksiyon süresine göre Mn (II) yüzdeleri Şekil 6.1.'de (a-c) gösterilmektedir. *P. putida*'nın Mn (II) oksitleme yeteneği farklı pH değerlerinde (6-7-8) değişiklik göstermektedir. 20 günlük reaksiyon süresinden sonra pH 6, 7 ve 8'de Mn (II) oksidasyon yüzdeleri 12.1, 74.7 ve 23.6 olarak hesaplanmıştır. 20 gün reaksiyon süresinden sonra pH 6, 7 ve 8'de durusuda kalan Mn (II) yüzdeleri 76.3, 11.3 ve 57.0 ve adsorbe edilen Mn (II) yüzdeleri ise sırasıyla 11.6, 15.5 ve 19.4'tür. Sonuçlar Mn (II)'nin biyolojik oksidasyonunun pH tarafından oldukça etkilendiğini göstermektedir. En yüksek Mn (II) oksidasyon yüzdesi pH 7'de belirlenmiştir. Mn (II) oksidasyon yüzdesi, 7.0'den küçük veya daha yüksek pH değerlerinde çok düşüktür. Bu sonuçlar Mn (II) oksitleyici enzimlerin aktivitesinin pH değerinden etkilendiğini ve nötr koşulların Mn (II) oksidasyonu için elverişli olduğunu göstermektedir. Zhang vd. (2002), *Leptothrix discophora* SS1 bakterisi ile Mn (II) oksidasyon kinetiğini araştırmışlar, Mn (II) oksidasyonu için optimum pH'ın yaklaşık olarak 7.5 olduğunu ve pH 7.5'in üzerinde Mn (II) oksidasyon oranında azalma olduğunu belirtmişlerdir. Bohu vd. (2015), asidik ve uranyum madenciliği alanından izole edilen yeni bir izolat olan *Mesorhizobium australicum strain T-GI*'in, farklı enzimatik yollar kullanarak hem asidik hem de nötr pH'ta Mn (II) 'yi oksitleyebildiğini bildirmişlerdir. Aside toleranslı bir mangan oksitleyen bakteri olan *M. australicum T-GI*'in pH'a bağlı olarak oksidasyon mekanizmalarını değiştirerek Mn (II) oksidasyonunu başlatabildiğini ve düşük pH'ın manganın biyojeokimyasal döngüsünde önemli bir rol oynayabileceğini belirtmişlerdir. Ek olarak, Larsen vd. (1999), maksimum Mn (II) oksitleyici aktivitenin pH 7'de meydana geldiğini bildirmişlerdir. pH 7'nin üzerinde ve pH 5.5'in altında, aktivitede keskin bir azalma gözlemlenmiştir.



Şekil 6.1. Farklı pH'ta reaksiyon süresine göre Mn (II) yüzdeleri (Mn kons.: 10 mg/L, T: 28 °C, KH: 160 rpm, ♦: Durusuda kalan Mn (II), ■: Adsorplanan Mn (II), ▲: Oksitlenen Mn (II))

6.1.2. Biyogenik Mangan Oksit Üretimine Sıcaklık Etkisi

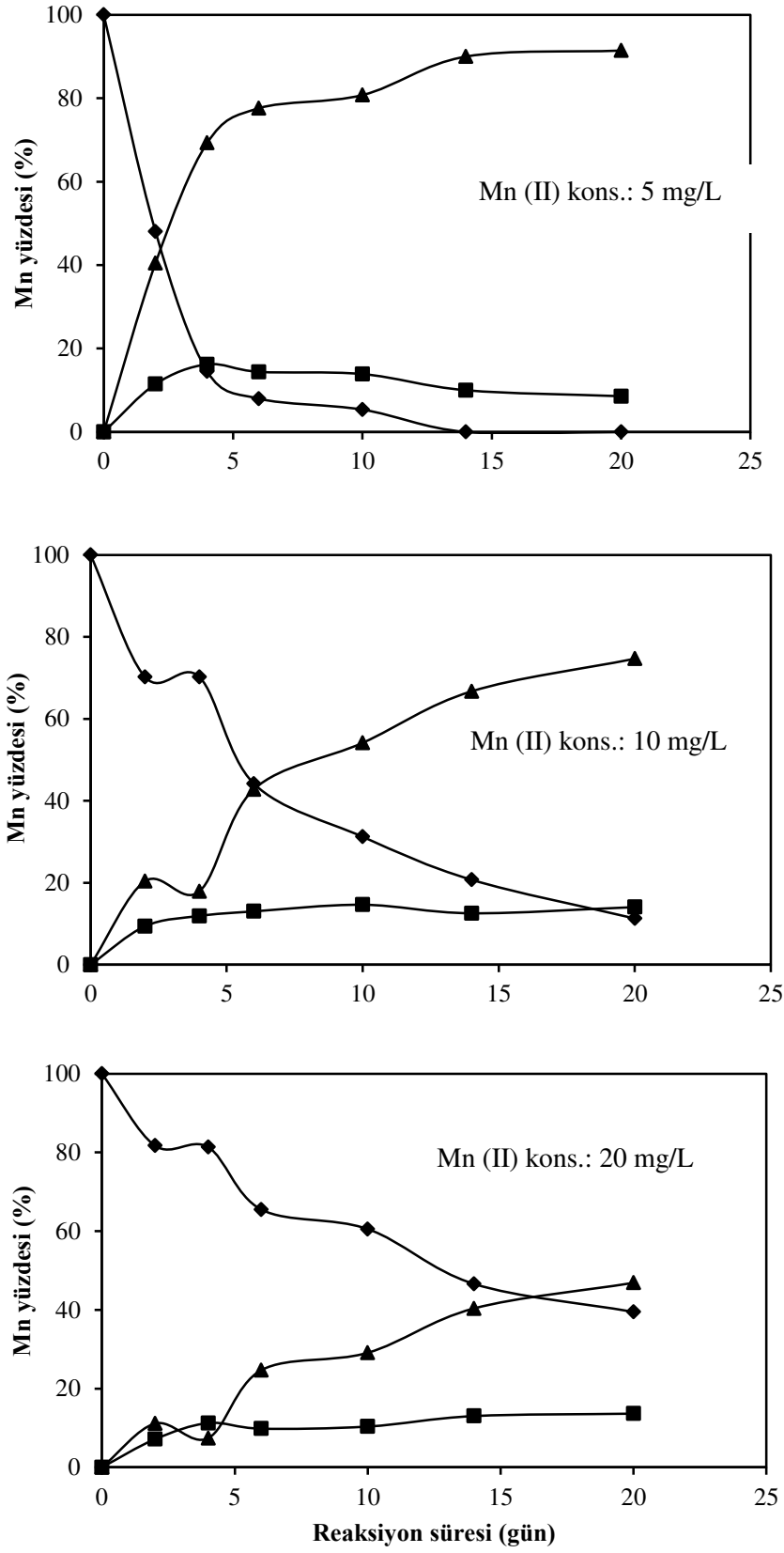
Sıcaklığın Mn (II)'nin oksidasyonu üzerindeki etkisi de 23, 28 ve 40 °C sıcaklıklarda, pH 7'de ve 10 mg/L başlangıç Mn (II) konsantrasyonunda incelenmiştir. Farklı sıcaklıklarda oksitlenmiş, adsorbe edilmiş ve durusuda kalan Mn (II) yüzdeleri, Şekil 6.2. (a-c)'de gösterilmektedir. 20 gün reaksiyon süresinden sonra 23, 28 ve 40 °C 'de Mn (II) oksidasyon yüzdeleri 67.1, 74.7 ve 38.7 iken durusuda kalan Mn (II) yüzdeleri 25.5, 11.3 ve 42.6'dır. 20 gün reaksiyon süresinden sonra 23, 28 ve 40 °C'de adsorbe edilen Mn (II) yüzdeleri 7.4, 15.5 ve 20.4 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar, *P. putida* B 1478 tarafından Mn (II)'nin oksitlenmesinin sıcaklığa karşı duyarlı olduğunu ve Mn (II) oksidasyonu için optimum sıcaklığın 28 °C olduğunu ortaya çıkarmıştır. Sıcaklık 23'den 28 °C'e arttırıldığında, Mn (II) oksidasyon yüzdesi artmıştır. Mn (II) oksidasyon yüzdesindeki artış, reaksiyonun sıcaklığa bağlı aktivasyonuna bağlanabilir (Zhang vd., 2002). 40 °C'de reaksiyonun termal deaktivasyonundan dolayı Mn (II) oksidasyon yüzdesi 38.7'e düşmüştür. Ancak, bakteri türüne bağlı olarak literatürde farklı sonuçlar elde edilmiştir. Jiang ve diğ. (2010), Mn (II)'in *P. putida* MnB1 tarafından 28 yada 30 °C'de okside edilmediğini ve mangan oksitlerin optimum 24 °C sıcaklıkta oluştuğunu belirtmiştir. Zhang vd. (2002) tarafından *L. discophora* SS1 ile Mn (II) oksidasyonu için 30 °C'lik optimal bir sıcaklık rapor edilmiştir.. Toyoda ve Tebo (2016), 58 °C'de *Bacillus sp.* SG1 tarafından Mn (II) oksidasyonunun gerçekleşmediğini bildirmişlerdir. Ek olarak, Mandernack vd., (1995) tarafından, hem kısa süreli (4 gün-2 hafta) hem de uzun süreli yaşlandırma deneyleri (1 yıla kadar), 25 ve 55 °C'de zamanla mineralojik değişimleri incelemek ve kısa veya uzun vadeli etkileri gözlemek için gerçekleştirmiştir. Mangan minerali oluşumunun sıcaklığa, Mn (II) konsantrasyonuna ve ortama (deniz suyu vs. HEPES tamponu) bağlı olduğu gösterilmiştir. Daha düşük değerlikli minerallerin yüksek Mn (II) konsantrasyonu (başlangıçta 1 mM) veya/yada yüksek sıcaklıklarda, SG-1 sporları tarafından oluşturulmuş ve daha düşük Mn (II) konsantrasyonları ve sıcaklıklarda Mn (IV) manganatlar çökelmiştir.



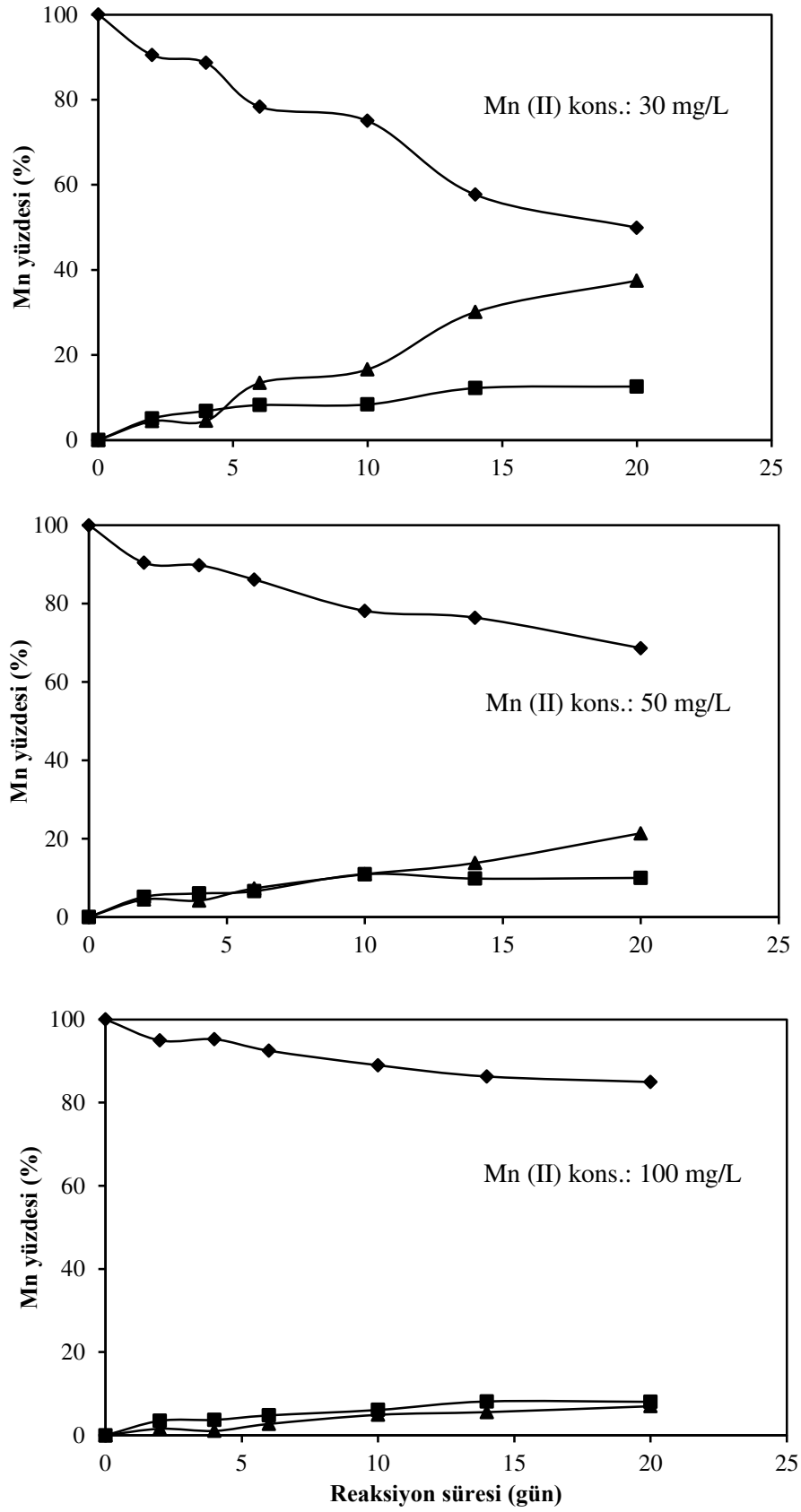
Şekil 6.2. Farklı sıcaklıklarda oksitlenmiş, adsorbe edilmiş ve durusuda kalan Mn (II) yüzdeleri (Mn kons.: 10 mg/L, pH: 7, KH: 160 rpm, ◆: durusuda kalan Mn (II), ■: Adsorplanan Mn (II), ▲: Oksitlenen Mn (II))

6.1.3. Biyogenik Mangan Oksit Üretimine Başlangıç Mn (II) Konsantrasyonunun Etkisi

Başlangıç Mn (II) konsantrasyonunun Mn (II) oksidasyonu üzerindeki etkisini belirlemek için, bir dizi Mn (II) oksidasyon deneyi, 28 °C’de ve pH 7’de, 5 ila 100 mg/L arasında değişen altı farklı Mn (II) konsantrasyonunda gerçekleştirilmiştir. Mn (II) konsantrasyonlarının bir fonksiyonu olarak zamanla durusuda kalan, adsorplanan ve oksitlenen Mn (II) yüzdeleri Şekil 6.3. (a-e)’de gösterilmiştir. 5, 10, 20, 30, 50 ve 100 mg/L Mn (II) konsantrasyonları için Mn (II) oksidasyonu yüzdeleri sırasıyla 91.4, 74.7, 46.9, 37.5, 21.4 ve 7.0 olarak belirlenmiştir. 5, 10, 20, 30, 50 ve 100 mg/L Mn (II) konsantrasyonları için durusuda kalan Mn (II) yüzdeleri sırasıyla 0, 11.3, 39.5, 49.9, 68.6 ve 84.9 olarak hesaplanmıştır. Adsorbe edilen Mn (II) yüzdeleri ise sırasıyla 8.6, 14.0, 13.6, 12.6, 10.0 ve 8.1’dir. *P. putida* B 1478, 5 mg/L başlangıç Mn (II) konsantrasyonunda Mn (II)’nin oksitlenmesinde oldukça başarılı olmuştur. Bakteriler, 5 mg/L Mn konsantrasyonunda kültür ortamındaki manganın tamamını 14 gün reaksiyon süresinde uzaklaştırmıştır. Ayrıca Mn (II) konsantrasyonlarının artması ile Mn (II) oksidasyon yüzdesinde bir azalma gözlenmiştir. Bu, Mn (II)’nin yüksek konsantrasyonlarının Mn (II) oksidasyonunu engellediğini göstermektedir. Adsorplanmış Mn (II) yüzdeleri arasında önemli bir fark yoktur. Jiang vd. (2010), yüksek başlangıç Mn (II) konsantrasyonunda Mn (II) 'nin oksidasyonunun inhibe edildiğini ve bu inhibisyonun hücre dışı tabakada mangan oksit partiküllerinin birikimi nedeniyle Mn (II)’nin yığın fazdan hücre yüzeyine kütle transferinin engellenmesinden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Tani vd. (2004), başlangıç Mn (II) konsantrasyonu 3 mM’yi aştığında KR21-2 türü ile Mn oksit oluşum hızının azaldığını ve 5 mM’den daha yüksek Mn (II) konsantrasyonunda KR21-2 türünün büyümesinin inhibe edilmemesine rağmen, mangan oksitleme aktivitesi sergilemediğini rapor etmişlerdir. 2 mM’ın altındaki Mn (II) konsantrasyonlarda mangan oksit oluşumu 72 saat içinde tamamlanmıştır. Zhou vd. (2015), başlangıç Mn (II) konsantrasyonu ile üretilen biyogenik mangan oksit miktarında oransal artış gözlemlemiştir. Zhang vd. (2002), *L. discophora* SS1 ile Mn (II) oksidasyon hızının Mn (II) konsantrasyonun artışı ile arttığını belirtmişlerdir.



Şekil 6.3. Farklı Mn (II) konsantrasyonlarında oksitlenmiş, adsorbe edilmiş ve durusuda kalan Mn (II) yüzdeleri (T: 28 °C, pH: 7, KH: 160 rpm, ◆: durusuda kalan Mn (II), ■: Adsorplanan Mn (II), ▲: Oksitlenen Mn (II))

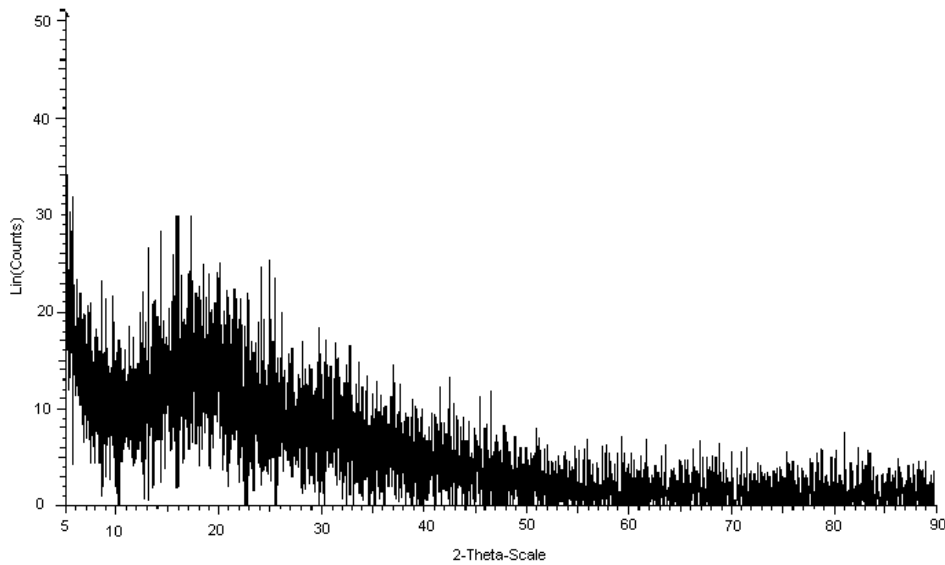


Şekil 6.3. Farklı Mn (II) konsantrasyonlarında oksitlenmiş, adsorbe edilmiş ve durusuda kalan Mn (II) yüzdeleri (T: 28 °C, pH: 7, KH: 160 rpm, ◆ : durusuda kalan Mn (II), ■ : Adsorplanan Mn (II), ▲ : Oksitlenen Mn (II)) (Devamı)

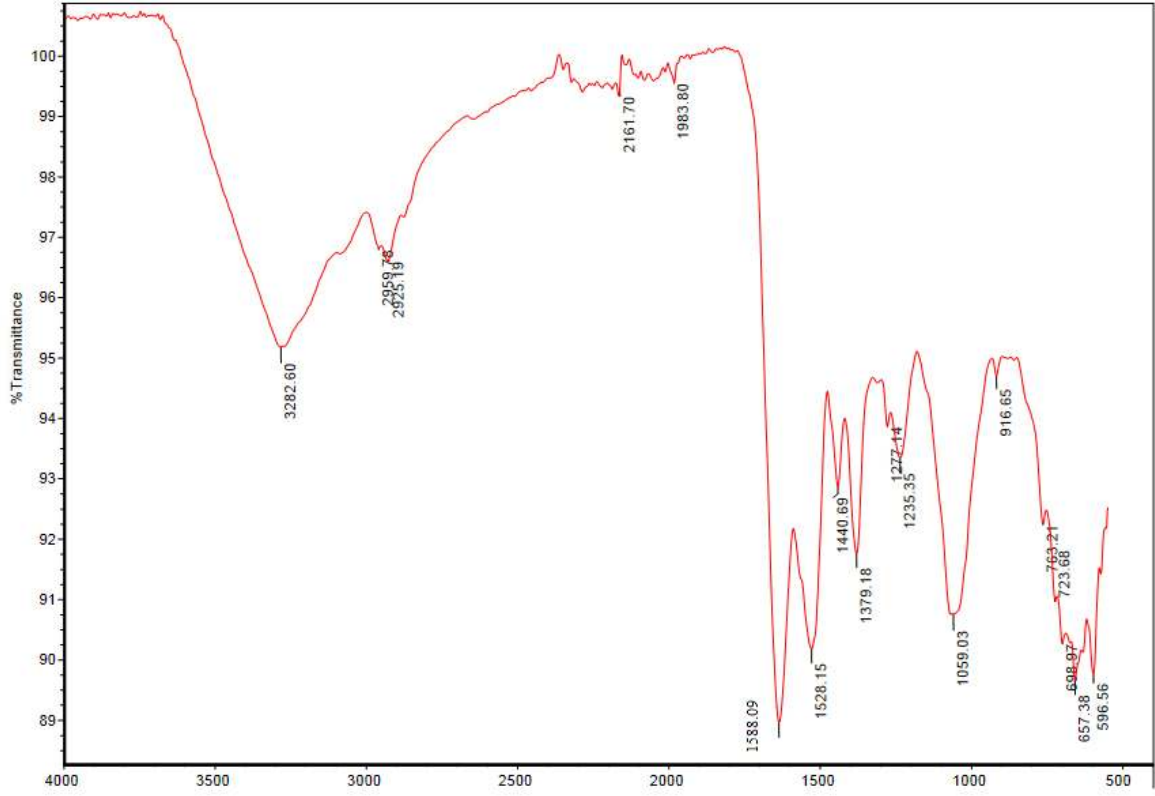
6.2. Biyojenik Mangan Oksitin Karakterizasyonu

Pseudomonas putida tarafından üretilen biyojenik mangan oksitlerin X-ışını difraktogramı Şekil 6.4.'de gösterilmiştir. XRD desenlerinde belirgin kristalin noktaları gözlenmemiştir. Bu, biyojenik mangan oksitlerin zayıf şekilde kristalize olduğunu göstermektedir. Mangan oksitleyici bakteriler tarafından üretilen biyojenik mangan oksitlerin benzer X-ışını difraktogramı önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (Wang vd., 2017; Meng vd., 2009; Tran vd., 2018).

Biyojenik mangan oksitlerin bileşimi FTIR spektrumları ile doğrulanabilir (Xiaoye vd., 2013). Biyojenik mangan oksit örneğinin FTIR spektrumları kaydedilmiş ve Şekil 6.5.'de gösterilmiştir. Literatürde, 1500 cm^{-1} 'den daha düşük dalga boyundaki piklerin mangan oksitlerin Mn-O titreşimini ve $200\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ aralığında piklerin birnesitin ana absorpsiyon bantlarını temsil ettiği bildirilmiştir (Xiaoye vd., 2013). Yaklaşık olarak 763 , 723 , 698 , 657 ve 596 cm^{-1} 'deki pikler, biyojenik mangan oksitlerin Mn-O kafes titreşimlerine atfedilebilir. 1528 , 1440 , 1379 , 1277 , 1235 ve 1059 cm^{-1} 'deki pikler ise birnesitin Mn (III)-OH titreşimine atfedilebilir (Xiaoye vd., 2013; Sinha vd. 2011). 3282 ve 1588 cm^{-1} absorpsiyon bantları, sırasıyla kristalizasyon suyuyla ilişkili OH-gruplarının bükülme ve titreşim gerilmeleri nedeniyle oluşabilir (Li vd., 2017; Wu vd. 2017a). Bu sonuçlara göre, biyojenik mangan oksitler, literatürde bildirilen karakteristik FTIR spektrumlarını göstermektedir (Xiaoye vd., 2017; Li vd. 2017; Wu vd. 2017a; Sinha vd. 2011).

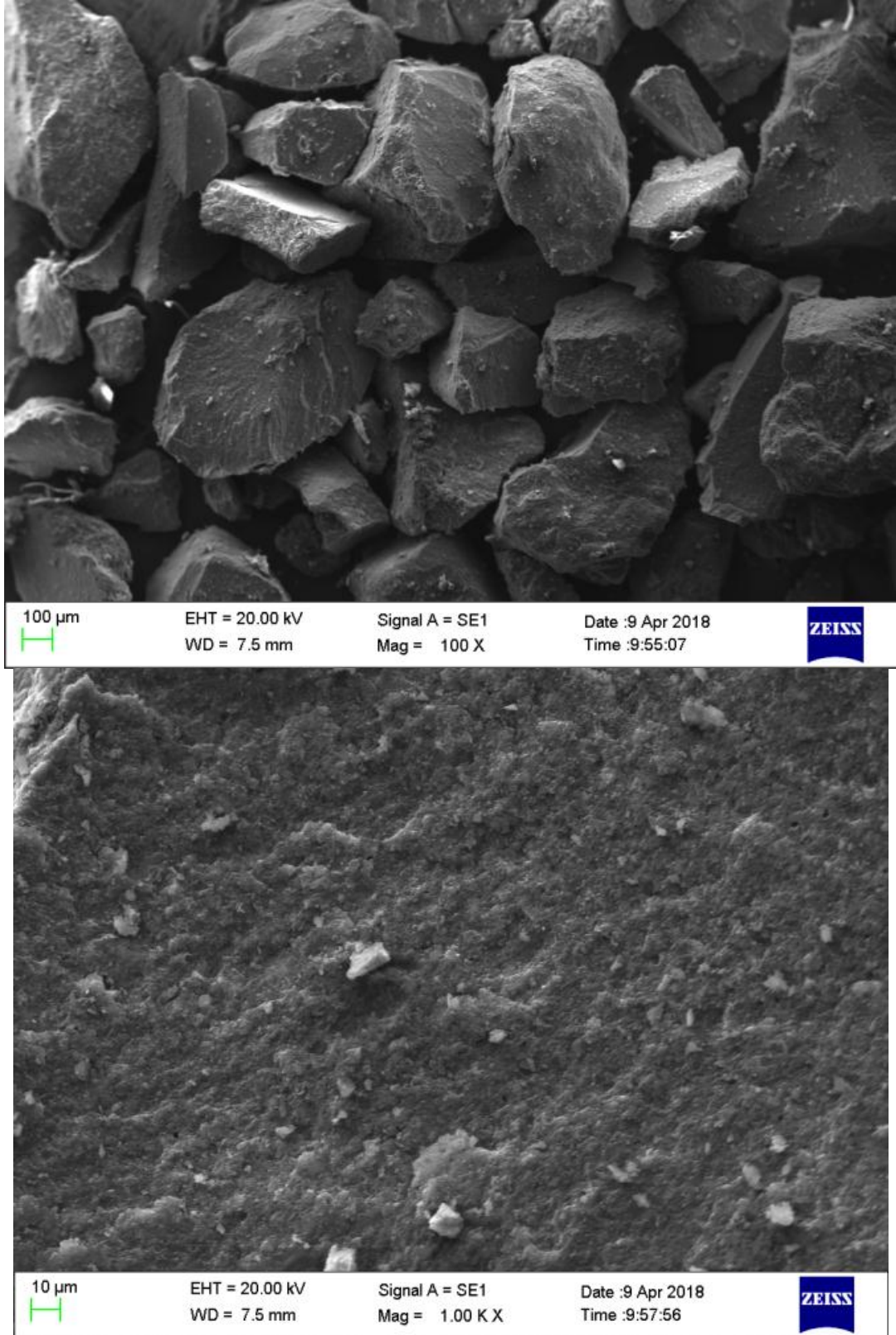


Şekil 6.4. *Pseudomonas putida* tarafından üretilen biyojenik mangan oksitlerin X-ışını difraktogramı

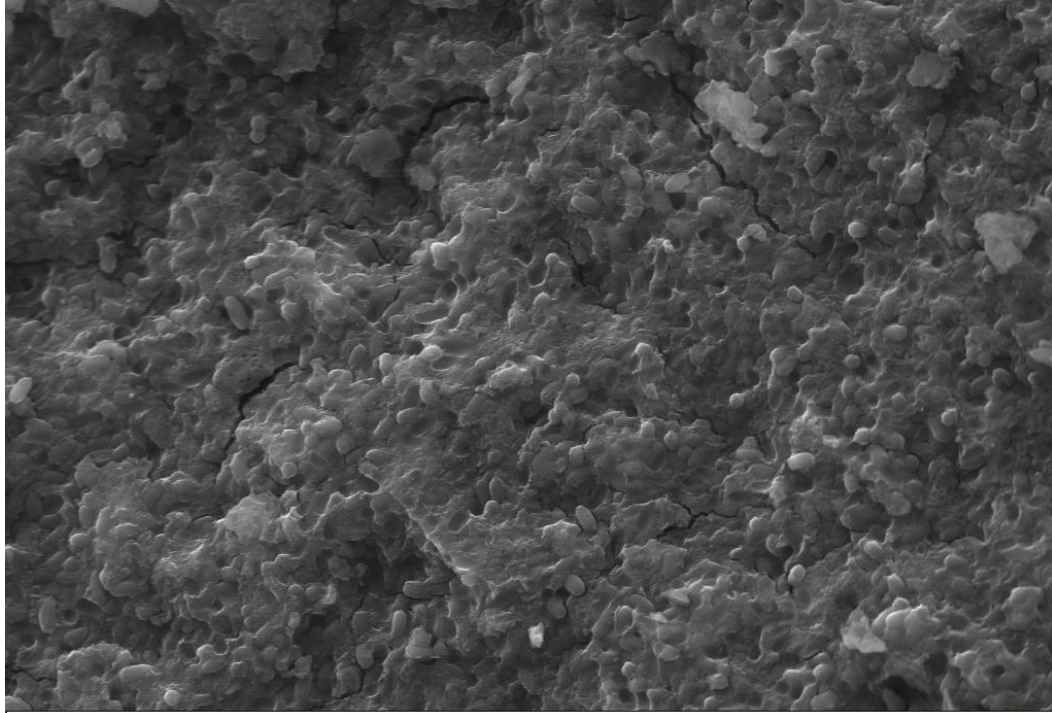


Şekil 6.5. Biyojenik mangan oksit örneğinin FTIR spektrumları

Şekil 6.6., biyojenik mangan oksitlerin SEM-EDX görüntülerini göstermektedir. Biyojenik mangan oksitler, bakteriyel hücelere yakından bağlı yoğun düzensiz parçacık agregasyonu göstermektedir. Bu nedenle, biyojenik mangan minerallerini bakteriyel hücelerden ayırmak ve parçacık boyutlarını tahmin etmek çok zordur. Bu görüntü ayrıca mangan oksitlerin bakteriyel yüzey üzerinde doğrudan çökelme eğiliminde olmadığını da gösterir (Xiaoye vd., 2013). Benzer sonuçlar birçok yazar tarafından bildirilmiştir (Xiaoye vd., 2013; Kim vd., 2012; Wu vd., 2017b; Wang vd., 2017; Barboza vd., 2017). EDX spektrumlarında görüldüğü gibi, biyojenik mangan oksitler; karbon (C), oksijen (O), azot (N) ve fosfor (P) elementlerine ek olarak Mn'den oluşmaktadır. Bu olgu, biyojenik mangan oksitlerin; bakteriyel hücelere bir mangan oksit kompleksi olarak da ortaya çıktığını göstermektedir (Liang vd., 2017).



Şekil 6.6. Biyogenik mangan oksitlerin SEM-EDX görüntüleri

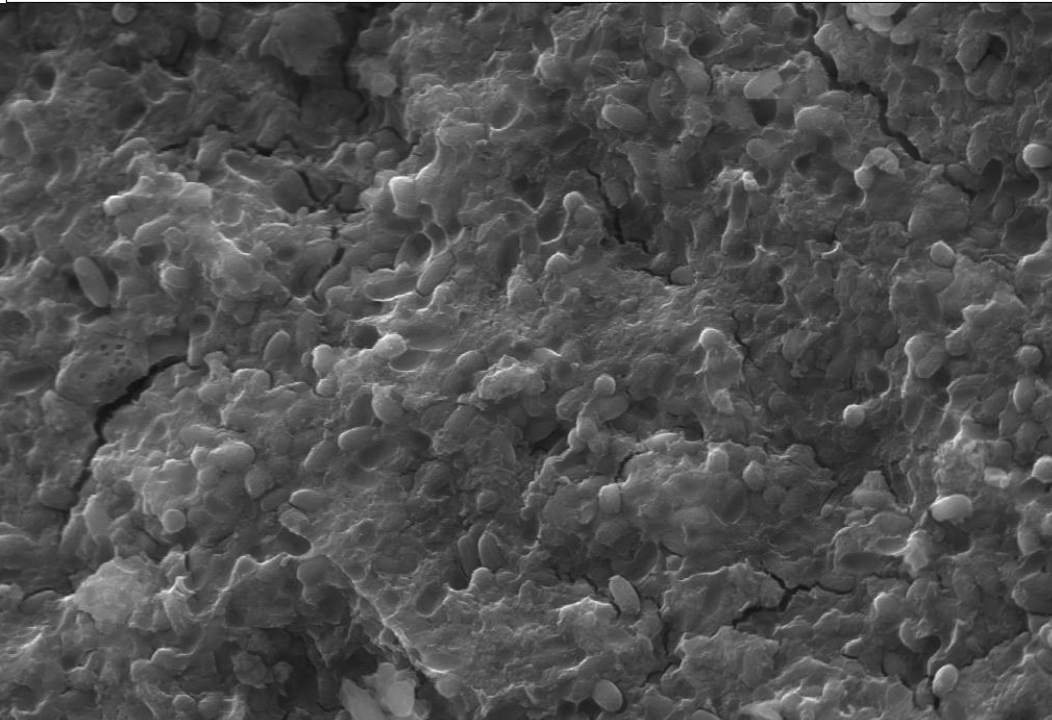


2 μ m

EHT = 20.00 kV
WD = 7.5 mm

Signal A = SE1
Mag = 5.00 K X

Date :9 Apr 2018
Time :10:03:23



2 μ m

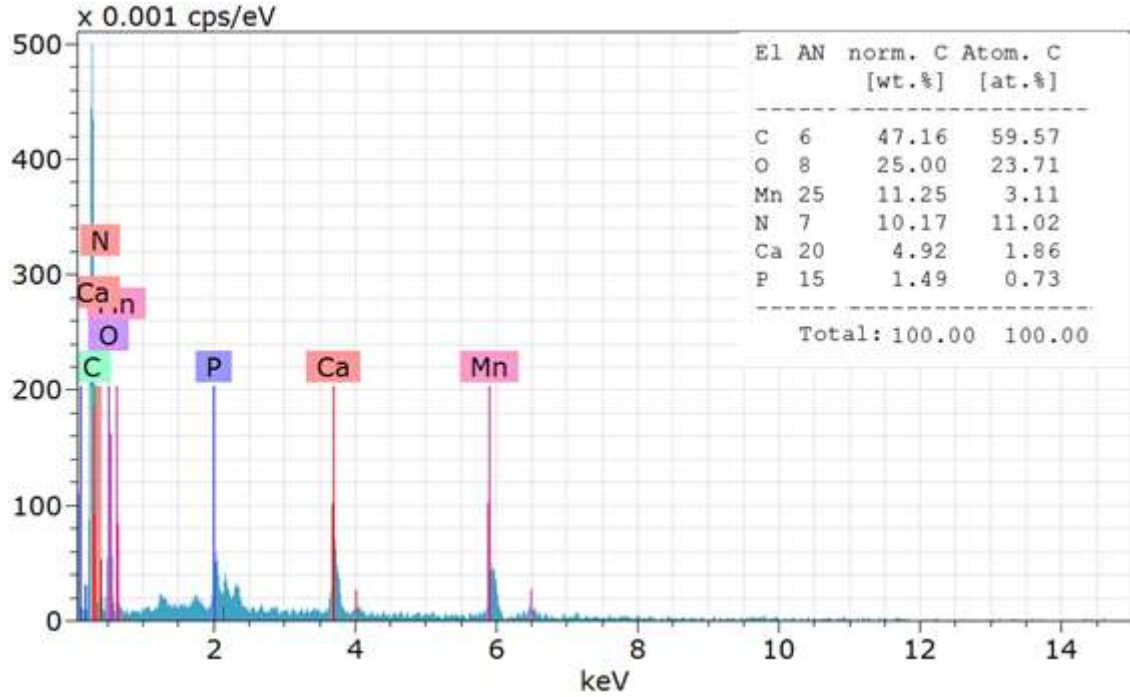
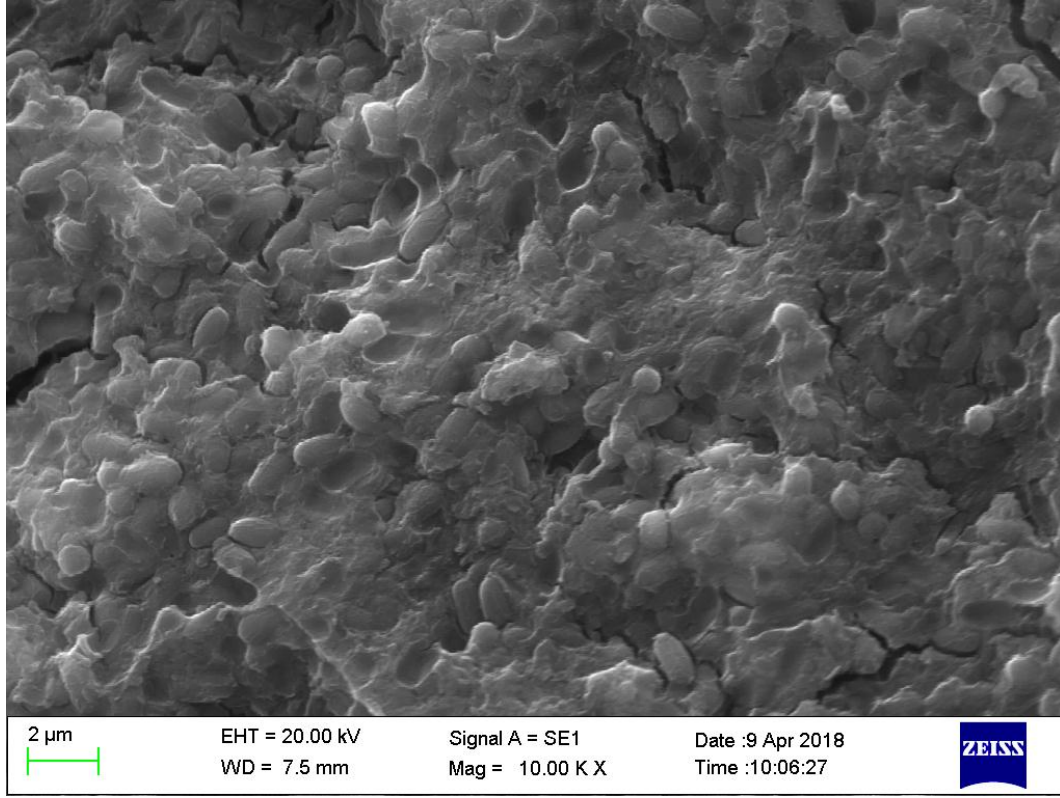
EHT = 20.00 kV
WD = 7.5 mm

Signal A = SE1
Mag = 7.50 K X

Date :9 Apr 2018
Time :10:04:57



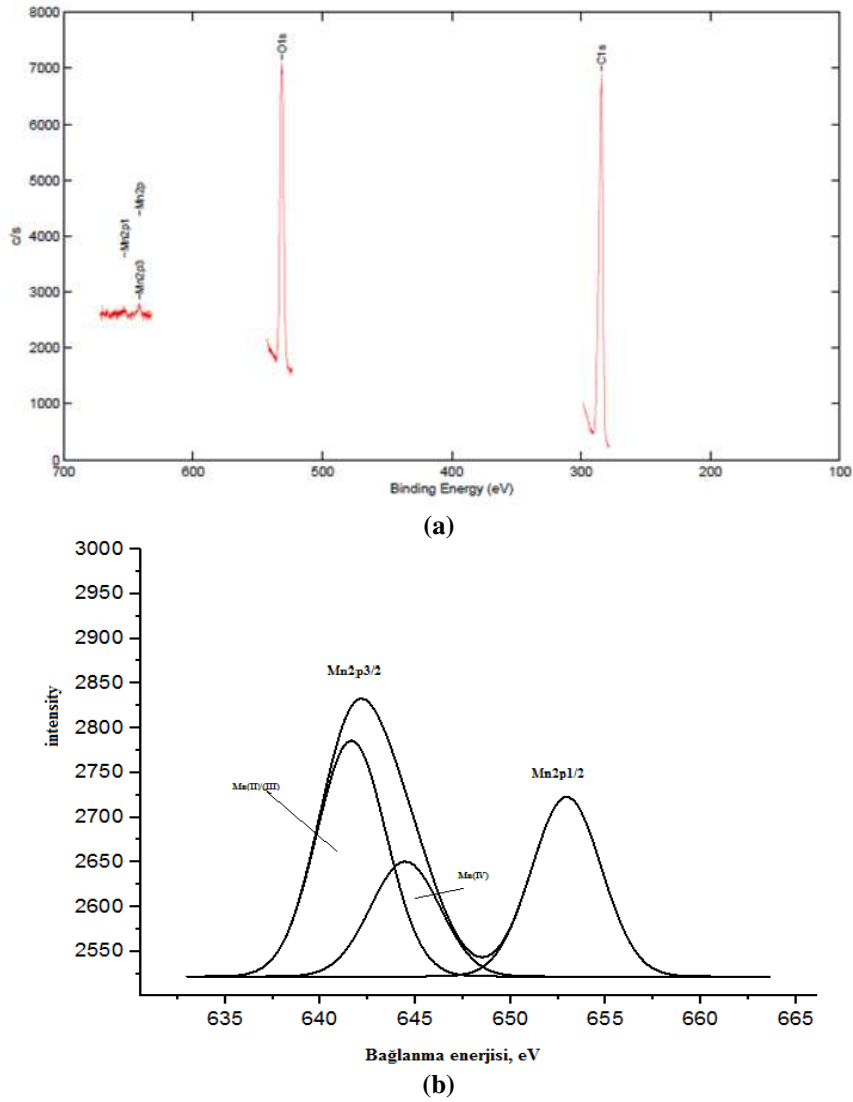
Şekil 6.6. Biyogenik mangan oksitlerin SEM-EDX görüntüleri (devamı)



Şekil 6.6. Biyojenik mangan oksitlerin SEM-EDX görüntüleri (devamı)

XPS bir maddenin yüzey element bileşimi ve elementin oksidasyon halinin incelenmesinde kullanılan iyi bir araçtır (Wang vd., 2012). Biyojenik mangan oksitlerin yüzey atomik bileşimlerinin tayini XPS analizi ile gerçekleştirilmiştir. Analizden elde

edilen geniş spektrumlar Şekil 6.7. (a-b)'de verilmektedir. Bu spektrumlarda pikler sırasıyla C1s, O1s ve Mn (2p_{1/2} ve 2p_{3/2}) atomlarına ait pikleri göstermektedir. Mn 2p_{3/2} ve Mn2p_{1/2} sinyallerinin dekonvolüsyonun manganın oksidasyon halinin ayırt edilmesi için faydalı olduğu bilinmektedir (Wu vd., 2017a). Mn 2p pikleri Gaussian curve fitting ile değerlendirilmiştir. Biyojenik mangan oksitin yüzeyinde Mn 2p'nin XPS spektrumları 641.6 eV, 644.4 eV (2p_{3/2}) ve 652.9 eV (2p_{1/2})'de üç pik içermektedir. 641.6 eV'da konumlanan bağlanma enerjisi Mn (III)'e indekslenir (Du vd., 2016; Wu vd., 2017a). 644.4 eV'deki pik Mn (IV)'e karşılık gelir (Wang vd., 2016). Biyojenik mangan oksitin yüzeyinde Mn (III) ve Mn (IV)'ün atomik oranı 67.2: 32.8 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar biyojenik mangan oksitteki mangan türleri içinde Mn (III)'ün esas değerlik hali olduğunu göstermektedir.

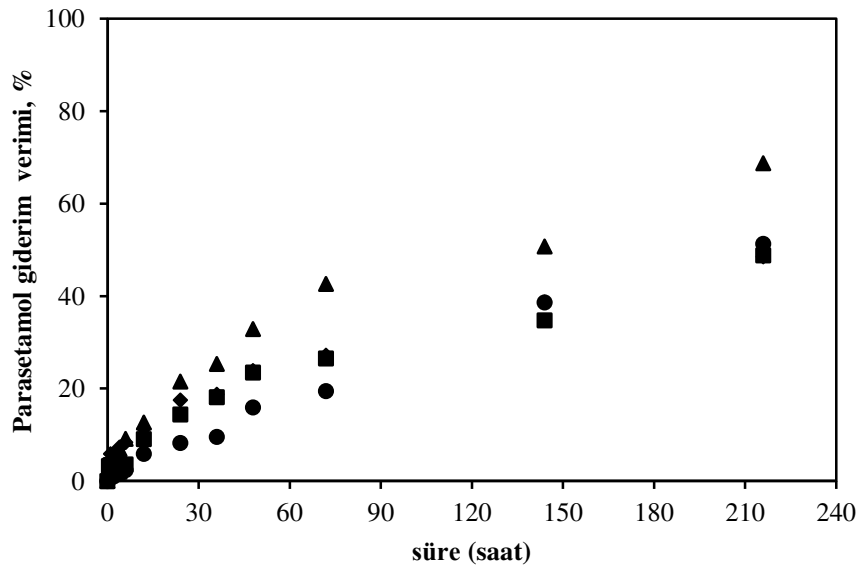


Şekil 6.7. (a) Biyojenik mangan oksitten alınan geniş XPS spekturumları ve (b) Mn 2p XPS spektrumları

6.3. Biyojenik Mangan Oksitler ile Parasetamol Giderimi

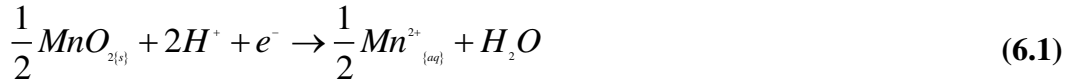
6.3.1. Biyojenik Mangan Oksitler ile Parasetamol Giderimi Üzerine pH'nın Etkisi

Literatürde, bakteriyel hücreler büyümenin durağan fazına girmesinden sonra Mn (II) oksidasyonunun başladığı belirtilmiştir (Furgal vd., 2015). Bu nedenle, bakteri hücreler ekimden sonra yaklaşık 24 saat sonra inkübe edilmiştir. Daha sonra istenen konsantrasyonda (20 mg/L) Mn (II) büyüme ortamına eklenmiştir. Mangan oksidasyonu ile kahverengi çökelti oluşmuş ve oluşan kahverengi çökelti 5000 rpm'de 5 dakika santrifüjleme ile toplanmış, saf su ile yıkanmış ve biyojenik mangan oksitler olarak parasetamol giderilmesinde kullanılmıştır. Biyojenik mangan oksitleri ile parasetamol gideriminde çözelti pH'nın etkisi 5 ila 8 arasında dört farklı pH değerinde incelenmiştir. Başlangıç parasetamol konsantrasyonu 2 mg/L iken biyojenik mangan oksit konsantrasyonu (BMO) 1 g/L'dir. Şekil 7.8.'den görüldüğü gibi, pH 5, 6, 7 ve 8'de yaklaşık olarak % 48.5, 48.8, 68.7 ve 51.3 oranında parasetamol 216 saat içinde giderilmiştir. pH 5 ve 6'da, hemen hemen aynı giderim verimi elde edilmiştir. En yüksek giderim verimi pH 7'de elde edilmiştir. 24 saat sonra giderim verimi % 21.5 iken 48 saat ve 216 saat sonra sırasıyla parasetamolün % 32.9 ve 68.7'i giderilmiştir. Bu, parasetamolün biyojenik mangan oksitlerle giderilmesinde pH 7'nin uygun olduğunu göstermektedir.



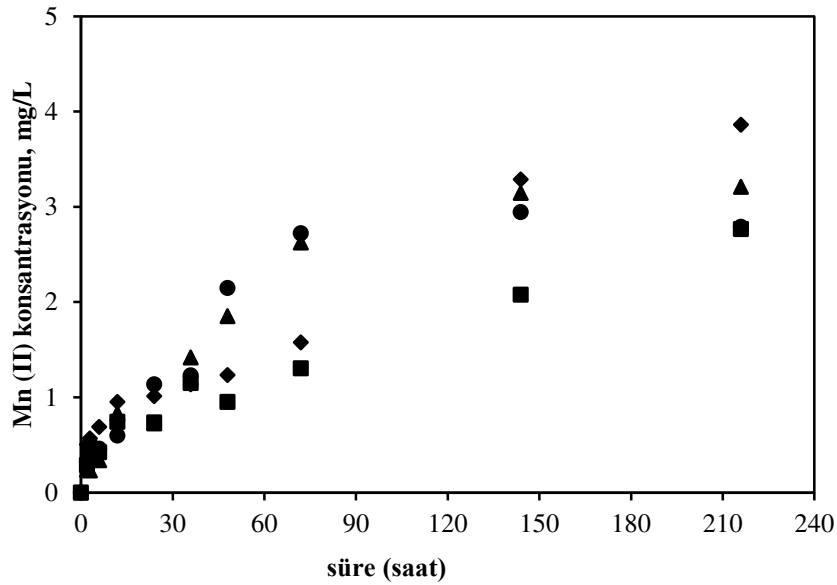
Şekil 6.8. Farklı çözelti pH'ında parasetamol giderim verimlerinin zamanla değişimi (T: 30 °C, C₀: 2 mg/L, BMO: 1 g/L, ◆: pH 5, ■: pH 6, ▲: pH 7, ●: pH 8)

Tu ve diğ. (2014), *Pseudomonas sp.* G7 tarafından oluşturulan biyogenik mangan oksitlerin pH 7’de siprofloksasin oksidasyonu için en yüksek reaktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Meerburg vd. (2012), biyogenik mangan oksitlerin ve gümüşün birleşik aktivitesi ile pH 7’de diklofenak ve 2-anilinofenilasetat degradasyonunu araştırmış ve *Pseudomonas putida* MnB6 ile devam eden mangan oksidasyonu sırasında diklofenak’ın hızla parçalandığını bildirmiştir. Liang vd. (2017), *Microbacterium sp.* CSA40 ile biyogenik mangan oksit (BMnOx) üretimini ve BMnOx ile As (III) giderilmesini araştırmış ve As’in % 90’ından fazlasının pH 7’de BMnOx tarafından uzaklaştırıldığını belirtmiştir. Wu vd. (2017b), biyo-işlenmiş kimyasal endüstriyel atık suyundan 1,2,4-triazol giderilmesinde biyogenik mangan oksitlerin (BioMnOx) rolünü araştırmışlar ancak üretilen BioMnOx ile 1,2,4-triazol gideriminin optimal olarak pH 5’te gerçekleştiğini rapor etmişlerdir. Yazarlar, daha düşük pH değerlerinde elektron transferinin kolaylaştırıldığını belirtmişlerdir. MnO₂’nin indirgenmesi için protonların gerektiğini ve biyogenik mangan oksitleri ile 1,2,4-triazol giderilmesinin biyogenik mangan oksitlerin yüzey yüküne kuvvetle bağlı bir yüzey reaksiyonu olduğunu ifade etmişlerdir. Kim vd. (2012), EE2 gideriminin Mn oksitlerin oksitleyici gücüne ve çözelti pH’ına bağlı olduğunu bildirmiştir, çünkü MnO₂’nin Mn (II)’e indirgenmesi, Denklem (6.1.)’de gösterildiği gibi protonların katılımını gerektirmektedir.



Ancak, bizim çalışmamızda farklı pH’larda elde edilen giderme verimleri arasında çok büyük bir fark yoktur. pH 7’de elde edilen giderim verimi diğer pH’larda elde edilen verimlerinden biraz daha büyüktür. Önceki sonuçlarımıza göre, Mn (II)’nin *Pseudomonas putida* tarafından yeniden oksitlenmesi pH 7 dışında meydana gelmeyebilir. Forrez vd. 2010, diklofenakın nötr pH’da (6-7.5) BioMnOx varlığında oksitlendiğini ve mangan oksidize edici bakteriler tarafından Mn (II)’nin yeniden oksidasyonunun bu aralık dışında meydana gelmediğini bildirmiştir. Bu nedenle, pH 7’deki giderim verimi biraz daha yüksek olabilir. Buna ek olarak, doğal toprak ve su zayıf asidik ve nötrdür, bu nedenle, doğal ortamda kirletici maddeler biyogenik mangan oksitleri ile giderilebilir. Biyogenik mangan oksitlerin, bakterilerin mangan oksit barınaklarıyla ultraviyole karşı korunma avantajı vardır (Liu vd., 2017). Şekil 6.9.’da biyogenik mangan oksitleri ile parasetamol giderimi sırasında reaksiyon çözeltisindeki Mn (II) konsantrasyonunun değişimini

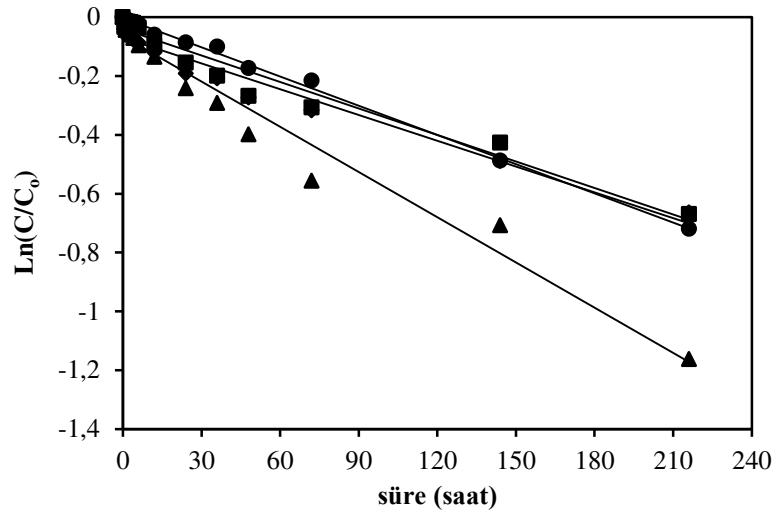
gösterilmektedir. Reaksiyon sırasında mangan (II) konsantrasyonu sürekli artmıştır. Bu, Mn (III veya IV)'ün Mn (II)'e indirgendiğini gösterir. Çözelti pH'ı 5, 6, 7 ve 8'de, 216 saat sonra çözelti içindeki Mn (II) konsantrasyonları sırasıyla 3.9, 2.8, 3.2 ve 2.8 mg/L civarında olmuştur. Literatürde, bir elektron alıcısı olarak biyogenik mangan oksitlerin kirleticilerle reaksiyona girdiğinde Mn (II)'e indirgenebileceği belirtilmiştir (Tu vd. 2014; Liang vd., 2017). Deneylerin sonunda pH değerleri ölçülmüş ve çözelti pH'larının sırasıyla 5.38, 6.46, 7.26 ve 8.53'e yükseldiği görülmüştür.



Şekil 6.9. Farklı çözelti pH'larında Mn (II) konsantrasyonunun zamanla değişimi (T: 30 °C, C₀: 2 mg/L, BMO: 1 g/L, ♦: pH 5, ■: pH 6, ▲: pH 7, ●: pH 8)

Reaksiyon hızı sabitlerini belirlemek için aşağıdaki denklemde (Denk. (6.2.)) verilen birinci mertebeden kinetik model uygulanmıştır (Liu vd., 2017). Burada, k birinci derece hız sabiti, C çeşitli zamanlarda (t) parasetamol konsantrasyonudur. C₀, parasetamolün başlangıç konsantrasyonudur. Zamana karşı ln (C/C₀) grafiğe geçirilmiş (Şekil 6.10.) ve verilerin yüksek regresyon katsayılarına sahip birinci dereceden kinetik modelle iyi bir şekilde uyum sağladığı görülmüştür. Reaksiyon hızı sabitleri 5, 6, 7 ve 8'lik çözelti pH'ı için sırasıyla 0.0029, 0.0030, 0.0051 ve 0.0033 h⁻¹ olarak belirlenmiştir.

$$\ln (C/C_0) = - k.t \quad (6.2.)$$

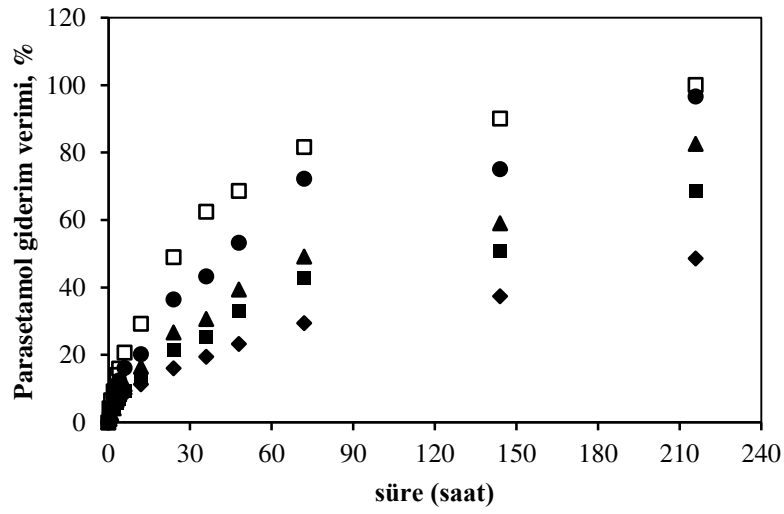


Şekil 6.10. Zamana karşı $\ln (C/C_0)$ grafiği (T: 30 °C, C_0 : 2 mg/L, BMO: 1 g/L, ◆: pH 5, ■: pH 6, ▲: pH 7, ●: pH 8)

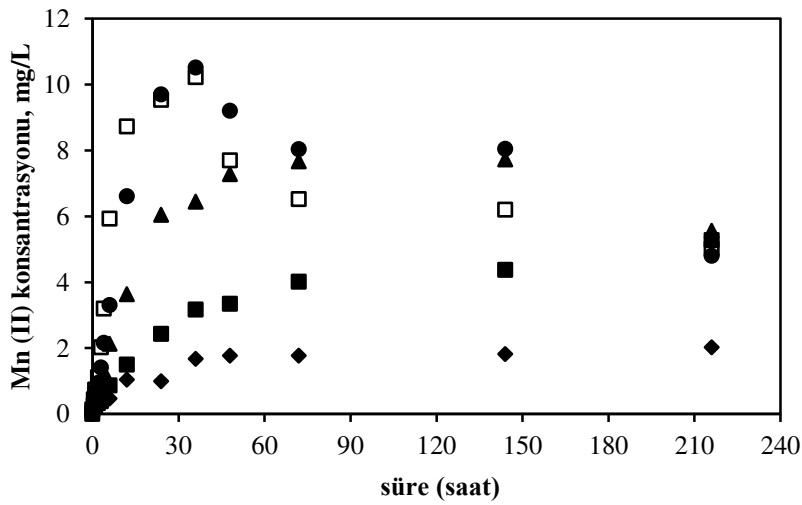
6.3.2. Biyogenik Mangan Oksitlerle Parasetamol Giderimi Üzerine Biyogenik Mangan Oksit Miktarının Etkisi

Parasetamol gideriminde biyogenik mangan oksit miktarının etkisi 0.5 ila 5 g/L arasında değişen 5 farklı miktarda incelenmiştir. Başlangıç parasetamol konsantrasyonu 2 mg/L iken ve çözeltisi pH'ı 7'e ayarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 6.11.'de gösterilmiştir. Çözeltideki biyogenik mangan oksit miktarının artması, parasetamol giderim verimini artırmıştır. 0.5, 1, 2, 3 ve 5 g/L biyogenik mangan oksit kullanıldığında 24 saat sonunda sırasıyla parasetamolün % 15.9, 21.5, 26.6, 36.4 ve 48.9'u 48 saat sonra ise sırasıyla % 23.2, 32.9, 39.3, 53.3 ve 68.6'ı giderilmiştir. 216 saat sonra ise parasetamol giderim verimleri ise sırasıyla % 48.6, 68.7, 82.6, 96.6 ve 100 olmuştur. Parasetamolün tam giderimi 5 g/L biyogenik mangan oksit miktarında 216 saat sonunda başarılmıştır. Bu nedenle, sonraki deneylerde 5 g/L biyogenik mangan oksit miktarı kullanılmıştır. Sonuçlar, biyogenik mangan oksitlerle parasetamol gideriminin yüzeye bağımlı bir reaksiyon olduğunu ortaya çıkarmıştır. Biyogenik mangan oksit miktarının artması, yüzey reaktif alanların sayısının artmasına neden olabilir (Kim vd., 2012). Wu vd. (2017b), biyogenik mangan oksit üretiminin Mn (II) konsantrasyonunun artmasıyla arttığını ve biyogenik mangan oksit miktarının artması ile artan aktif yüzey alanlarına bağlı olarak 1,2,4-triazol gideriminin beklendiği gibi arttığını belirtmiştir. Liang vd. (2017), biyogenik mangan oksitler ile As (III) giderilmesini araştırmış ve biyogenik mangan oksit dozlarının artmasının As giderimini artırdığını, toplamda % 90'dan fazla As'nin 0.5 g/L biyogenik

mangan oksitler ile giderildiğini belirtmişlerdir. Şekil 6.12.'de farklı biyogenik mangan oksit miktarlarında parasetamol giderimi süresince ortama salınan Mn (II) konsantrasyonunun değişimini gösterilmektedir. 0.5 ve 1 g/L biyogenik mangan oksit miktarlarında reaksiyon süresince mangan (II) konsantrasyonu sürekli olarak artmıştır. Bu Mn (III veya IV)'ün Mn (II)'a indirgenmesini göstermektedir. Ancak; 2, 3 ve 5 g/L biyogenik mangan oksit kullanılan ortamlarda Mn (II) konsantrasyonu başlangıçta artmıştır. Yaklaşık olarak 36 saatten sonra Mn (III/IV) indirgenmesi durmuş ve Mn (II) konsantrasyonu sürekli olarak azalmıştır. Bu ortama salınan Mn (II)'nin *P. putida* tarafından yeniden oksitlendiğini göstermektedir.



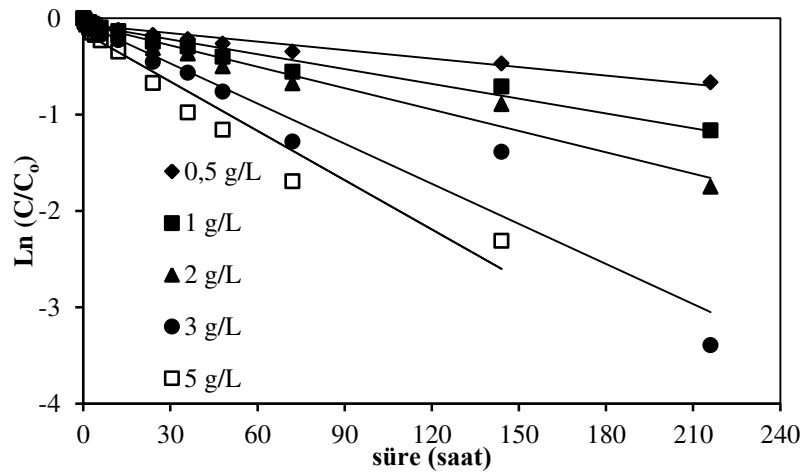
Şekil 6.11. Parasetamol gideriminde biyogenik mangan oksit miktarının etkisi (T: 30 °C, C₀: 2 mg/L, pH: 7, ◆: 0.5 g/L, ■: 1 g/L, ▲: 2 g/L, ●: 3 g/L, □: 5 g/L)



Şekil 6.12. Farklı biyogenik mangan oksit miktarlarında parasetamol giderimi süresince ortama salınan Mn (II) konsantrasyonunun değişimi (T: 30 °C, C₀: 2 mg/L, pH: 7, ◆: 0.5 g/L, ■: 1 g/L, ▲: 2 g/L, ●: 3 g/L, □: 5 g/L)

Liu vd. (2017), bunun biyogenik mangan oksitin sürekli reaktivitesini sağladığını bildirmiştir. Liang ve diğ. (2017), ortama salınan Mn (II)'nin uygulama sürecinde yeniden Mn (III/IV)'e oksitlendiğinden dolayı, biyogenik mangan oksitin As (III) giderimi için kirlilik içermeyen, maliyeti az ve yüksek verimli bir malzeme olduğunu belirtmiştir. Forrez vd. (2010)'de benzer bir durum gözlemlemiştir. 0,5, 1, 2, 3 ve 5 g/L biyogenik mangan oksit miktarlarında, 216 saat sonra çözelti içindeki Mn konsantrasyonları sırasıyla 2.0, 3.2, 5.6, 4.8 ve 5.0 mg/L civarındadır. Deneyin sonunda çözelti pH'ları sırasıyla 7.28, 7.26, 7.22, 7.38 ve 7.52'e yükselmiştir. Liu ve diğ. (2017), mangan-oksitleyen bakterilerin metabolizma yolu ile pH'ı muhtemelen arttırdığını belirtmişlerdir.

Reaksiyon hızı sabitlerini belirlemek için birinci dereceden kinetik model uygulanmış ve Şekil 6.13.'den görüldüğü gibi, veriler birinci mertebeden kinetik model ile uyum sağlamıştır. Reaksiyon hızı sabitleri, 0.5, 1, 2, 3 ve 5 g/L biyogenik mangan oksit miktarları için sırasıyla 0.0029, 0.0051, 0.0074, 0.0139 ve 0.0171 h⁻¹ olarak belirlenmiştir. Biyogenik mangan oksitler konsantrasyonu 0.5'den 5 g/L'ye çıkarıldığında, birinci derece reaksiyon hızı sabiti yaklaşık altı kat artmıştır ve görüldüğü gibi en yüksek hız sabiti 5 g/L biyogenik mangan oksit miktarında elde edilmiştir. Forrez vd. (2010), biyogenik mangan oksit miktarının hız sabitleri üzerinde doğrusal bir etkiye sahip olduğunu bildirmiştir.



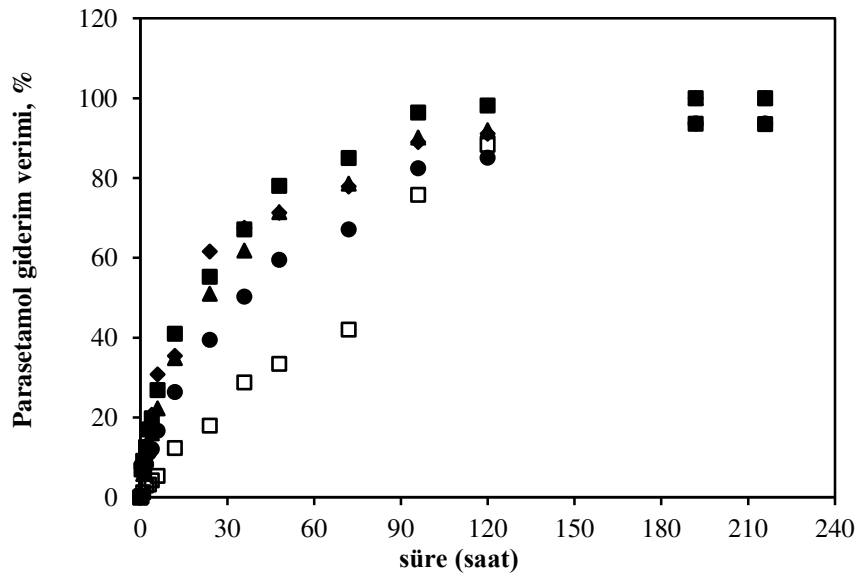
Şekil 6.13. Zamana karşı $\ln(C/C_0)$ grafiği (T: 30 °C, C_0 : 2 mg/L, pH: 7, ◆: 0.5 g/L, ■: 1 g/L, ▲: 2 g/L, ●: 3 g/L, □: 5 g/L)

6.3.3 Biyogenik Mangan Oksitler ile Parasetamol Giderimi Üzerine Parasetamol Konsantrasyonunun Etkisi

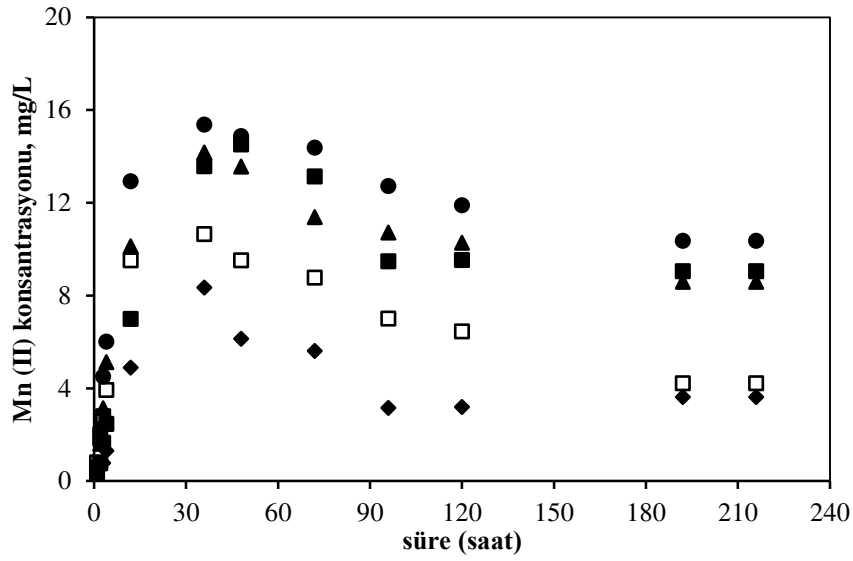
0.5 ile 10 mg/L arasında değişen beş farklı başlangıç parasetamol konsantrasyonlarında parasetamol giderimi, pH 7'de ve 5 g/L biyogenik mangan oksit miktarında incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 6.14.'de gösterilmiştir. 0.5 ve 1 mg/L

parasetamol konsantrasyonları kullanıldığında 192 saat sonra parasetamol tamamen giderilmiştir. 2 mg/L parasetamol konsantrasyonunda tam giderim 216 saat sonra başarılmıştır. 5 ve 10 mg/L parasetamol konsantrasyonlarında giderim verimleri sırasıyla % 93.7 ve 93.5'dir. 5 ve 10 mg/L parasetamol konsantrasyonları kullanıldığında giderim verimlerinde hafif bir düşüş gözlenmiştir. Wu vd. (2017b), biyogenik mangan oksitlerle 1,2,4-triazol gideriminin 5.00 mg/L'nin üzerindeki 1,2,4-triazol konsantrasyonlarında belirgin şekilde azaldığını bildirmişlerdir. Kirletici maddelerin uzaklaştırılmasının bir yüzey reaksiyonu ile gerçekleştirildiğini öne sürmüşlerdir. İlk aşamada, yüzey kompleksinin oluştuğunu, daha sonra kirleticinin dönüşüm ürünlerinin ve yeni oluşturulan Mn (II)'nin biyogenik mangan oksit yüzeyinde birikebileceğini belirtmişlerdir. Ek olarak, yüksek konsantrasyonlardaki kirleticinin yüksek toksisite doğası, hem mangan oksidasyonunda hem de kirletici maddelerin uzaklaştırılmasında yer alan mikroorganizmaların faaliyetlerini engelleyebilir ve bu da daha yüksek konsantrasyonlarda kirletici maddelerin gideriminin düşük olmasına neden olabilir.

Şekil 6.15.'de parasetamol giderimi sırasında farklı parasetamol konsantrasyonlarında salınan Mn (II) konsantrasyonunun değişimi gösterilmektedir. Mn (II) konsantrasyonu başlangıçta artmış ve yaklaşık olarak 36 saatten sonra Mn (III/IV) indirgenmesi durmuştur. 0.5, 1, 2, 5 ve 10 mg/L parasetamol konsantrasyonlarında 216 saat sonra çözeltiliye salınan Mn (II) konsantrasyonları sırasıyla 3.6, 9.0, 8.6, 10.3 ve 4.2 mg/L olarak tespit edilmiştir.



Şekil 6.14. Farklı başlangıç parasetamol konsantrasyonlarındaki giderim yüzdeleri (T: 30 °C, pH: 7, BMO: 5 g/L, ◆: 0.5 mg/L, ■: 1 mg/L, ▲: 2 mg/L, ●: 5 mg/L, □: 10 mg/L)



Şekil 6.15. Parasetamol giderimi sırasında farklı parasetamol konsantrasyonlarında salınan Mn (II) konsantrasyonunun değişimi (T: 30 °C, pH: 7, BMO: 5 g/L, ◆: 0.5 mg/L, ■: 1 mg/L, ▲: 2 mg/L, ●: 5 mg/L, □: 10 mg/L)

6.4. Tepki Yüzey Yöntemi ile Ortam Optimizasyonu

Çalışmanın bu aşamasında, maksimum parasetamol giderimi elde etmek ve birbirini etkileyen değişkenlerin rollerini anlamak için tepki yüzey metodu ile parasetamol giderimi optimize edilmeye çalışılmıştır. Çalışmada gerçekleştirilen ön denemelerde; pH, biyojenik mangan oksit ve parasetamol konsantrasyonlarının giderimi etkileyen önemli faktörler olduğu belirlenmiştir. Optimizasyon Merkezi Kompozit Tasarım (MKT) ile yapılmıştır. Burada 2^3 faktöriyel dizayn, 20 deney ile tamamlanmıştır. İkinci dereceden polinomial katsayılar Design Expert Software (versiyon 7.0, State-Ease, Inc., Mineapolis, MN) istatistik paketi kullanılarak hesaplanmış ve analizlenmiştir. Modelin istatistiksel analizi varsans analizi (ANOVA) kullanılarak yapılmıştır.

pH (A), parasetamol konsantrasyonu (B) ve biyojenik mangan oksit konsantrasyonu (C) bağımsız değişkenler olarak seçilmiş ve dizaynda her bir faktör beş farklı seviyede ($-\alpha$, -1, 0, 1, $+\alpha$) çalışılarak bağımsız değişkenlerin seviyeleri optimize edilmiştir. 8. günde elde edilen parasetamol giderimi (%) dizayn deneylerinin tepkisi (response) olarak alınmıştır. Bu çalışmada araştırılan bağımsız değişkenlerin aralıkları ve seviyeleri Tablo 6.1.'de verilmiştir.

Tablo 6.1. Merkezi Kompozit Tasarım (MKT)'a göre bağımsız değişkenlerin kodlanmış ve gerçek değerleri

Değişkenler	Sembol	Çalışma aralığı ve değerleri				
		- 1.682(- α)	-1	0	1	+1.682(+ α)
pH	A	5.00	5.81	7.00	8.19	9.00
Parasetamol kons. (mg/L)	B	0.50	5.47	12.75	20.03	25.00
Biyojenik mangan oksit konsantrasyonu (g/L)	C	0.0	2.03	5.00	7.97	10.00

MKT deneysel planına göre deneyler yapılmış ve elde edilen sonuçlar Tablo 6.2.'de verilmiştir.

Tablo 6.2. MKT'a göre deney tasarımı ve gözlenen parasetamol giderim yüzdeleri (%)

Deney No	Değişkenler			Tepki
	A	B	C	Parasetamol giderim verimi, (%)
1	7.00	12.75	5.00	95.3
2	7.00	12.75	5.00	95.3
3	5.81	5.47	2.03	70.9
4	8.19	5.47	2.03	82.0
5	5.81	20.03	2.03	40.0
6	7.00	0.50	5.00	94.9
7	8.19	20.03	7.97	99.2
8	8.19	5.47	7.97	76.2
9	7.00	12.75	5.00	95.3
10	5.81	20.03	7.97	90.8
11	7.00	12.75	5.00	95.3
12	7.00	12.75	5.00	95.3
13	7.00	25.00	5.00	51.5
14	5.81	5.47	7.97	70.6
15	7.00	12.75	5.00	95.3
16	9.00	12.75	5.00	76.8
17	8.19	20.03	2.03	33.3
18	5.00	12.75	5.00	67.6
19	7.00	12.75	0.00	1.2
20	7.00	12.75	10.00	97.5

Bu değerlere göre Tepki Yüzey Metodu analizi gerçekleştirilmiş elde edilen sonuçların varyans analizi (ANOVA) Tablo 6.3.'de verilmiştir.

Tablo 6.3. Ortam bileşenlerinin bir fonksiyonu olarak parasetamol giderim veriminin ikinci dereceden polinom (kuadratik) modeli için varyans analizi (ANOVA)

	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Ortalama Kare	F değeri	p değeri Prob > F
Model	12106.27	9	1345.14	11.39	0.0004 önemli
A-pH	84.01	1	84.01	0.71	0.4188
B-parasetamol kons.	876.20	1	876.20	7.42	0.0214
C-biyojenik man. ok. kons.	5439.55	1	5439.55	46.04	<0.0001
AB	28.13	1	28.13	0.24	0.6341
AC	11.52	1	11.52	0.098	0.7613
BC	1884.98	1	1884.98	15.95	0.0025
A ²	632.77	1	632.77	5.36	0.0432
B ²	567.05	1	567.05	4.80	0.0533
C ²	3116.26	1	3116.26	26.38	0.0004
Artık	1181.47	10	118.15		
Uyum eksikliği	1181.47	5	236.29		
Saf hata	0.000	5	0.000		
Doğrulanmış Toplam	13287.75	19			

R²; 0.9111, Adj R²; 0.8311, Adeq. Precision; 9.973

ANOVA değerlerinden de anlaşılacağı gibi, verilerin modele uygunluğu oldukça anlamlıdır. Örneğin, verilerin dağılımdan uzaklığının ölçüsü olan Fisher's F-test değeri 11.39 (ortalama kare regresyon/ ortalama kare artık) olup oldukça düşük olasılık değerlerine sahiptir [(P_{model}>F)= 0.0004]. Prob>F değerinin 0.05'den küçük olması model terimlerinin anlamlı olduğunu göstermektedir. Model terimlerinin 0.10'den daha büyük değerleri önemli değildir. Model F değerleri ve çok düşük olasılık değerleri (P değeri: 0.0004) modelin oldukça önemli olduğunu işaret etmektedir. Ayrıca determinasyon katsayısının R² = 0.9111 olması da modelin doğruluğunun bir göstergesidir. R² değerleri, deneysel parametreler ve karşılıklı etkileşimlere bakılarak ifade edilen gözlenmiş tepki değerinin ne kadar değiştiğinin bir ölçüsünü verir. R²'nin 1'e yakın değerleri deneysel ve tahmin edilen değerler arasında iyi bir korelasyon ve tahminler ve yanıtlar arasında iyi bir model olduğunu gösterir. Yüzde olarak ifade edildiği zaman, parasetamol giderimi için toplam varyasyonun % 91'i bağımsız değişkenlere atfedildiği ve toplam varyasyonun % 9'unun modelle açıklanamadığını belirtmektedir.

Ayarlanmış (Adj) R² değeri 0.83'dür. Ayarlanmış R² örnek hacmi ve modeldeki değişken sayısından dolayı R² değerini düzenler. Eğer modelde birçok değişken varsa ve örnek hacmi oldukça fazla değilse ayarlanmış R² değeri R²'den daha düşük olabilir (Kaushik vd., 2006). Bu değerler, R² değerleri ile uyum içindedir. Yeterli kesinlik (adequate precision), sinyal gürültü oranını gösterir ve genelde 4'den büyük bir değer olması istenir (Pareek vd., 2011). Parasetamol giderimi için elde edilen 9.973 'adequate

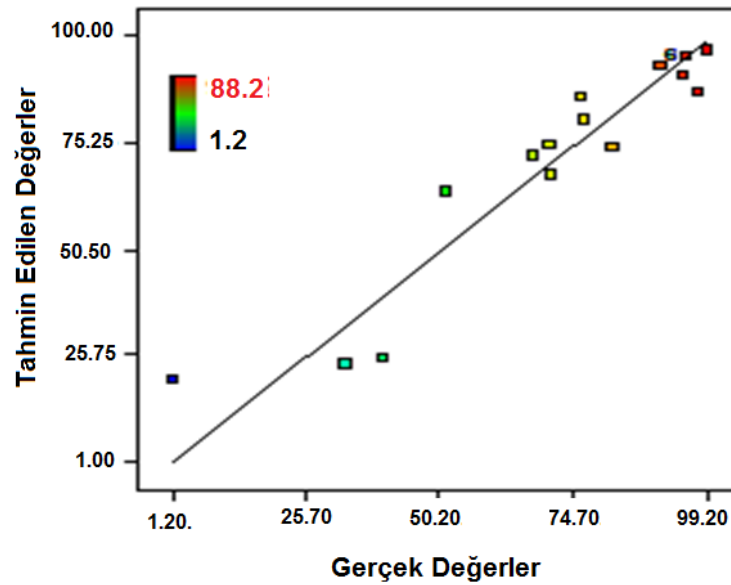
precision'değerleri uygun bir sinyali işaret eder ve modelin dizayn alanı içinde kullanılabileceğini öne sürer.

Tepki yüzey metodu analizi sonucu elde edilen ve parasetamol giderimi ile pH, parasetamol konsantrasyonu ve biyojenik mangan oksit konsantrasyonu arasındaki amprik ilişkiyi veren kodlanmış birimdeki regresyon eşitliği;

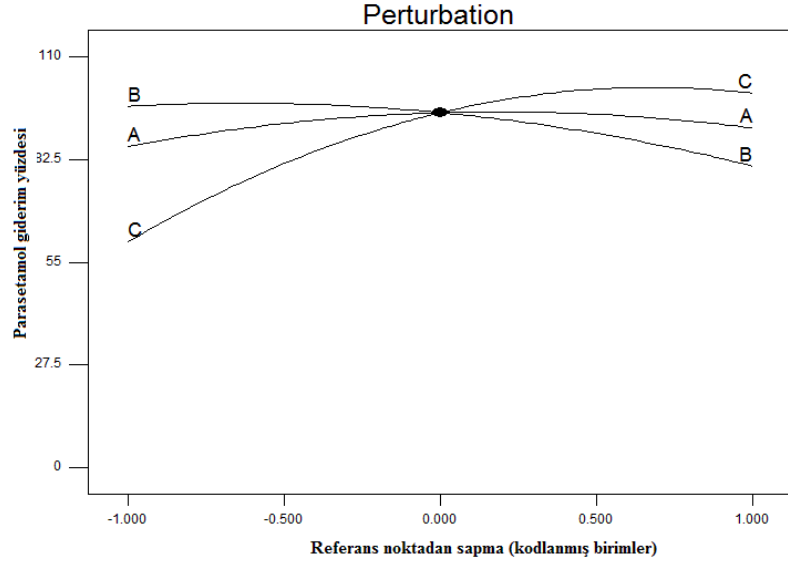
$$\text{Parasetamol giderimi} = +95.06 + 2.48A - 8.01 B + 19.96 C - 1.87 AB + 1.20AC + 15.35 BC - 6.63 A^2 - 6.27 B^2 - 14.71C^2$$

Katsayılar a ait P-değerleri kıyaslandığında; B , C , BC , A^2 ve C^2 'nin 0.05'den küçük değerleri bu proses değişkenlerinin etkisinin parasetamol giderimi üzerinde önemli olduğunu; bu değişkenlerde yapılacak değişikliklerin parasetamol giderim yüzdesini değiştireceğini belirtmektedir. Modele göre hesaplanmış tahmini değerler ve gözlenmiş değerlere karşı çizilmiş eğriler Şekil 6.16.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi deneysel gerçek değerlerle modelden tahmin edilen değerler kabul edilebilir bir sınırdadır.

Şekil 6.17.'de referans noktasına göre seçilmiş bir değere göre aktivitenin A , B ve C ile olan değişimleri görülmektedir.

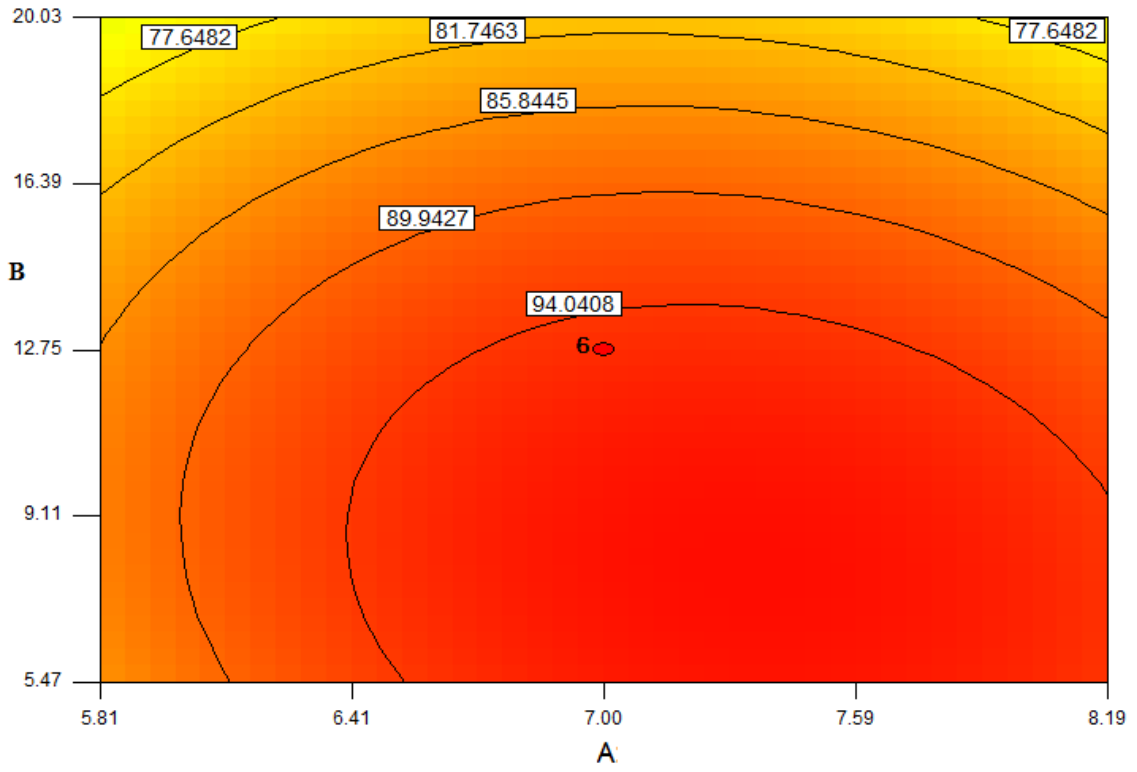
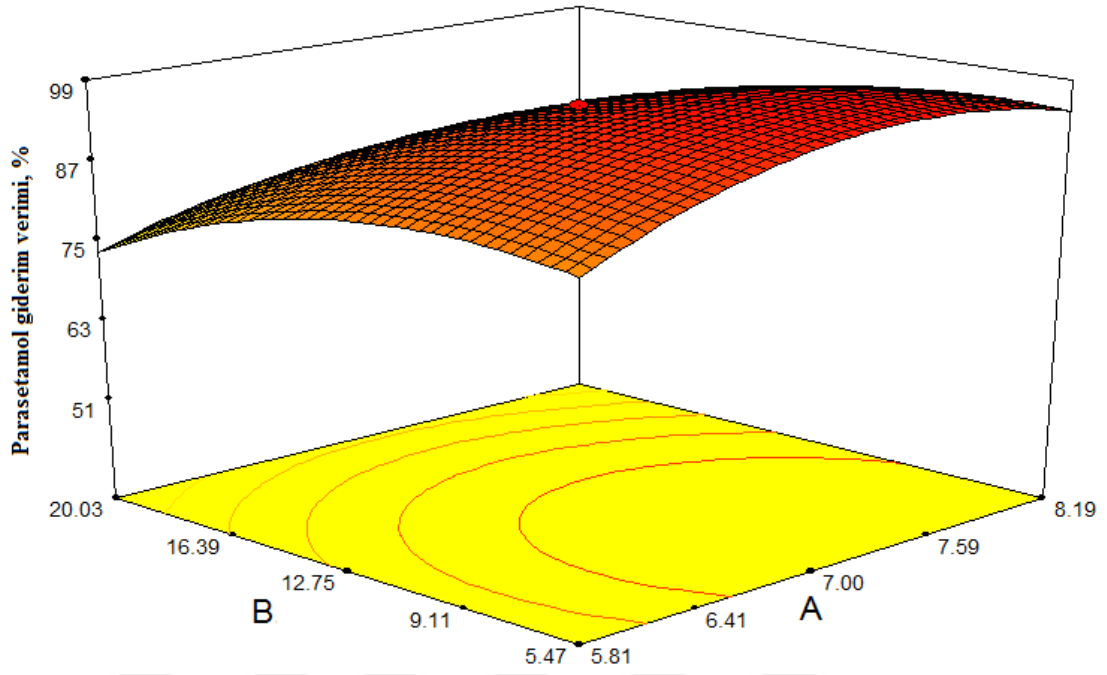


Şekil 6.16. Parasetamol giderimi için gözlenmiş değerlere karşı hesaplanmış tahmini değerlerin değişimi

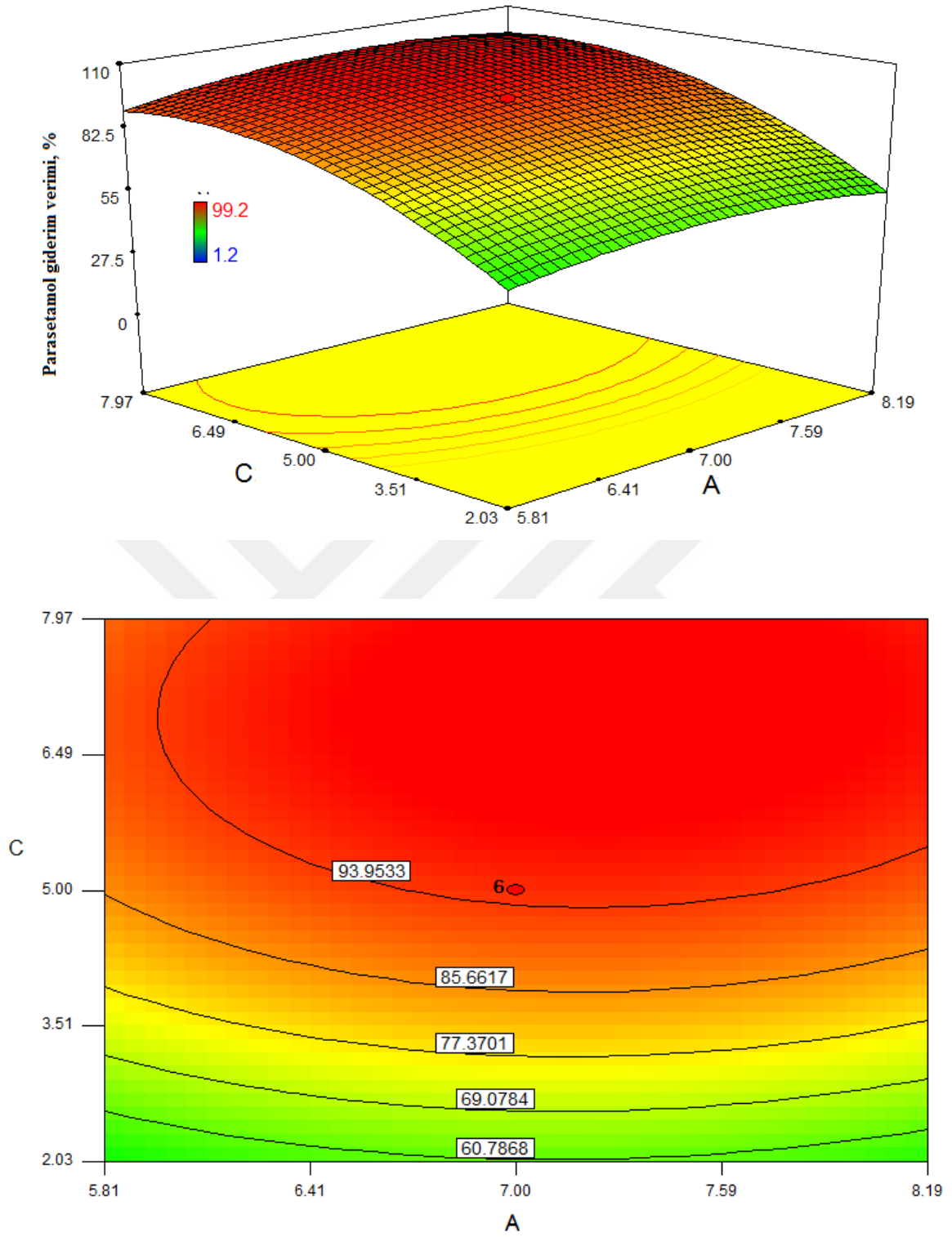


Şekil 6.17. Referans noktasına göre seçilmiş bir değere göre parasetamol gıderiminde bağımsız değişkenler olan A, B ve C'nin etkisini gösteren perturbation grafiğı

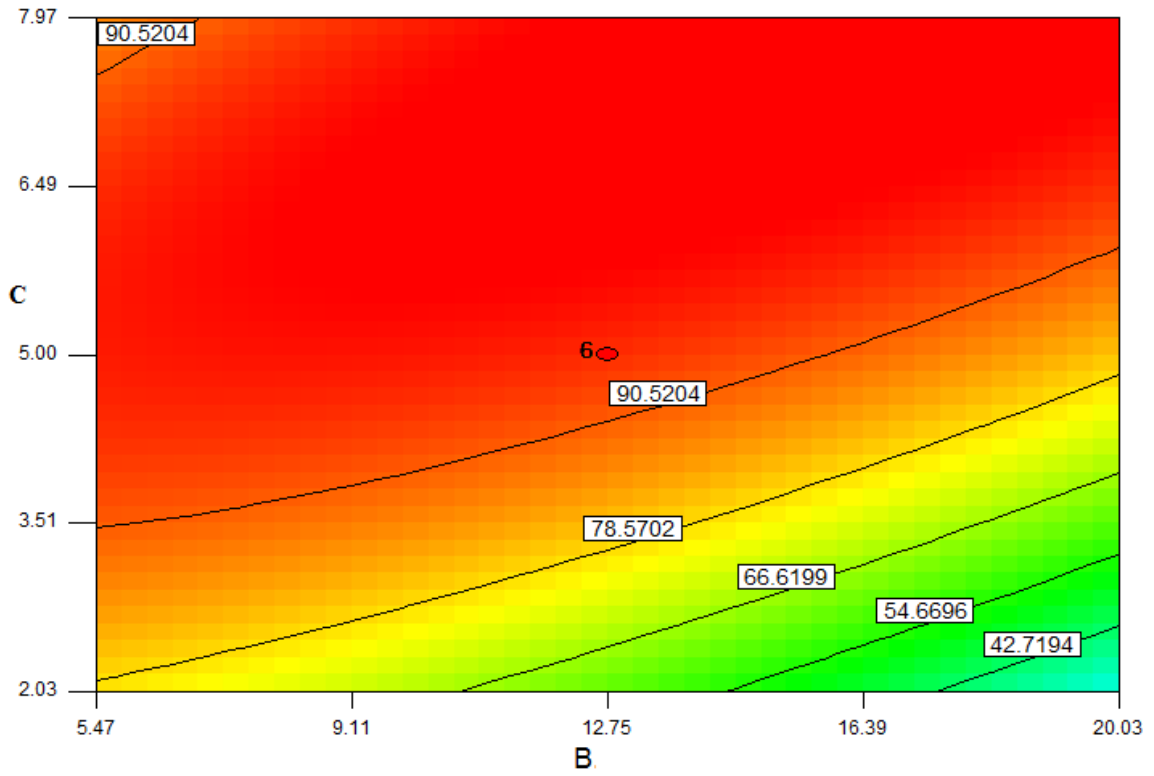
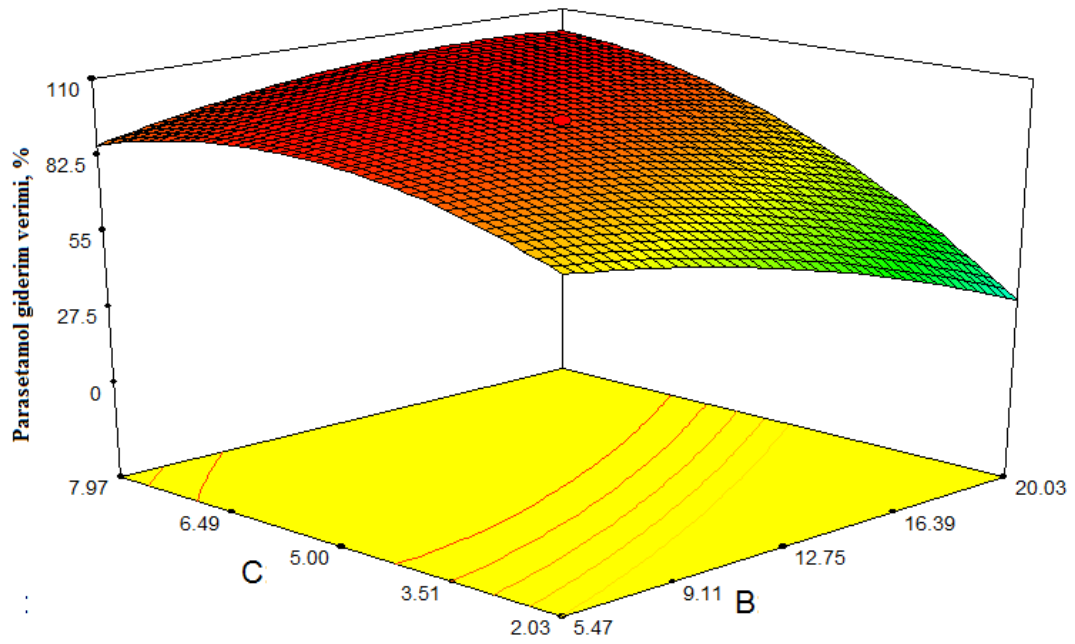
Tepki yüzey metodu analizi sonucu elde edilen regresyon eşitliğı üç boyutlu ve iki boyutlu kontur çizim ile ifade edilebilmektedir. Üç boyutlu ve kontur eğrileri Şekil 6.18.'de verilmiştir. Her bir eğride, bir değişken sıfır (0) seviyesinde korunurken iki faktörün etkisi verilmiştir.



Şekil 6.18. Parasetamol giderim veriminde; pH (A) ve parasetamol konsantrasyonu (B) ve biyojenik mangan oksit miktarının (C) etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri



Şekil 6.18. Parasetamol giderim veriminde; pH (A) ve parasetamol konsantrasyonu (B) ve biyogenik mangan oksit miktarının (C) etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri (devamı)

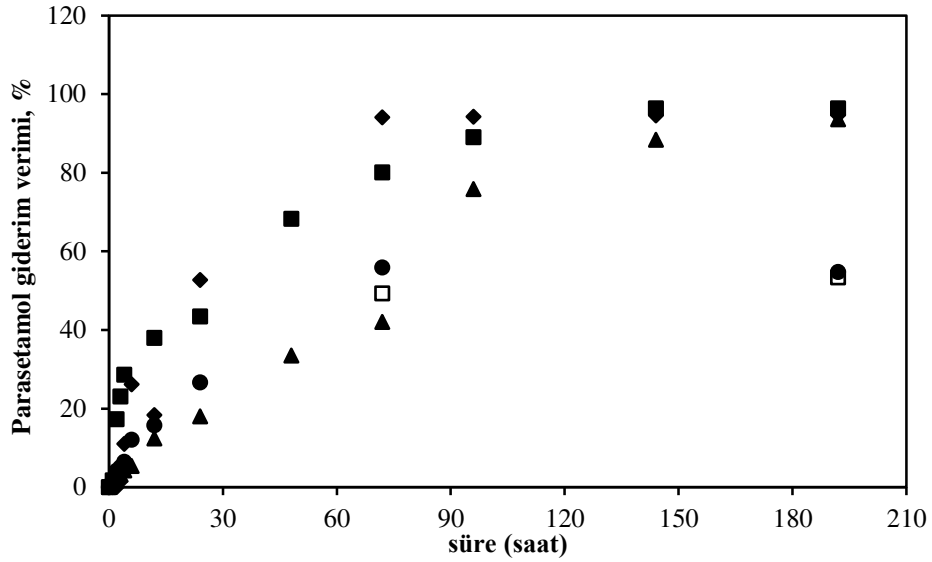


Şekil 6.18. Parasetamol giderim veriminde; pH (A) ve parasetamol konsantrasyonu (B) ve biyogenik mangan oksit miktarının (C) etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri (devamı)

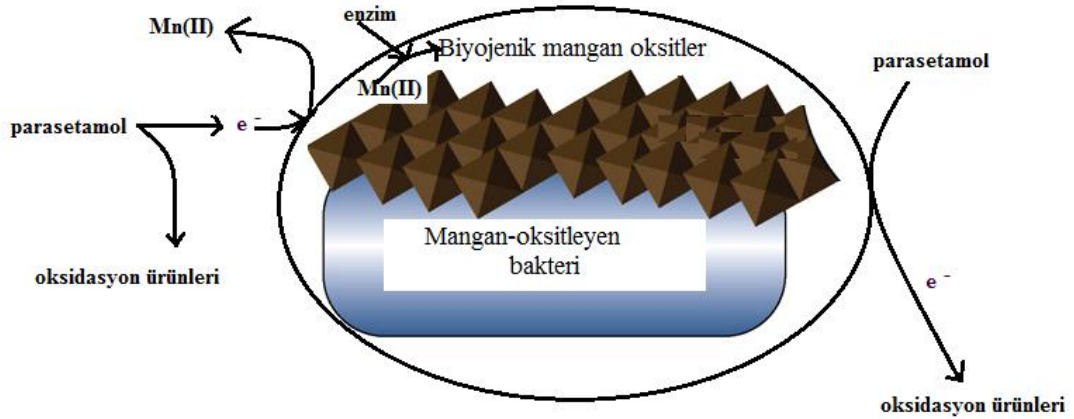
6.5. Parasetamol Giderim Mekanizması

Biyojenik mangan oksitler ile parasetamol gideriminde bakteriyel metabolizma, adsorpsiyon ve oksidasyonun önemini ortaya çıkarmak için *Pseudomonas putida* kültürü, ısı ile inaktive edilmiş *Pseudomonas putida* kültürü ve ısı (30 dakika otoklavla inaktivasyon) ve sodyum azid (20 mM NaN_3) ile inaktive edilmiş biyojenik mangan oksitler ile kontrol deneyleri yapılmış elde edilen sonuçlar Şekil 6.19.'da sunulmuştur. *Pseudomonas putida* kültürü ve ısı ile inaktive edilmiş *Pseudomonas putida* kültürü varlığında parasetamol giderim verimi sırasıyla % 54.7 ve 53.3 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç bakteriyel metabolizmanın parasetamol gideriminde bir öneminin olmadığını ve inaktive *Pseudomonas putida* hücrelerinde % 53 oranında parasetamolün adsorplandığını göstermektedir. Isı ve sodyum azid ile inaktive edilmiş biyojenik mangan oksitler varlığında parasetamol giderim verimleri % 94.5 ve 96.3 olarak belirlenmiştir. 10 mg/L parasetamol ve 5 g/L biyojenik mangan oksit içeren reaksiyon koşullarında parasetamol giderim verimi % 93.5'dir. Elde edilen bu sonuçlar ısı ve sodyum azid ile muamele sonucu biyojenik mangan oksitlerdeki mangan oksitleyen bakterilerin mikrobiyal aktivitesinin azalmasının parasetamol giderimini etkilemediğini ortaya çıkarmıştır. Ancak önceki çalışmalarda ısı ve azid ile inhibe olan mikrobiyal aktivitenin kirletici gideriminde önemli bir azalmaya sebep olduğu bulunmuştur (Tran vd., 2018). Bu çalışmalarda mangan oksidasyonu ve kirletici giderimi eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiş ve kirleticinin mangana bağlı degradasyonunda mikrobiyal aktivitenin etkisi ısı ve elektron taşınımı ile bağlantılı oksidasyonunun bilinen bir inhibitörü olan sodyum azid ilavesi ile test edilmiştir. Bizim çalışmada ise önceden oksitlenmiş biyojenik mangan oksitler kullanıldığı için bakterinin mikrobiyal aktivitesinin azalması giderim veriminde bir etkiye sebep olmamıştır. Biyojenik mangan oksitler ile parasetamol giderimi yüzeye bağımlı bir reaksiyondur ve yüzey reaktif bölgelerin sayısının artışıyla zenginleşmektedir. Organik kirleticiler önce oksit yüzeye adsorplanmakta ve öncü bir kompleks oluşmaktadır. Daha sonra elektronlar bu kompleks içine transfer olmakta ve oksidasyon ürünleri ve Mn (II) ortama salınmaktadır. Biyojenik mangan oksit ile parasetamol gideriminin reaksiyon ya da adsorpsiyon yolu gerçekleştiğini ortaya çıkarmak için zamana karşı örnekler alınmış ve santrifüjlenmiş, çöken kısma indirgeyici madde olarak askorbik asit (50 mg) eklenmiştir. Böylece biyojenik mangan oksitin yüzeyindeki parasetamol ekstrakte edilmiştir. Ancak biyojenik mangan oksitlerin yüzeyinde önemsiz miktarda parasetamol belirlenmiştir. Yukarıdaki sonuçlar; biyojenik mangan oksit yüzeyine adsorpsiyondansa oksidatif

parçalanmanın baskın olduğunu ve parasetamol oksidasyonundan sorumlu olan bir ya da iki elektronun aktarımı ile biyogenik mangan oksitlerin Mn (II)'e indirgenmesi içeren biyogenik mangan oksitlerle parasetamol giderim mekanizmasını ortaya çıkarmıştır (Şekil 6.20.).



Şekil 6.19. Farklı etkiler altında parasetamol giderimi (parasetamol kons: 10 mg/L, BMO: 5 g/L, pH: 7, ♦: otoklav ile muamele, ■: NaN₃ ile muamele, ▲: işlemsiz, ●: *P. putida*, □: *P. putida*+Otoklav)

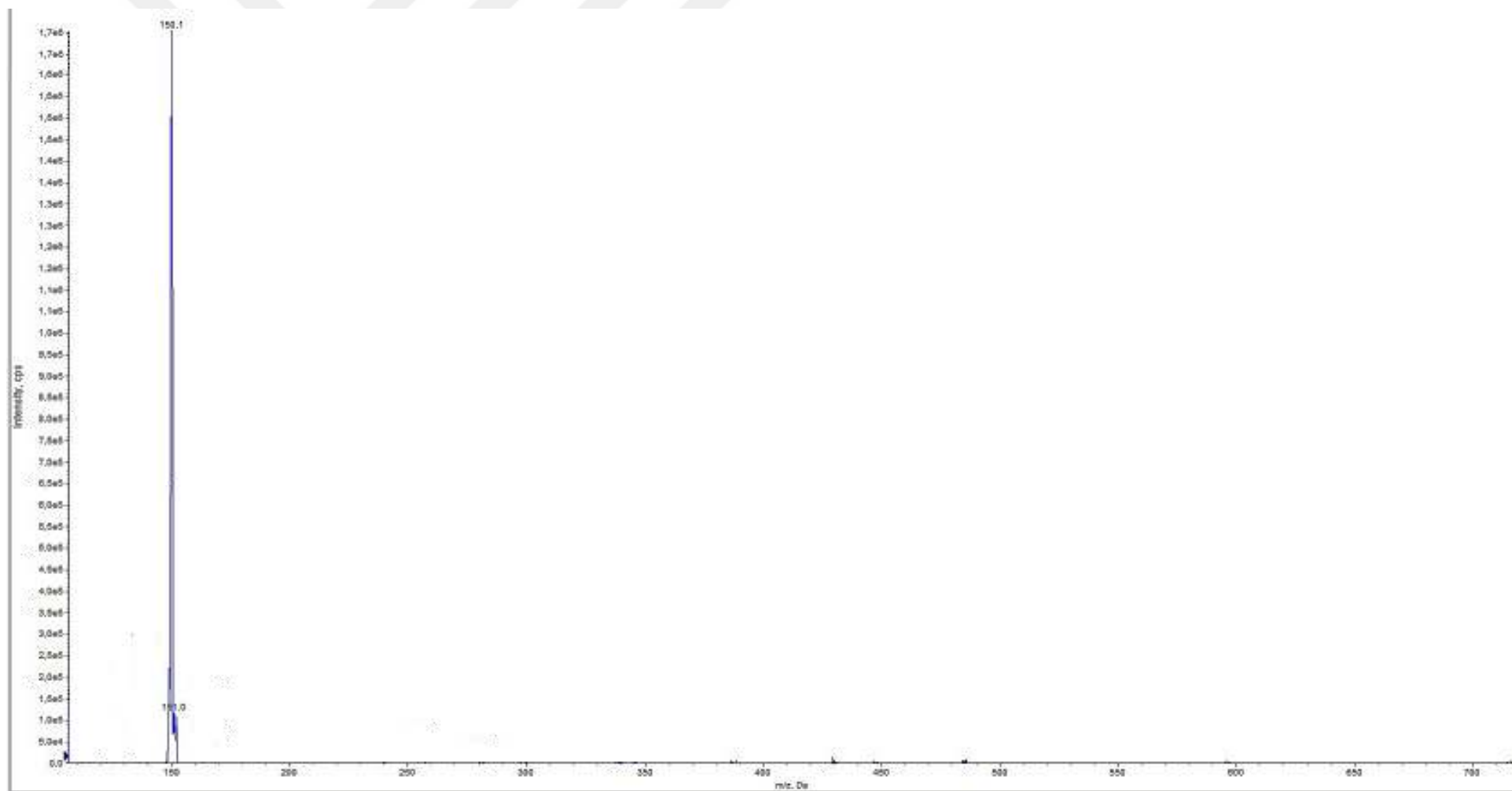


Şekil 6.20. Biyogenik mangan oksitlerle parasetamol gideriminin şematik gösterimi

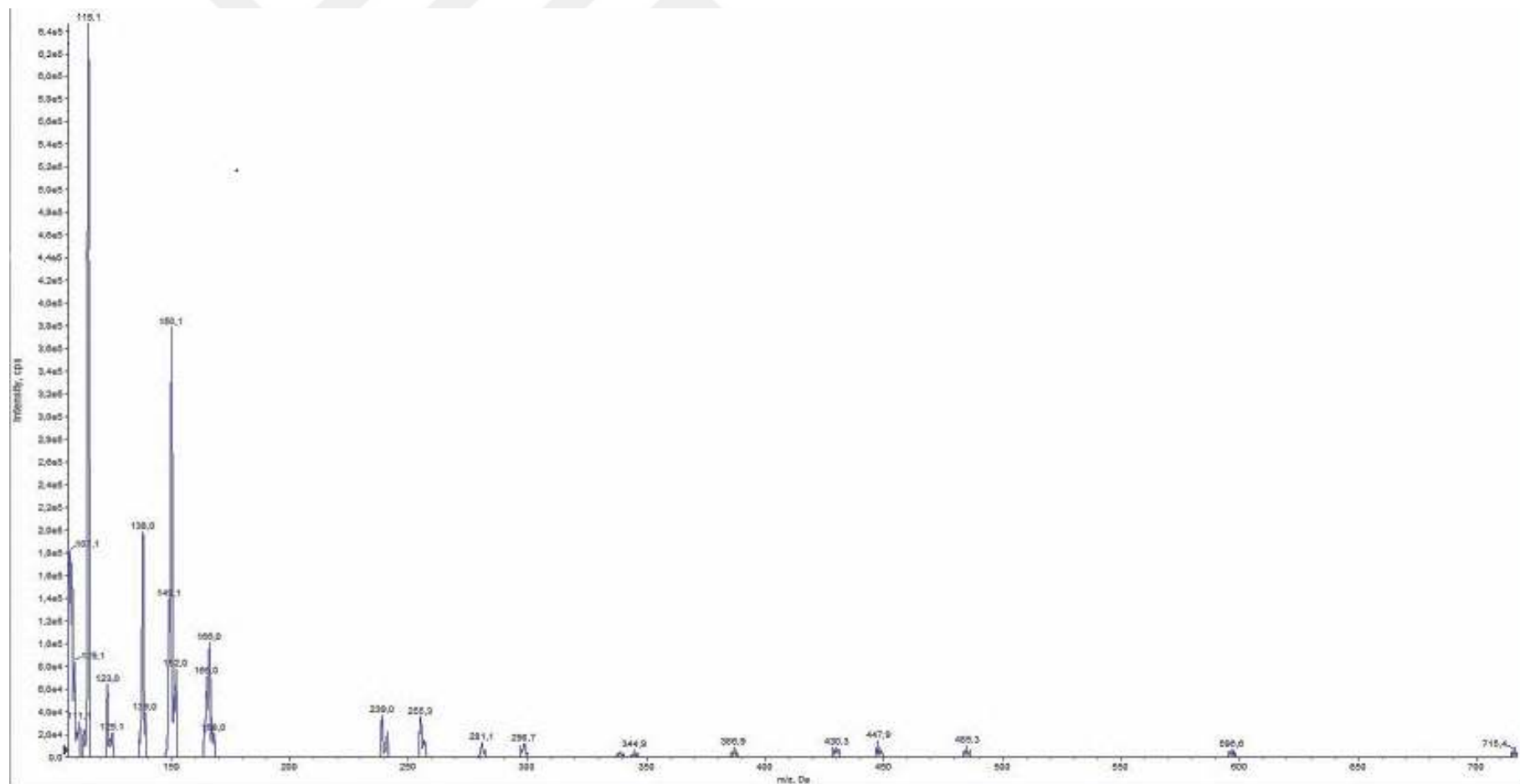
6.6. LC-MS/MS İle Parasetamol Dönüşüm Ürünlerinin Belirlenmesi

10 mg/L parasetamol konsantrasyonu ve 5 g/L biyogenik mangan oksit miktarı ile yapılan deneyde 192 saat sonra alınan numunenin analizi negatif iyonizasyon modunda LC-MSMS ile yapılmıştır. Bu teknik M-1 (M analitin moleküler ağırlığı) m/z değerli deprotonlanmış negatif iyonlar üretir (Lu vd., 2009; Xiao vd., 2013). Şekil 6.21, örneğin tipik bir kütle spektrumunu göstermektedir. 150 m/z pik değeri, çözeltide kalan parasetamole (M=151) karşılık gelir. Bu pik noktasına ek olarak, 108, 115, 123, 138, 166, 239, 256, 281, 298, 339, 344, 430, 448, 485, 597 ve 716 m/z değerlerine sahip pik noktaları bulunmuştur. 298, 448 ve 597 m/z olan pik noktalar, parasetamolün dimer, trimer ve tetrameri olan ana molekül çiftleşmesinin ilgili kütleleridir. Bu $nM-2(n-1)$ şablonunu takip eder. Bu; bu iyonların, 2-4 parasetamol molekülünün birleşmesinden kaynaklandığını gösterir. Biyogenik mangan oksitler, dimer oluşturmak için birbirleriyle ardışık olarak çift oluşturabilen serbest radikalleri oluşturacak substratın bir elektron oksidasyonuna aracılık edebilir. Radikal-radikal birleşmesi (çiftleşmesi), elimine edilen iki hidrojen atomu ile iki ana molekülün kovalent bağlanmasına neden olur. Çoğu durumda, bu tür bir birleştirme ürünü oksidatif birleşmenin hala bir substratıdır ve dolayısıyla daha yüksek seviyelerde oligomer ürünleri üreterek daha fazla birleştirme reaksiyonlarına girebilir. Birleştirme ürünlerinin moleküler ağırlıklarının bir $nM-2(n-1)$ modeli vardır. Kovalent bağ oluşumunun meydana geldiği parasetamol molekülünde reaktif bölgelerin belirlenmesi reaksiyon yollarının aydınlatılmasında kritik öneme sahiptir. Bir parasetamol molekülü, bir hidroksil grubu ile substitute olan bir benzen halka çekirdeği ve bir para pozisyonundaki bir asetamino grubunun azot atomundan oluşur (Lu vd., 2009; Xiao vd., 2013). Parasetamol yaygın konjuge bir sistemdir. Potansiyel olarak, böyle bir sistem bir elektron kaybederek oksidasyona duyarlıdır. (Lu vd., 2009). Dimer ve trimerin ikincil kütle spektrumları, birleştirme ürünlerinin yapılarını daha fazla açıklamak için Şekil 6.21.'de gösterilmiştir. Her ikisi de, Şekil 6.21.'de gösterildiği gibi, benzer desenler göstermiştir. 239, 256, 281, 339, 344, 430, 485 ve 716 m/z değerli pik noktaları, birleştirme ürünlerinin ilgili kütleleridir. Başlıca parçalanma yolları, ya bir su ya bir keten ya da bir asetik asit molekülünün elimine edilmesidir (sırasıyla (M-1-18), (M-1-42) ya da (M-1-60) m/z değerli parçalanma ürünleri). 281, 256 ve 239 m/z'li iyonlar, ana iyondan bir su molekülünün (M=18), bir ketene molekülünün ($H_2C=C=O$, M=42), ve bir asetik asit molekülünün (M-1-60) eliminasyonu ile üretildiğini gösterebilir (Xiao vd., 2013). Bu çalışmada parasetamolün dimer, trimer ve tetramerinin oluşumunun yanı sıra farklı reaksiyon

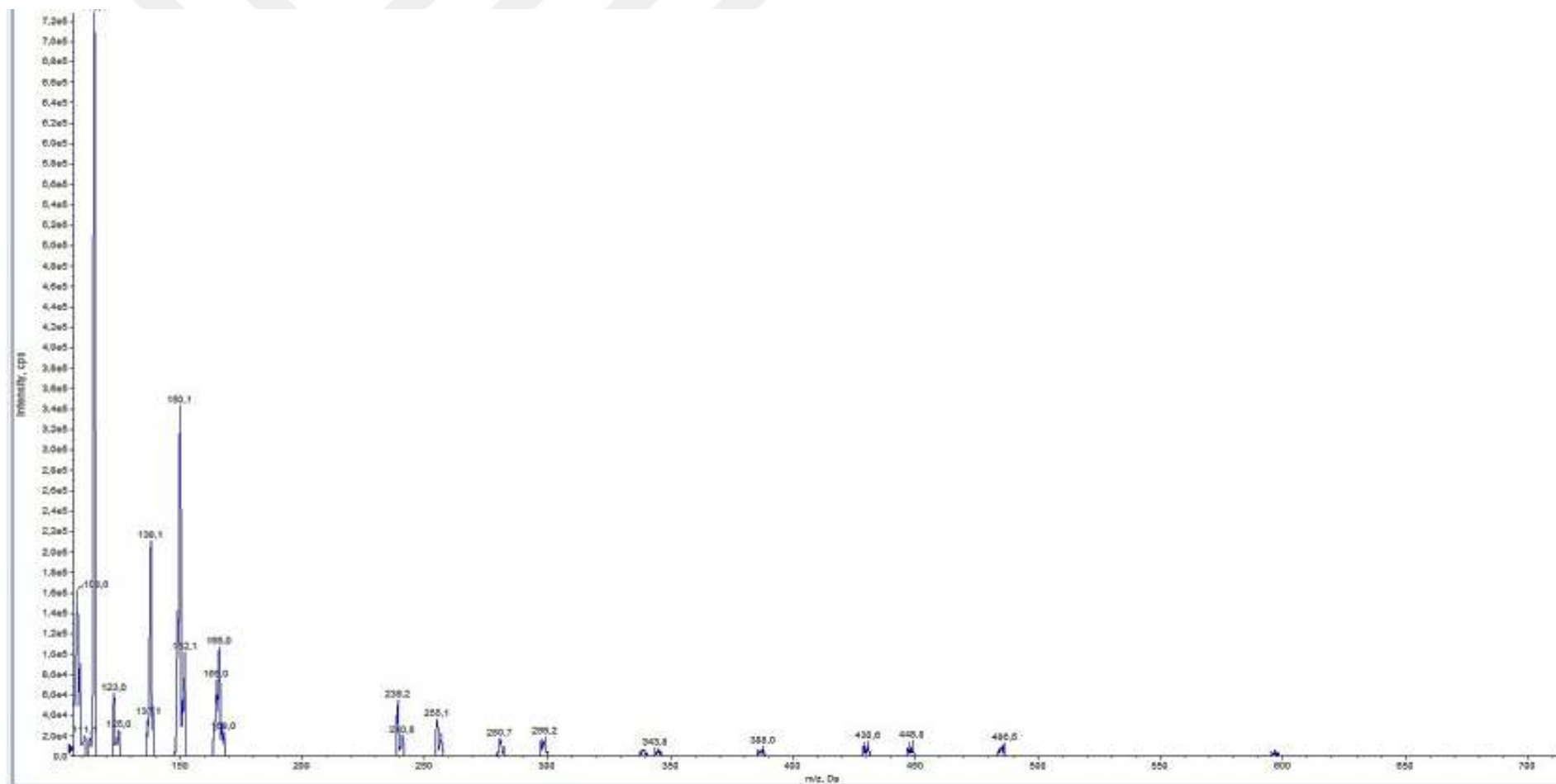
ürünleride gözlenmiştir. 166 m/z’li bir pik, benzen halkasının hidroksilasyonundan kaynaklanan ilgili ürün (3-hidroksiasetaminofen) kütlesi (M=167) olabilir. Parasetamol içindeki karbonil grubundan azot ve karbon arasındaki bağın parçalanması sonucu 4-aminofenol (M=109) oluşur. 108 m/z’li pik, bu reaksiyondan kaynaklanan 4-aminofenolün kütlesi olabilir. Parasetamolunhidrokinona dönüşümü parasetamolün fotodegradasyonunda ana yol olarak önerilmiştir. Ancak bu çalışmada hidrokinon gözlenmemiştir. Hidrokinonun metilasyonu ayrıca 4-metoksifenol (M=124) ve 1,4-dimetoksibenzen (M=138) ile sonuçlanabilir. 123 ve 138 bir m/z’li pik noktalar, bu ara ürünlerin ilgili kütleleri olabilir (Li vd., 2014). Butenedioik asit (M=116) parasetamolün fotokatalitik bozunması sırasında aromatik halkaların bölünmesinden kaynaklanabilir (Yang vd., 2009). 115 m/z’li pik noktası, bunun ilgili kütlesi olabilir. Bu sonuç, parasetamolün aromatik halkasının bölündüğünü de doğrulamaktadır.



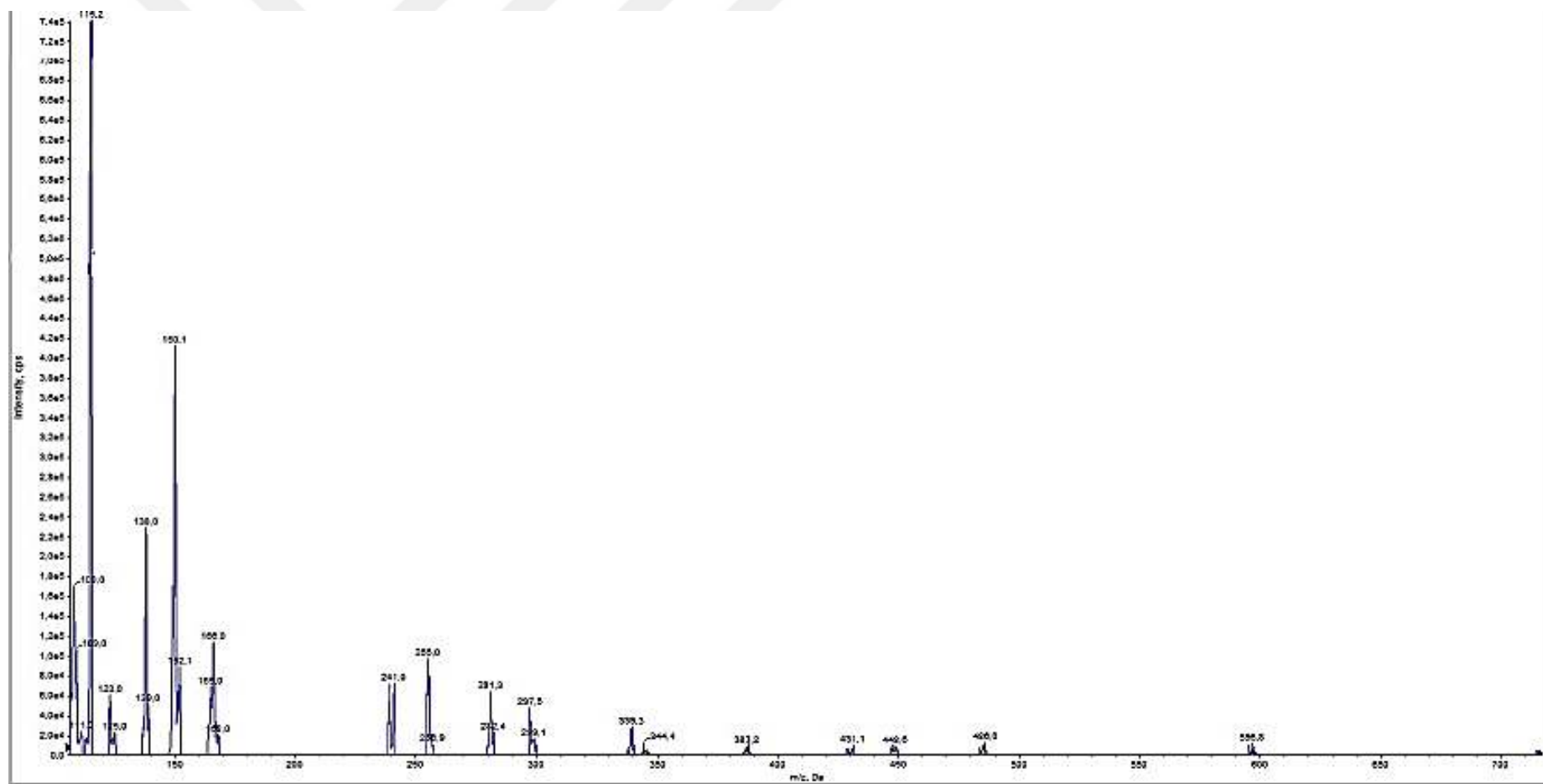
(a)



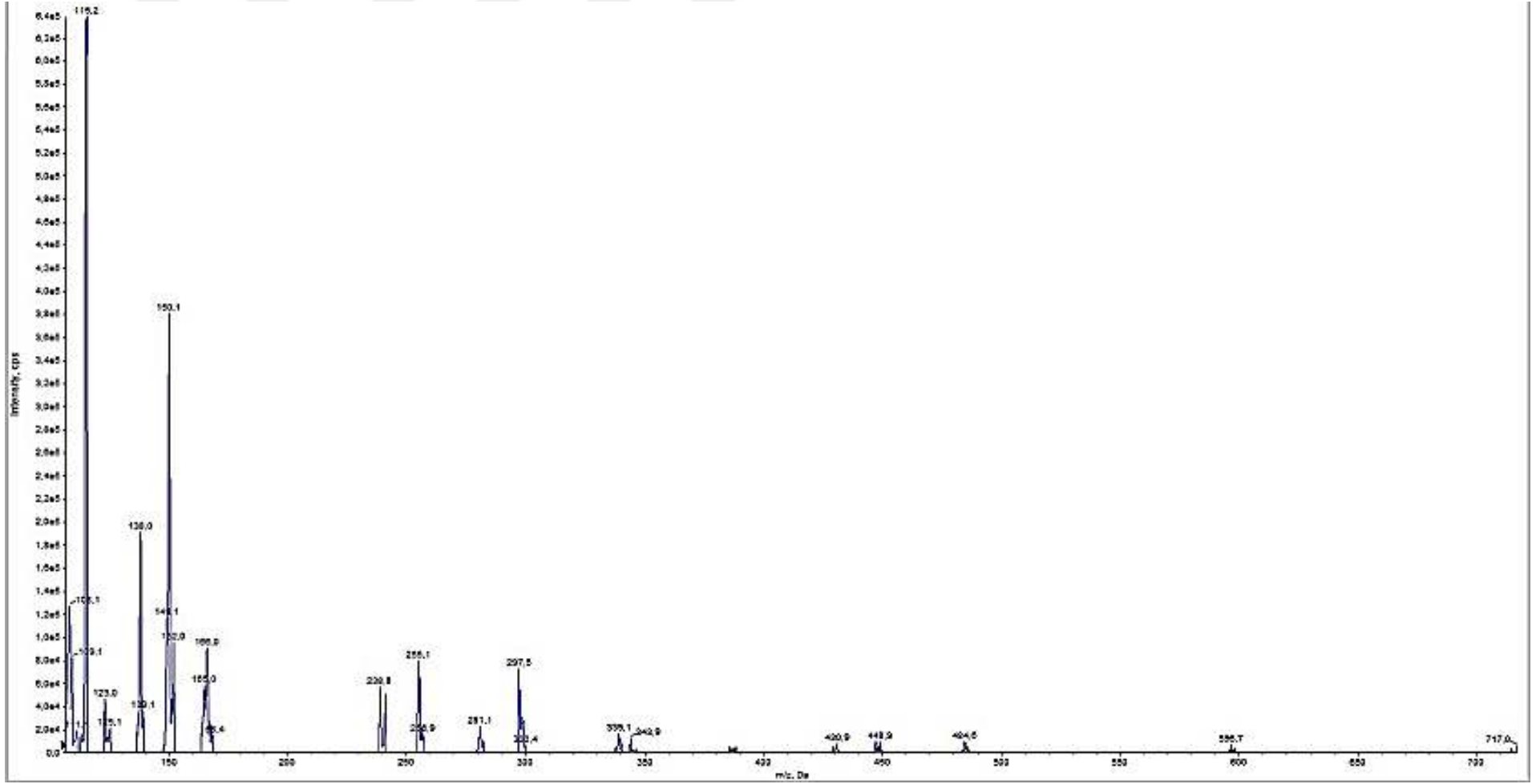
(b)



(c)



(d)



(e)

Şekil 6.21. Biyojenik mangan oksitlerle parasetamol giderimin (a) 0., (b) 2., (c) 4., (d) 6., (e) 8. gününde oluşan ara ürünlerin LCMSMS kromatogramları

7. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sunulan tez çalışmasında *P. putida* tarafından üretilen mangan oksitler ile sulu ortamdan farmasotik giderimi incelenmiştir.

Zengin besiyerinde üretilen bakteri kültürü biyogenik mangan oksit üretim ortamına aktarılmıştır. Bakterilerin mangana alıştırılması aşamalı olarak bir dizi deney ile gerçekleştirilmiştir. İlk olarak biyogenik mangan oksit üretim ortamı hazırlanmış ve bakteri kültürü bu ortama aktarılarak 28 °C’de inkübe edilmiştir. 24 saat sonra 1 mg/L Mn (II) eklenmiş ve inkübasyona devam edilmiştir. İkinci aşamada, 1 mg/L Mn içeren ortamda inkübe edilen kültür, hazırlanan biyogenik mangan oksit üretim ortamına aktarılmış, 24 saatlik inkübasyondan sonra 2 mg/L Mn (II) ilave edilmiş ve inkübasyona devam edilmiştir. Böylece bakteri, mangana alıştırılmıştır.

Yaptığımız çalışmanın bir diğer aşamasında mangana alıştırılan bakterinin hangi şartlarda optimum oksidasyon gerçekleştirdiği incelenmiş ve uygun pH’ın 7, uygun sıcaklığın ise 28 °C olduğu belirlenmiştir.

Bir sonraki aşamada ise ilave edilen Mn (II) konsantrasyonunun mangan oksidasyonu üzerinde nasıl bir etki yapacağı incelenmiştir. Oksidasyon için optimum şartlar olan pH 7 ve 28 °C’de, 5-100 mg/L arasında değişen 6 farklı Mn (II) konsantrasyonunda deneme yapılmıştır. En yüksek Mn (II) oksidasyonu 5 mg/L’de % 91,4 olarak belirlenmiştir.

Optimum ortamda üretilen biyogenik mangan oksit XRD, FTIR, SEM-EDX ve XPS teknikleriyle karakterize edilmiştir.

Bakteri üretimi ve üretilen bakterinin manganı oksitlemesi için optimum şartlar araştırıldıktan sonra parasetamol giderimi üzerine pH, biyogenik mangan oksit miktarı ve parasetamol konsantrasyonunun etkisi belirlenmiştir.

Yapılan incelemeler sonucu ;

- Başlangıç parasetamol konsantrasyonu 2 mg/L, biyogenik mangan oksit konsantrasyonu 1 g/L şartlarında pH 5-8 aralığında yapılan deneylerde en yüksek giderim verimi 216 saat sonra % 68,7 ile pH 7 de elde edilmiştir.

- Başlangıç parasetamol konsantrasyonu 2 mg/L, çözelti pH’ı 7 iken, 0.5-5 g/L arasında değişen 5 farklı miktarda biyogenik mangan oksit miktarı incelenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda 216 saat sonra % 100 parasetamol giderimi 5 g/L’de gerçekleşmiştir.

- 0.5 ila 10 mg/L arasında değişen beş farklı başlangıç parasetamol konsantrasyonu pH 7 ve biyojenik mangan oksit miktarı 5 g/L miktarında incelenmiş ve 0.5 ve 1 mg/L parasetamol konsantrasyonlarında tam giderim 192 saat sonra, 2 mg/L parasetamol konsantrasyonunda tam giderim 216 saat sonra, 5 ve 10 mg/L parasetamol konsantrasyonlarında ise 216 saat sonra giderim verimleri sırasıyla %93.7 ve %93.5 bulunmuştur.

Çalışmanın son aşamasında ise, ortam bileşenleri Tepki Yüzey Metodu ile Merkezi Kompozit Tasarım kullanılarak optimize edilmeye çalışılmıştır. Burada 2³ faktöriyel dizayn 20 deneyle tamamlanmıştır. pH (A), parasetamol konsantrasyonu (B) ve biyojenik mangan oksit konsantrasyonu (C) bağımsız değişkenler olarak seçilmiş ve deneyler yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda nötral pH, düşük parasetamol konsantrasyonu ve yüksek biyojenik mangan oksit konsantrasyonunda maksimum giderim verimi elde edilmiştir.

Biyojenik mangan oksitler ile parasetamol gideriminde bakteriyel metabolizma, adsorpsiyon ve oksidasyonun önemini ortaya çıkarmak için *Pseudomonas putida* kültürü, ısı ile inaktive edilmiş *Pseudomonas putida* kültürü ve ısı (30 dakika otoklavla inaktivasyon) ve sodyum azid (20 mM NaN₃) ile inaktive edilmiş biyojenik mangan oksitler ile kontrol deneyleri yapılmış ve biyojenik mangan oksit yüzeyine adsorpsiyondansa oksidatif parçalanmanın baskın olduğunu ortaya çıkarılmıştır.

10 mg/L parasetamol konsantrasyonu ve 5 g/L biyojenik mangan oksit miktarı ile yapılan deneyde 192 saat sonra alınan numunenin analizi negatif iyonizasyon modunda LC-MSMS ile yapılmıştır. Bu çalışmada parasetamolün dimer, trimer ve tetramerinin oluşumunun yanı sıra farklı reaksiyon ürünleri de gözlenmiştir.

Daha sonra yapılacak çalışmalarda üretilen mangan oksit çeşitli metotlarla muamele edilerek (örneğin termal olarak) çeşitli kirleticilerin giderimi çalışmalarında kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- Barboza N., Morais M.C.A., Queiroz P.S., Amorim S.S., Guerra-sa R. and Leao V.A.** 2017. High manganese tolerance and bipoxidation ability of *Serratia marcescens* isolated from manganese mine water in Minas Gerais, Brazil, *Frontiers in Microbiology*, volume 8, article 1946.
- Beyazıt M., Oğuz, B.** 1998. Mühendisler İçin İstatistik, Birsen Yayınevi, İstanbul.
- Bohu T., Santelli C.M., Akob D.M., Neu T.R., Ciobota V., Rösch P., Popp J., Nietzsche S., Küsel K.** 2015. Characterization of pH dependent Mn II oxidation strategies and formation of a bixbyite-like phase by *Mesorhizobium australicum* T-G1, *Frontiers in Microbiology*, 6: 734. doi: 10.3389/fmicb.00734.
- Boogerd, F.C., De Vrind, J.P.M.** 1987. Manganese oxidation by *Leptothrix discophora*, *Journal of Bacteriology*, 169(2), 489-494.
- Caspi R.** 1996. A dissertation submitted in partial satisfaction of the requirements for the degree Doctor of Philosophy in Marine Biology, Molecular Biological Studies of Manganese Oxidizing Bacteria, *University Of California, San Diego*.
- ÇŞB.** 2013. Türkiye'de Avrupa Birliği Çevre Mevzuatı İle Uyumlu Tehlikeli Atık Yönetimi. Çevre ve Şehircilik Bakanlığı.
- Demiryürek O.,** 2009. Polyester/Viskon Karışımli Open-End Rotor İplik Özelliklerinin Yapay sinir Ağları ve İstatistiksel Modeller Kurularak Tahmin Edilmesi, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalı, Adana.
- Du, J., Bao, J., Liu, Y., Ling, H., Zheng, H., Kim, S.H., Dionysiou, D.D.** 2016. Efficient activation of peroxymonosulfate by magnetic Mn-MGO for degradation of bisphenol A. *J. Hazard. Mater.*, 320, 150–159.
- Duran N., Marcato P.D., Duran M., Yadav A., Gade A., Rai M.** 2011. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants, *Applied Microbiol. Biotechnol*, 90, 1609-1624.
- Erşan M.,** 2011. *Rhizopus delemar* ile Lipaz ve Asit Fosfataz Enzimlerinin Üretimi ve Ağır Metal Biyobirikiminin Eş Zamanalı Olarak İncelenmesi, Doktora Tezi, Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas
- Forrez I., Carballa M., Fink G., Wick A., Hennebel T., Vanhaecke L., Ternes T., Boon N., Verstraete W.** 2011. Biogenic metals for the oxidative and reductive removal of pharmaceuticals, biocides and iodinated contrast media in a polishing membrane bioreactor, *Water Research*, **45**, 1763-1773.
- Forrez I., Carballa M., Verbeken K., Vanhaecke L., Schlüsener M., Ternes T., Boon N., Verstraete W.** 2010. Diclofenac Oxidation By Biogenic Manganese Oxides, *Environ. Sci. Technol* **44**, 3449–3454.
- Forrez I., Carballa M., Verbeken K., Vanhaecke L., Schlüsener M., Ternes T., Boon N., Verstraete W.** 2010. Diclofenac oxidation by biogenic manganese oxides, *Environmental Science and Technology*, **44**, 3449-3454.
- Francis M.** 2011. Biologically produced manganese oxides Bio-MnOx and silver nanoparticles Bio-Ag0 for the catalytic degradation of organic micropollutants, Master Thesis, Universiteit Gent, Faculty of Sciences, Department of Biochemistry and Microbiology, Belgium.

- Furgal K.M., Meyer R.L., Bester K.** 2015. Removing selected steroid hormones, biocides and pharmaceuticals from water by means of biogenic manganese oxide nanoparticles *in situ* at ppb levels, *Chemosphere*, **136**, 321-326..
- Gönen F., Aksu Z.** 2009. Predictive expressions of growth and Remazol Turquoise Blue- G reactive dye bioaccumulation properties of *Candida utilis*, *Enzyme and Microbial Technology* 45, 15–21.
- Hargreaves J.S.J., Alharthi A.I.** 2015. Biogenic and bio-structured inorganic materials in heterogeneous catalysis: a brief review, *J Chem Technol Biotechnol*, Baskıda.
- Hennebel T., De Gusseme B., Boon N., Verstraete W.** 2008. Biogenic metals in advanced water treatment, *Trends in Biotechnology*, **272**, 90-98.
- Jiang S., Kim D-G., Kim J., Ko S-O.** 2010. Characterization of the Biogenic Manganese Oxides Produced by *Pseudomonas putida* strain MnB1, *Environ. Eng. Res.*,154: 183-190.
- Jinjun Tu, Zhendong Yang, Chun Hu, Jiuhui Qu,** 2014. Characterization and reactivity of biogenic manganese oxides for ciprofloxacin oxidation, *Journal of Environmental Sciences* 26, 1154–1161
- Kaushik R., Saran S., Isar J., Saxena R.K.,** 2006. Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 40, 121–126.
- Kazuhiro Toyoda, Bradley M. Tebo,** 2016. Kinetics of MnII oxidation by spores of the marine Bacillus sp. SG-1, *Geochimica et Cosmochimica Acta* 189, 58–69
- Kevin W. Mandernack, Jeffrey Post, And Bradley M. Tebo,** 1995. Manganese mineral formation by bacterial spores of the marine Bacillus, strain SG-1: Evidence for the direct oxidation of Mn II to Mn IV, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 59, No. 21, pp. 4393-4408.
- Kim, D.-G., Jiang, S., Jeong, K., Ko, S.-O.,** 2012. Removal of 17 α -ethinylestradiol by biogenic manganese oxides produced by the *Pseudomonas putida* strain MnB1, *Water Air Soil Pollution*, **223**, 837–846.
- Koç B., Kaymak-Ertekin F.,** 2009. Yanıt Yüzey Yöntemi ve Gıda İşleme Uygulamaları, *Derleme/Review*, Gıda 3, 1-8.
- Larsen E.I., Lindsay I., Alastair S., McEwan G.** 1999. ManganeseII adsorption and oxidation by whole cells and a membrane fraction of *Pedomicrobium* sp. *ACM* 3067, *Arch Microbiol* 171: 257–264.
- Liang G., Yang Y., Wu S., Jiang Y., Xu Y.** 2017. The generation of biogenic manganese oxides and its application in the removal of AsIII in groundwater, *Environ Sci Pollut Res*, 24: 17935–17944.
- Liao, S., Zhou, J., Wang, H., Chen, X., Wang, H., Wang, G.,** 2013. Arsenite oxidation using biogenic manganese oxides produced by a deep-sea manganese-oxidizing bacterium *Marinobacter* sp. Mn-17-9, *Geomicrobiology Journal*, **30**, 150–159.
- Liming Yang, Liya E. Yu, And, Madhumita B. Ray,** 2009. Photocatalytic Oxidation of Paracetamol: Dominant Reactants, Intermediates, and Reaction Mechanisms, *Environ. Sci. Technol* 43, 460–465.
- Liu Z., Wang J., Qian S., Wang G., Wang J., Liao S.** 2017. Carbofuran Degradation by Biogenic Manganese Oxides, *Bull Environ Contam Toxicol* 98: 420–425.

- Mandal, D., Bolamder, M.E., Mukhopadhyay, D., Sarkar, G., Mukherjee, P.,** 2006. The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application, *Applied Microbiol. Biotechnol*, **69**, 485-492.
- Mandernack, K.W., Post, J., Tebo, B.M.** 1995. Manganese mineral formation by bacterial spores of the marine *Bacillus*, strain SG-1: Evidence for the direct oxidation of Mn (II) to Mn (IV) , *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 59, No. 21, pp. 4393-4408.
- Meerburg, F., Hennebel, T., Vanhaecke, L., Verstraete, W., Boon, N.** 2012. Diclofenac and 2-anilinophenylacetate degradation by combined activity of biogenic manganese oxides and silver, *Microbial Biotechnology*, 53, 388–395.
- Meng Y.-T., Zheng Y.-M., Zhang L.-M., He J.-Z.** 2009. Biogenic Mn oxides for effective adsorption of Cd from aquatic environment, *Environmental Pollution*, 157, 2577-2583.
- Montgomery D.C.** 2009. Design And Analysis Of Experiments, Arizona State University, Seventh Edition, John Wiley & Sons, Inc.
- Narayanan K.B., Sakthivel N.** 2010. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes, *Advances in Colloid and Interface Science*, **156**, 1-13.
- Nelson Y.M., Lion L.W., Ghiorse W.C., Shuler M.L.** 1999. Production of biogenic Mn oxides by *Leptothrix discophora* SS-1a chemically defined growth medium and evaluation of their Pb adsorption characteristics, *Applied and Environmental Microbiology*, 175-180.
- Pantidos N., Horsfall L.E.** 2014. Biological synthesis of metallic nanoparticles by bacteria, fungi and plants, *Nanomedicine and Nanotechnology*, **55**, 1-10.
- Pareek N., Singh R.P., Ghosh S.** 2011. Optimization of medium composition for enhanced chitin deacetylase production by mutant *Penicillium oxalicum* SAEM-51 using response surface methodology under submerged fermentation, *Process Biochemistry* 46, 1693-1697.
- Sabirova J.S., Cloetens L.F.F., Vanhaecke L., Forrez I., Verstraete W., Boon N.** 2008. Manganese-oxidizing bacteria mediate the degradation of 17 α -ethinylestradiol, *Microbial Biotechnology*, 16, 507–512.
- Schrofel A., Kratošova G., Šafarik I., Šafarikova M., Raška I., Šor L.M.** 2014. Applications of biosynthesized metallic nanoparticles – A review, *Acta Biomaterialia* 10, 4023–4042.
- Sinh A., Singh V.N., Mehta B.R., Khare S.K.** 2011. Synthesis and characterization of monodispersed orthorhombic manganese oxide nanoparticles produced by *Bacillus* sp. cells simultaneous to its bioremediation, *Journal of Hazardous Materials* 192, 620–627.
- Şen Z.,** 2002. İstatistik Veri İşleme Yöntemleri (Hidroloji ve Meteoroloji), Su Vakfı Yayınları, İstanbul.
- Tani Y., Ohashi M., Miyata N., Seyama H., Iwahori K., Soma M.** 2004. Sorption of CoII, NiII, and ZnII on Biogenic Manganese Oxides Produced by a Mn-Oxidizing Fungus, Strain KR21-2, *Journal of Environmental Science and Health Part A—Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* Vol. A39, No. 10, pp. 2641–2660.
- Tebo B.M., Bargar J.R., Clement B.G., Dick G.J., Murray K.J., Parker D., Verity R., Webb S.M.** 2004. Biogenic manganese oxides: Properties and mechanisms of formation, *Annual Reviews of Earth and Planetary Science*, 32, 287–328.

- Tebo B.M., Ghiorse W.C., van Waasbergen L.G., Siering P.L., Caspi R.** 1997. Bacterially mediated mineral formation: Insights into manganese II oxidation from molecular genetic and biochemical studies, in *Geomicrobiology: Interactions Between Microbes and Minerals*, Banfield, J.F. and Nealson, K.H., Eds., Mineralogical Society of America, Washington, D.C., p. 225.
- Toyoda, K., Tebo, B.M.** 2016. Kinetics of Mn (II) oxidation by spores of the marine *Bacillus* sp. SG-1, *Geochimica et Cosmochimica Acta* 189, 58–69
- Thakkar K.N., Mhatre S.S., Parikh R.Y.** 2010. Biological synthesis of metallic nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6, 257–262.
- Tran T.N., Kim D-G., Ko S-O.** 2018. Synergistic effects of biogenic manganese oxide and MnII-oxidizing bacterium *Pseudomonas putida* strain MnB1 on the degradation of 17 α -ethinylestradiol, *Journal of Hazardous Materials* 344, 350–359.
- Tu J., Yang Z., Hu C., Qu J.** 2014. Characterization and reactivity of biogenic manganese oxides for ciprofloxacin oxidation, *Journal of Environmental Sciences*, 26, 1154–1161.
- Wang R., Wang S., Tai Y., Tao R., Dai Y., Guo J., Yang Y., Duan S.** 2017. Biogenic manganese oxides generated by green algae *Desmodesmus* sp. WR1 to improve bisphenol A removal, *Journal of Hazardous Materials* 339, 310–319.
- Wang W., Shao Z., Liu Y., Wang G.** 2009. Removal of multi-heavy metals using biogenic manganese oxides generated by a deep-sea sedimentary bacterium—*Brachybacterium* sp. strain Mn32, *Microbiology*, 155, 1989–1996.
- Wang, F., Dai, H., Deng, J., Bai, G., Ji, K., Liu, Y.** 2012. Manganese oxides with rod-, wire-, tube-, and flower-like morphologies: highly effective catalysts for the removal of toluene. *Env. Sci Technol.*, 46, 4034–4041.
- Wang, Y., Xie, Y., Sun, H., Xiao, J., Cao, H., Wang, S.** 2016. 2D/2D nano-hybrids of γ -MnO₂ on reduced graphene oxide for catalytic ozonation and coupling peroxymonosulfate activation. *J. Hazard. Mater.*, 301, 56–64.
- Wu R., Wu H., Jiang X., Shen J., Faheem M., Sun X., Li J., Han W., Wang L., Liu X.** 2017b. The key role of biogenic manganese oxides in enhanced removal of highly recalcitrant 1,2,4-triazole from bio-treated chemical industrial wastewater, *Environ Sci Pollut Res* 24: 10570–10583.
- Wu, Y., Feng, R., Song, C., Xing, S., Gao, Y., Ma, Z.** 2017a. Effect of reducing agent on the structure and activity of manganese oxide octahedral molecular sieve OMS-2 in catalytic combustion of o-xylene. *Catal. Today*, 281, 500–506.
- Xiao H., Song H., Xie H., Huang W., Tan J., Wu J.** 2013. Transformation of acetaminophen using manganese dioxide-mediated oxidative processes: Reaction rates and pathways, *Journal of Hazardous Materials* 250–251, 138–146.
- Xiaoye C., Xianci L., Huan L., Juan L., Wanli X., Rui Z., Jianjun L.** 2013. Oxidation and mineralization of Mn²⁺ ions mediated by *pseudomonas putida*: insights from an experimental study, *Acta Geologica Sinica*, vol. 91 no 4 pp. 1276–1285.
- Yang, L., Yu, L.E., Ray, M.B.** 2009. Photocatalytic Oxidation of Paracetamol: Dominant Reactants, Intermediates, and Reaction Mechanisms, *Environ. Sci. Technol* 43, 460–465.
- Zeiner C.A., Lion L.W., Shuler M.L., Ghirose W.C., Hay A.** 2006. Cycling of biogenic Mn-oxides in a model microbial predator-prey system, *Geomicrobiology Journal*, 23, 37–43.

- Zhang J., Lion L.W, Nelson Y.M, Shuler M.L, William C.** 2002. Kinetics Of MnII Oxidation By *Leptothrix discophora* SS1, *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, Vol. 65, No. 5, Pp. 773–781,.
- Zhou D., Kim D., Ko S.** 2015. Heavy metal adsorption with biogenic manganese oxides generated by *Pseudomonas putida* strain MnB1, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 24, 132–139.



ÖZGEÇMİŞ

Semih CÖMERT 1991’de Elazığ’da doğdu. İlkokulu Dumlupınar İ.Ö.O, ortaokulu Mezre İ.Ö.O’da, liseyi Çubukbey Anadolu Lisesinde okudu. 2009 yılında Fırat Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümünde başladığı lisans öğrenimini 2014 yılında tamamladı. Fırat Üniversitesinde 2016 yılında başladığı İş Sağlığı ve Güvenliği tezsiz yüksek lisansını 2017 senesinde bitirdi. 2015 yılında Fırat Üniversitesinde Çevre Mühendisliğinde başladığı tezli yüksek lisansı devam etmektedir.

