

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KALKOPİRİT, PİRİT VE PİROTİT MİNERALLERİNİN *ACIDITHIOBACILLUS*
FERROOXIDANS İLE BİYOLİÇİ

AYŞE TUBA KOCAMAN

DOKTORA TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI

DANIŞMAN
PROF. DR. MUSTAFA CEMEK

İSTANBUL, 2016

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KALKOPİRİT, PİRİT VE PİROTİT MİNERALLERİNİN *ACIDITHIOBACILLUS*
FERROOXIDANS İLE BİYOLİÇİ**

Ayşe Tuba KOCAMAN tarafından hazırlanan tez çalışması 14.04.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Mustafa CEMEK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

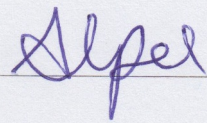
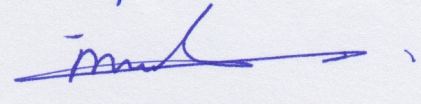
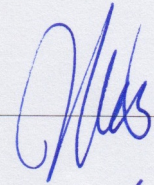
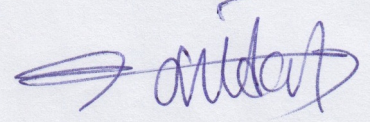
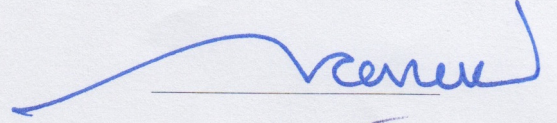
Prof. Dr. Mustafa CEMEK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. İbrahim IŞILDAK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Muhsin KONUK
Üsküdar Üniversitesi

Doç. Dr. Fatih ABASIYANIK
Fatih Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Alper YILMAZ
Yıldız Teknik Üniversitesi





Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün 2014-07-04-DOP03 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

“Kalkopirit, Pirit ve Pirotit Minerallerinin *Asidithiobacillus ferrooxidans* ile Biyoliçi” adlı bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü ve Güney Kaliforniya Üniversitesi (USC) Biyoloji Bilimleri Bölümü bünyesinde bulunan Center for Dark Energy Biosphere (C-DEBI) tarafından sağlanan destekle, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalında “Doktora tezi” olarak hazırlanmıştır.

Araştırma konusunun seçiminde ve çalışmaların planlanıp değerlendirilmesinde ufuk açıcı önerileri ile yol gösteren, bilgi ve tecrübelerini paylaşan değerli danışmanım Prof. Dr. Mustafa CEMEK’e şükranlarımı sunarım. Tez izleme komitemde bulunan Prof. Dr. İbrahim IŞILDAK ve Doç. Dr. Fatih ABASIYANIK’a değerli katkılarından dolayı teşekkür ederim.

USC Biyoloji Bilimleri Bölümünde çalışmalarımın büyük bir kısmını gerçekleştirdiğim süre boyunca danışmanlığımı yapan ve zor zamanlarımda cesaretlendiren Prof. Dr. Katrina Jane EDWARDS’a teşekkürü bir borç bilirim. İyon ölçüm metotları konusundaki yardımlarından dolayı Prof. Dr. James MOFFETT’a, laboratuvar çalışmalarım sırasında deneyimlerinden yararlandığım Dr. Roman BARCO ve Dr. Jason SYLVAN’a teşekkür ederim.

Tez çalışmasında kullanılan minerallerin XRD ve XRF analizlerini gerçekleştiren Prof. Dr. Sabriye PİŞKİN’e ve asistanlarına teşekkür ederim.

Biyoliç çalışmalarının endüstriyel uygulamalarını yerinde görmek amacıyla Arizona’da bulunan MORENCI bakır madenine yaptığım ziyaret sırasında, rehberlik görevini üstlenen ve endüstriyel biyoliç uygulamalarının ayrıntılarını paylaşan Freeport-McMoran teknoloji merkezi mühendislerinden Alex TSHIBIND’a teşekkürlerimi sunarım.

Maddi ve manevi destekleriyle daima yanımda olan aileme, özellikle akademik hayatımda desteğini her zaman hissettiğim rahmetli babama minnet ve şükranlarımı sunarım.

Mart, 2016

Ayşe Tuba KOCAMAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ	vii
KISALTMA LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xi
ÖZET	xii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	6
1.3 Orijinal Katkı.....	7
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİLER	8
2.1 Kayaçların Ve Minerallerin Oluşumu	8
2.2 Sülfürlü Minerallerin Oluşumu.....	9
2.2.1 Pirit.....	10
2.2.2 Pirotit	10
2.2.3 Kalkopirit.....	10
2.3 Sülfürlü Minerallerin Çözünme Mekanizmaları	11
2.3.1 Tiyosülfat Mekanizması.....	12
2.3.2 Polisülfüt Mekanizması	12
2.4 Geleneksel Liç Metotları	13
2.4.1 Hidrometalurji.....	13
2.4.2 Pirometalurji	14
2.5 Biyoliç.....	15
2.5.1 Bakteri-Mineral Etkileşimi	15
2.5.4 Tarihi Bilgi.....	18

2.5.5	Biyoliç Yönteminin Avantaj ve Dezavantajları	19
2.5.6	Güncel Biyoliç Teknikleri	20
2.6	Bakterilerin Gelişme Koşulları	23
2.7	Bakterilerin Biyoliçteki Rolü	24
2.8	Acidithiobacillus Cinsi Bakteriler	25
2.9	Biyoliç Mekanizmaları	26
2.10	Biyoliçi Etkileyen Faktörler	29
2.10.1	Sıcaklık.....	29
2.10.2	pH.....	29
2.10.3	Besi Ortamı	30
2.10.4	Diğer Metaller	30
2.10.5	Tane Boyutu	31
2.10.6	Madenin Karakteristik Yapısı.....	31
BÖLÜM 3		
MATERYAL VE METOTLAR		32
3.1	Kullanılan Besi Yeri ve Kimyasallar	32
3.2	Bakteri Kültürlerinin Yetiştirilmesi	32
3.3	Minerallerin hazırlanması	34
3.4	Biyoliç Deneyleri	36
3.5	Analitik Teknikler	36
BÖLÜM 4		
BULGULAR		43
4.1	Liç Çözeltilerinin pH Değerleri.....	43
4.2	Liç Çözeltilerinin Fe ⁺² İyon Konsantrasyonları.....	45
4.3	Liç Çözeltilerinin Fe ⁺³ İyon Konsantrasyonları.....	46
4.4	Liç Çözeltilerinin Demir ve Bakır İyon Konsantrasyonlarının pH ile Değişimi	49
4.5	Kalkopirit Liç Çözeltilerinin Fe ⁺³ ve Cu ⁺² İyon Değişimleri	51
4.6	Biyoliç Çözeltilerinin Bakteri Konsantrasyonu	52
4.7	Minerallerin Çözünme Kinetikleri	52
4.8	Minerallerin Biyoliç Öncesi Kristal yapı ve Kimyasal Analizi.....	54
BÖLÜM 5		
TARTIŞMA		56
BÖLÜM 6		
SONUÇ VE ÖNERİLER		61
6.1	Sonuçlar	61
6.2	Öneriler	63
KAYNAKLAR		64
ÖZGEÇMİŞ		79

SİMGE LİSTESİ

I	Işın demetinin şiddeti
I_0	Işığın absorbe olmadığı durumdaki ışın şiddeti
σ	Molar soğurma katsayısı
C	Işığın absorbe eden maddenin konsantrasyonu
x_0	Spektrofotometre küvetinin uzunluğu
A	Absorbans

KISALTMA LİSTESİ

ATCC	American Type Culture Collection
EPS	Extracellular Polymeric Substance
XRD	X-Ray Diffraction
XRF	X-Ray Flourescence

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	Pirit minerali	10
Şekil 2.2	Pirotit minerali	10
Şekil 2.3	Kalkopirit minerali.....	11
Şekil 2.4	Sülfürlü minerallerin tiyosülfat ve polisülfid mekanizmaları.	13
Şekil 2.5	Asidik ortamda demir döngüsü.....	17
Şekil 2.6	Yerinde liç düzeneği	21
Şekil 2.7	Yığın liçi düzeneği.....	22
Şekil 2.8	Tank biyoliçi düzeneği	22
Şekil 2.9	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> bakterisinin TEM görüntüsü.....	25
Şekil 2.10	<i>A. ferrooxidans</i> demir oksidasyonun metabolik yolu	26
Şekil 2.11	Pirit yüzeyine tutunan <i>A. ferrooxidans</i> hücresi.....	28
Şekil 2.12	Dolaylı liç mekanizmalarının şematik gösterimi	29
Şekil 3.1	Besi yerinin hazırlanışı	34
Şekil 3.2	Mineral sterilizasyon basamakları	35
Şekil 3.3	Mineral temizliğinde kullanılan ultrasonik temizleyici.....	35
Şekil 3.4	(Biyoliç) erlenlerinin deneyler sonucundaki görünümü.....	36
Şekil 3.5	Axiostar Plus floresans mikroskobu	37
Şekil 3.6	Thermo Orion 2 star pH metre	37
Şekil 3.7	Demir ve bakır iyonlarının kolorimetrik yolla tespiti.....	38
Şekil 3.8	Standard Fe^{+2} solüsyonunun absorbens grafiği	39
Şekil 3.9	28 günlük deney sonucunda liç çözeltisinin Fe absorbens grafiği.....	39
Şekil 3.10	Standard Cu^{+2} solüsyonunun absorbens grafiği.....	39
Şekil 3.11	28 günlük deney sonucunda liç çözeltisinin Cu^{+2} absorbens grafiği	40
Şekil 3.12	Bir spektrofotometrenin elemanları.....	40
Şekil 3.13	Fe^{+2} , toplam Fe ve Cu^{+2} iyon ölçümü için kullanılan standard eğriler	42
Şekil 4.1	Pirit (biyoliç) çözeltilerinin pH değerlerinin zamanla değişimi	44
Şekil 4.2	Pirotit (biyoliç) çözeltilerinin pH değerlerinin zamanla değişimi	44
Şekil 4.3	Kalkopirit (biyoliç) çözeltilerinin pH değerlerinin zamanla değişimi	45
Şekil 4.4	Pirit (biyoliç) çözeltilerindeki Fe^{+2} kons. zamanla değişimi	45
Şekil 4.5	Pirotit (biyoliç) çözeltilerindeki Fe^{+2} kons. zamanla değişimi.....	46
Şekil 4.6	Kalkopirit (biyoliç) çözeltilerindeki Fe^{+2} kons.zamanla değişimi	46
Şekil 4.7	Pirit (biyoliç) çözeltilerindeki Fe^{+3} kons. zamanla değişimi	47
Şekil 4.8	Pirotit (biyoliç) çözeltilerindeki Fe^{+3} iyon kons. zamanla değişimi	47

Şekil 4.9	Kalkopirit (biyo)liç çözeltilerindeki Fe^{+3} kons. zamanla değişimi	48
Şekil 4.10	Tüm minerallerin (biyo)liç çözeltilerindeki pH, Fe^{+2} , Fe^{+3} kons. değişimi ...	49
Şekil 4.11	Pirit biyoliç çözeltilerindeki Fe^{+2} ve Fe^{+3} kons. pH'a bağlı değişimi	50
Şekil 4.12	Pirotit biyoliç çözeltilerindeki Fe^{+2} ve Fe^{+3} kons. pH'a bağlı değişimi	50
Şekil 4.13	Kalkopirit biyoliç çözeltilerindeki Fe^{+2} ve Fe^{+3} kons. pH'a bağlı değişimi	50
Şekil 4.14	Kalkopirit biyotik ve kontrol çözeltideki Fe^{+3} ve Cu^{+2} kons. değişimi	51
Şekil 4.15	Kalkopirit biyotik çözeltilerdeki Cu^{2+} ve Fe^{3+} kons. pH'a bağlı değişimi	51
Şekil 4.16	Pirit, pirotit ve kalkopirit biyoliç çözeltilerindeki bakteri konsantrasyonu.	52
Şekil 4.17	Minerallerin biyoliç çözeltilerinin $1-(1-x)^{1/3}$ zamanla değişimi	53
Şekil 4.18	Minerallerin biyoliç çözeltilerinin $1-(2x/3)-(1-x)^{2/3}$ zamanla değişimi	53
Şekil 4.19	İşlem görmemiş pirit, pirotit ve kalkopiritin XRD desenleri.	55



ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 3.1	<i>A. ferrooxidans</i> bakterisinin gelişimi için kullanılan besi yeri33
Çizelge 3.2	Wolfe mineral solüsyonunun içeriği.....33
Çizelge 4.1	k_c ve k_d değerleri ile korelasyon katsayıları54
Çizelge 4.2	Sülfürlü minerallerin kimyasal analizi.....54

KALKOPİRİT, PİRİT VE PİROTİT MİNERALLERİNİN *ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS* İLE BİYOLİÇİ

Ayşe Tuba KOCAMAN

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mustafa CEMEK

Bu çalışmada, Ward's Scientific firmasından temin edilen pirit (FeS_2 , Huanzala, Peru), pirotit (Fe_{1-x}S , $x=0-0.2$, Virginia, USA) ve kalkopirit (CuFeS_2 , Durango, Mexico) mineralleri üzerinde biyoliç ve kimyasal (kontrol) liç işlemleri uygulanmıştır. Biyoliç işlemlerinde, American Type Culture Collection (ATCC) koleksiyonundan temin edilen *Acidithiobacillus ferrooxidans* (ATCC 23270) bakteri kültürü kullanılmıştır. Minerallerin çözünme kinetiklerini araştırmak amacıyla, (biyo)liç çözeltilerine ait pH, bakteri yoğunluğu, Fe^{+2} ve Fe^{+3} iyon ölçümleri yapılmıştır.

A. ferrooxidans bakteri kültürünün, mineral çözünme hızlarını kimyasal liçe oranla 6-13 kata kadar artırdığı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ışığında pirit, pirotit ve kalkopirit minerallerinin *A. ferrooxidans* bakterisi ile çözünme kinetikleri incelenmiş ve tüm minerallerin çözünürlüklerinin kimyasal kontrollü prosesler olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen reaksiyon hızları (k_c) ve korelasyon katsayıları (R^2) sırasıyla kalkopirit için $1.6 \times 10^{-3} \text{ gün}^{-1}$, 0.914; pirit için $0.6 \times 10^{-3} \text{ gün}^{-1}$, 0.904; ve pirotit için $0.2 \times 10^{-3} \text{ gün}^{-1}$, 0.828 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre minerallerin çözünme hızları büyükten küçüğe doğru kalkopirit, pirit ve pirotit şeklinde gerçekleşmiştir. Aynı zamanda biyoliç sırasında minerallerin yüzeyine tutunan bakteri konsantrasyonları sırasıyla kalkopirit için 5.64×10^6 hücre/mL, pirit için 5.51×10^6 hücre/mL ve pirotit için 5.20×10^6 hücre/mL olarak tespit edilmiştir. Mineral yüzeylerine tutunan bakteri sayısı arttıkça minerallerin çözünme hızlarının arttığı sonucuna varılmıştır. Pirit mineralinin

asitte çözünebilme özelliği, pirotit ve kalkopirit minerallerinin ise asitte çözünememe karakterlerinin minerallerin liç çözeltilerine ait pH değerlerini etkilediği gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *A. ferrooxidans*, kalkopirit, pirit, pirotit, biyoliç



BIOLEACHING OF CHALCOPYRITE, PYRITE AND PYRRHOTITE BY *ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS*

Ayşe Tuba KOCAMAN

Department of Bioengineering

Ph.D Thesis

Adviser: Prof. Dr. Mustafa CEMEK

This thesis aims to study the bioleaching and chemical leaching of pyrite (FeS_2 , Huanzala, Peru), pyrrhotite (Fe_{1-x}S , $x=0 - 0.2$, Virginia, USA) and chalcopyrite (CuFeS_2 , Durango, Mexico). The bacterium culture was obtained from American Type Culture Collection (*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270). Dissolution kinetics of pyrite, pyrrhotite, and chalcopyrite were investigated by monitoring bacterial cell numbers, pH and Fe^{2+} , Fe^{3+} ion concentrations in the (bio)leaching solutions.

The dissolution rates of minerals with *A. ferrooxidans* were 6 to 13 times higher than the chemical dissolution rates. The results showed that the dissolution processes of pyrite, pyrrhotite and chalcopyrite dissolution by *A. ferrooxidans* were chemically controlled processes. The reaction rates (k_c) and the correlation coefficients (R^2) for each of the three minerals are as follows: $1.6 \times 10^{-3} \text{ day}^{-1}$ and 0.914 for chalcopyrite; $0.6 \times 10^{-3} \text{ day}^{-1}$ and 0.904 for pyrite; $0.2 \times 10^{-3} \text{ day}^{-1}$, 0.828 for pyrrhotite. These results indicate that the dissolution rates of minerals decrease in the order of chalcopyrite, pyrite and pyrrhotite. The attached cell numbers to mineral surfaces were 5.64×10^6 cells/mL for chalcopyrite; 5.51×10^6 cells/mL for pyrite; and 5.20×10^6 cells/mL for pyrrhotite. It can be concluded that as the attached cell numbers increase, the dissolution rates of minerals increase. Additionally, pH behavior of the leaching solutions, containing the three minerals, was affected by the acid-insoluble nature of pyrite, and the acid-soluble natures of pyrrhotite and chalcopyrite.

Keywords: *A. ferrooxidans*, chalcopyrite, pyrite, pyrrhotite, bioleaching



1.1 Literatür Özeti

Madenlerden metallerin elde edilmesi, demir ve bronz çağlarından beri insan medeniyetinin temel faaliyetlerindendir. Global nüfusun artması ile birlikte, metaller de dahil olmak üzere tüm doğal kaynaklara olan talep artmıştır. Son yıllarda nadir elementlerin kullanımı dahi hızlı şekilde artmaktadır [1].

Bakır, çinko ve nikel madenleri doğada genelde metal sülfidler şeklinde bulunurlar. Normal çevre koşullarında ve zayıf asidik ortamlarda çözünemezler. Bu yüzden metal sülfidler önce flotasyon işlemi ile konsantre edilirler. Bu konsantrelerden rafine edilmemiş metallerin elde edilmesi için pirometalurjik eritme metodu kullanılır [2]. Ancak pirometalurji metodu ekonomik değildir. Ayrıca yüksek tenörlü madenlerin miktarının azalması ve pirometalurjik uygulamalar sırasında SO₂ gazının açığa çıkması gibi olumsuz etkenler, bu yöntemin kullanılma oranını azaltmaktadır. Bu durumda sülfürlü minerallerin işlenmesi konusunda, pirometalurjik metotlara alternatif olarak hidrometalurjik metotlar devreye girer [3].

Hidrometalurjik tekniklerden biri olan biyoliç, metal sülfidlerin biyolojik oksidasyonu olarak tanımlanır [4]. Asidik çözeltilerde bulunan aerobik, asidofilik, Fe⁺² ve/veya sülfür bileşiklerini okside edebilen bakteri veya arkeler ile gerçekleşen biyoliç işlemi sırasında, farklı ekstraksiyon metotlarıyla çözünmesi zor olan metal sülfidler, metal sülfatlara veya sülfür bileşiklerine okside olurlar [2]. Bu yolla, madenlerdeki metaller iyon haline getirilerek çözeltiliye alınmış olur [5].

Biyoliç düşük maliyetli ve çevre dostu olması, düşük tenörlü madenlere uygulanabilirliği gibi sebeplerden dolayı geleneksel madencilik metotlarına karşı cazip bir alternatiftir [4]. Son yıllarda, sülfürlü minerallerden biyoliç metodu ile metal kazanımı maden endüstrisinin dikkatini çekmiş ve biyoliç çalışmaları hızlı bir şekilde artmıştır [5]. Günümüz maden endüstrisinin en önemli araştırma konularından birisi, mevcut tekniklerle işlem gören madenlerin yapı ve kalitesinin anlaşılmasıdır [1]. Zira madenlerin yapısal özelliklerinin (mineraldeki metal oranı, mineralin kristal yapısı, içerdiği elementler) çözünme hızına olan etkilerinin anlaşılması, metallerin biyoliç metoduyla kazanım oranlarının artırılmasına katkı sağlayacaktır [6].

Doğal maden ortamlarında bulunan bakterilerin metal kazanımındaki rollerinin kesin olarak anlaşıldığı 19. yüzyılın ortalarından itibaren, sülfürlü minerallerin biyoliçi çok cazip bir araştırma konusu olmuştur. Çeşitli değerli metalleri içeren pek çok sülfürlü mineral üzerinde farklı çalışmalar yapılmıştır. Çalışmaların hacmi, çeşitliliği ve karşılaşılan problemlerle ilgili genel bir fikir vermesi açısından, aşağıda kısa bir literatür özeti sunulmuştur.

Rudolfs, 1922 yılında ilk defa demir sülfidlerin bakterilerce oksidasyona uğrayarak demir sülfatlara dönüşebildiğini açıklamış ve bu çalışmasının hemen ardından, çinko sülfürden (sfalerit) çinkonun mikroorganizmalar tarafından ayrıştırılması ile ilgili çalışmasını yayınlamıştır [7,8]. Metal sülfürlerin oksidasyonunda mikroorganizmaların rolü ise kesin olarak ilk defa *Thiobacillus* cinsi bakterilerin 1947 yılında asidik maden sularında bulunması ile anlaşılmıştır [9]. Jeokimyasal bakımdan aktif bakterilerle yapılan ilk biyoliç patenti, 1958 yılında Amerika’da alınmıştır [10]. Bu gelişmeler, sülfürlü minerallerin biyoliçi üzerindeki çalışmaların hızlanmasına neden olmuştur. Silverman, 1967 yılında piritin *Ferrobacillus ferrooxidans* ile oksidasyon mekanizması üzerine çalışmış ve bakteri ile pirit parçacıkları arasında gerçekleşme ihtimali olan doğrudan ve/veya dolaylı temas mekanizmasından bahsetmiş, elde edilen sonuçların dolaylı temas mekanizmasını desteklediğini belirtmiştir [11]. 1970 yılında Singer ve Stumm, piritin oksidasyon hızını belirleyen etkenler (rate-limiting step) üzerinde çalışmış ve en önemli etkenin ferröz demirin oksidasyonu olduğunu belirlemişlerdir [12]. 1972’de Corrins ve ekibi, sentetik olarak hazırlanan kalkosit (Cu_2S) ve kovelit (CuS) minerallerinin *Thiobacillus ferrooxidans* ile oksidasyonu üzerine çalışmışlar ve

bakterilerin ferröz demiri ferrik demire okside ederek liç reaksiyonlarını katalize ettiğini belirlemişlerdir [13]. Nielsen ve Beck, *Thiobacillus ferrooxidans* bakterisinin kalkosit mineralini okside edebildiğini, bu oksidasyondan elde edilen enerjinin CO₂ fiksasyonu için kullanıldığını belirlemişlerdir [14]. Bennett ve Tributsch piritin *Thiobacillus ferrooxidans* ile oksidasyonu sırasında mineral yüzeyinde oluşan aşınma izleri üzerine çalışmıştır. İki yıl boyunca bakteri ile okside edilen mineral yüzeyleri SEM ile görüntülenmiş ve inci dizisi şeklinde aşınma izleri tespit etmişlerdir [15]. Pugh ve ekibi, pirit ve markazit (FeS₂) minerallerinin *Thiobacillus ferrooxidans* ile oksidasyonunda yüzey alanı arttıkça oksidasyon hızlarının arttığını belirlemişlerdir [16].

Edwards ve arkadaşları arsenopirit (FeAsS), pirit ve markazit minerallerinin oksidasyonu üzerine yaptıkları bir dizi çalışmada bu minerallerin çözünmesinde *T. caldus*, *F. acidarmanus* ve *L. ferrooxidans* bakteri popülasyonunun hızlandırıcı etkisini gözlemişler [17], pirit yüzeyinde *A. ferrooxidans*, *F. acidarmanus* ve ferrik iyonları ile liç sonucunda bakterilerin boyutunda ve şeklinde oluşan aşınma izleri tespit etmişler, markazit ve arsenopirit yüzeyinde ise her iki bakterinin de herhangi bir aşınma izi oluşturmadığını gözlemişlerdir. Sonuç olarak sülfid minerallerin çözünmesinin bakteri-mineral etkileşiminden ziyade Fe⁺³-mineral etkileşimi ile gerçekleştiğini belirtmişlerdir [18]. Markazit mineralinin *T. caldus* ile çözünme hızının pirit çözünme hızından yaklaşık iki kat daha fazla olduğunu gözlemlemiş ve bu durumu markazit mineralinin piritten daha reaktif olması ile açıklamışlardır [19]. *T. caldus* bakterisinin bu minerallerin yüzeyine kristal yönelimleri doğrultusunda tutunduğunu göstermişlerdir [20]. Farklı bir çalışmada Edwards ve ekibi, deniz tabanındaki pirit, markazit, kalkopirit ve sfelirit [(Zn,Fe)S] mineral yüzeylerinin aşınması ve başkalaşımında bakteri ve arke kolonilerinin rolünü incelemişlerdir. Çalışma neticesinde mineral yüzeylerinde oluşan koloni yoğunluklarını büyükten küçüğe doğru markazit, pirit, sfelirit ve kalkopirit şeklinde sıralamışlardır [21].

Rodriguez ve arkadaşları, kalkopiritin yüksek ve düşük sıcaklıklardaki biyoliç mekanizması üzerine çalışmışlardır. Düşük sıcaklıkta (35°C) kalkopirit yüzeyinde ara ürünlerin oluştuğunu, yüksek sıcaklıkta (68°C) ise ara ürünlerin çözündüğünü belirlemişlerdir [22]. Ndlovu ve Monhemius pirit mineralinin *A. ferrooxidans* ile biyoliçinde mineral yüzeyinin kristal örgü diziliminin, biyoliç sırasında yüzeyde oluşan

aşınma izlerinin karakterinde etkili olduğunu belirtmişlerdir [23]. Harneit ve arkadaşları ise, pirit, sfelirit, kalkopirit ve galena (PbS) minerallerinin *L. ferrooxidans*, *A. ferrooxidans* ve *A. thiooxidans* ile biyoliçinde EPS'nin (extracellular polymeric substances) bakterilerin mineral yüzeyine tutunmasından sorumlu olduğunu belirtmişlerdir [24]. Lei ve arkadaşları pirit, pirotit, kalkopirit minerallerini *A. ferrooxidans* ile biyoliç işlemine tabi tutmuşlar ve oksidasyon oranlarını büyüktürden küçüğe doğru pirotit, kalkopirit ve pirit şeklinde sıralamışlardır. Aynı zamanda her bir mineralin farklı biyo-oksidasyon özelliğine sahip olduğunu, kalkopirit ve pirotit yüzeylerinin EPS ile kaplandığını belirlemişlerdir [25].

NareshKumar ve Nagendran, kontamine olmuş toprak örneklerindeki ağır metallerin *A. thiooxidans* ile biyoliçi sonucunda, topraktaki nitrojen, fosfor, potasyum miktarı ve metal çözünürlüklerinin değişimi üzerine çalışmışlardır. Ağır metallerin biyoliçe büyük oranda geri kazanılmasına rağmen, topraktaki besin maddelerinin de önemli oranda azaldığını tespit etmişlerdir [26]. Olubambi ve arkadaşları, düşük tenörlü kompleks bakır sülfid minerallerinin *L. ferrooxidans*, *A. ferrooxidans* ve *A. thiooxidans* ile biyoliçinde minerolojik çeşitlilik ve tanecik boyutunun etkisi üzerine çalışmışlardır. Mineraller 106 – 53 µm boyutları arasında hazırlanmış, 75 µm boyutuna kadar küçüldükçe çözünme hızının arttığını, 75 µm'den daha küçük boyutlarda ise çözünürlüğün düştüğünü gözlemişlerdir [27]. Riekkola-Vanhanen makalesinde, Avrupa'nın en büyük nikel sülfid kaynaklarından biri olan Talvivaara polimetallik nikel madeninde *A. caldus*, *L. ferrooxidans*, *A. ferrooxidans* ve *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* bakterileri kullanılarak soğuk iklimde gerçekleştirilen yığın biyoliçinin performansı ile ilgili detayları vermiş ve 2009 yılından itibaren, endüstriyel boyutta nikel, çinko, bakır ve kobalt üretildiği bilgisini paylaşmıştır [28].

Florian ve arkadaşları, pirit mineralinin *A. caldus*, *Leptospirillum ferriphilum*, *L. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* ve *Ferrimicrobium acidiphilum* ile biyoliçi sırasında bakterilerin minerale tutunması ve biyofilm oluşumu özelliklerini incelemişlerdir. Bakteri kültürlerinin kendi aralarındaki etkileşimi sonucunda mineral yüzeyine tutunma oranında, EPS üretiminde ve liç etkinliğinde artış gözlemişlerdir [29]. Bulaev ve arkadaşları, pirit, pirotit ve arsenopiritin karışık kemolitotrofik asidofilik bakteri kültürü ile biyoliçi sonucundaki oksidasyon oranlarını incelemişlerdir [30]. Zhu ve arkadaşları,

kalkopiritin biyoliçi sırasında *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* ve *L. ferrooxidans* ile mineral arasındaki adezyon kuvvetlerini incelemiş ve sonuç olarak, adezyon kuvveti ile mineral yüzeyine tutunan bakteri sayısının doğru orantılı olduğunu tespit etmişlerdir [31]. Dong ve arkadaşları, piritik kalkopirit ve porfiri kalkopiritin *A. ferrooxidans* ile biyoliçini gerçekleştirmiş ve liç oranlarının oldukça farklı olduğunu bulmuşlardır. Piritik kalkopirit yüzeyine bakterinin daha iyi tutunduğunu, çözünme oranının daha büyük olduğunu ve bunun neticesinde piritik kalkopiritten daha fazla bakır çözüldüğünü rapor etmişlerdir [32].

Fu ve arkadaşları djurleite ($C_{31}S_{16}$), bornit (Cu_5FeS_4), piritik kalkopirit ve kovelit minerallerinin *A. ferrooxidans* ile biyoliç oranlarını karşılaştırmışlardır. Ayrıca bu minerallerin yüzeyinde biyoliç sırasında oluşan pasivasyon tabakalarını ve bunların metal kazanımına olan etkilerini çalışmışlardır [33]. Yu ve arkadaşları, kalkopiritin *A. ferrooxidans* ile biyoliçi sırasında Cu^{+2} , Fe^{+3} iyonları ve EPS arasındaki etkileşim mekanizmasını incelemişlerdir. Cu^{+2} iyonlarının bakterinin EPS üretimini Fe^{+3} iyonlarına oranla daha çok tetiklediğini belirlemişlerdir [34]. Romo ve arkadaşları, kalkopiritin biyoliçinde karışık *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans*, *L. ferrooxidans* ve *L. ferriphilum* bakteri kültürünün etkisini incelemişler, *A. ferrooxidans* ve *A. thiooxidans* kültürünün kullanıldığı durumda, bakırın %70'inin kazanıldığını tespit etmişlerdir [35]. Manafi ve arkadaşları, piritik porfiri bakır sülfidin karışık mezofilik/asidofilik bakteri kültürü kullanarak çalkalamalı ve kolon biyoliçini gerçekleştirmişlerdir. Kullandıkları bakteri kültürü ve metotların, bakır sülfitten yüksek oranda bakır elde etmede başarılı olduğunu belirlemişlerdir [36]. Abhilash ve arkadaşları, uranyum madeninin *A. ferrooxidans* ve *L. ferrooxidans* kullanılarak kolon liçi ve biyoreaktördeki liç oranlarını belirlemişlerdir [37]. Zhao ve arkadaşları, kalkopirit ve bornit minerallerinin *A. ferrooxidans* ile biyoliçi sırasında, minerallerin birbirinin liç oranı üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Her iki mineralin de birbirinin liç oranını hızlandığını belirlemiş ve bunu “sinerjetik etki” olarak tanımlamışlardır [38]. Fu ve arkadaşları, djurleite mineralinin *A. ferrooxidans* ile biyoliç sürecini incelemiş ve reaksiyon mekanizmasını belirlemişlerdir [39]. Yu ve arkadaşları, kalkopiritin *A. ferrooxidans* ile biyoliçi sırasında pH değerlerinin, bakterinin EPS salgılaması üzerine olan etkisini incelemişlerdir [40]. Wang ve arkadaşları, kalkopiritin yüksek katı oranında (pulp density) karışık termofilik

bakteri kültürü ile biyoliç performansını incelemişlerdir. İki yıl boyunca alt kültüre tabi tutulan bakteri kültürü ile biyoliç işlemi sonucunda, % 20 katı oranında yüksek bakır verimi elde etmişlerdir [41]. Fu ve arkadaşları, djurleite, bornit, kovelit ve kalkopiritin *A. ferrooxidans* ile biyoliçini çalışmışlar ve djurleite mineralinin en yüksek biyoliç oranına, kalkopiritin ise en düşük biyoliç oranına sahip olduğunu belirlemişlerdir. Mineral yüzeyinde absorbe edilen bakteri yoğunluğu arttıkça, liç oranının da arttığını tespit etmişlerdir [42]. Gan ve arkadaşları, biyoliç bölgelerinden alınan ağır metallerle kirlenmiş sedimentler üzerinde yaptıkları çalışmada, *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* ve *L. ferriphilum* karışık bakteri kültürü kullanmışlardır. Yüksek oranda Zn, Cu, Mn ve Cd, nispeten düşük oranda As, Hg ve Pb geri dönüşümü sağlamışlardır [43]. Li ve arkadaşları, düşük tenörlü nikel-bakır sülfidlerin termofilik asidofilik bakterilerle biyoliçini gerçekleştirmişlerdir [44]. Feng ve arkadaşları, kalkopiritten bakır kazanım oranını artırmak için *A. ferrooxidans* ve *A. thiooxidans* bakterilerinin farklı oranda karışımları ile biyoliç deneylerini gerçekleştirmişler ve sonuç olarak metal kazanım oranlarını artırırken, mineral yüzeyinde oluşan pasivasyon tabakasını zayıflatmışlardır [45].

Son aylardaki çalışmalarda ise, biyoliçin uygulandığı saha oldukça genişlemiştir. Bunlar arasında monazitten (fosfat minerali) nadir elementlerin biyoliçi [46], galyum arsenitten (GaAs) ve galyum içeren elektronik atıklardan galyumun biyoliçle geri kazanılması [47], maden ergitme tesislerinde açığa çıkan cüruftan Si, Fe, Cu ve Zn elementlerinin kazanılması [48] ve yakılmış atık maddelerin küllerinden Zn, Cu ve nikelin karışık bakteri kültürüyle yüksek oranda geri kazanılması sayılabilir [49].

1.2 Tezin Amacı

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda genelde, sülfürlü minerallerin kimyasal liç sırasındaki çözünme mekanizmaları ve kinetikleri incelenmiştir. Minerallerin çözünme kinetiğini inceleyen biyoliç çalışmalarına pek rastlanmamıştır. Bu tezin amacı pirit, pirotit ve kalkopirit minerallerinin biyoliç/çözünme kinetiklerinin biyotik (*A. ferrooxidans* varlığında) ve abiyotik (*A. ferrooxidans* yokluğunda) şartlarda planktonik bakteri yoğunluğu, pH ve Fe^{+2} , Fe^{+3} iyon değişimleri incelenerek araştırılması ve karşılaştırılmasıdır.

1.3 Orjinal Katkı

Günümüzde sülfürlü minerallerin biyoliçi üzerine yapılan çalışmalar genelde karışık bakteri kültürleri [35,50], mineral morfolojisi [32], bakterinin mineral yüzeyine tutunma etkisi [51], mineralin parçacık boyutu [27,52], mineralin çözeltideki katı oranı [53], çözeltideki farklı metal iyonları [54,55] ve operasyon sıcaklığının sülfürlü minerallerin çözünme hızı üzerindeki etkilerine yoğunlaşmıştır [56]. Pirit, pirotit ve kalkopiritin (biyo)liçini her bir mineral için tek tek inceleyen çalışmalar mevcut olmakla birlikte, bu üç mineralin çözünme oranlarını karşılaştıran çok az sayıda çalışma vardır ve minerallerin *A. ferrooxidans* ile çözünme kinetiklerini aynı anda inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır [29, 32, 57-66].

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1 Kayaçların Ve Minerallerin Oluşumu

Mineraller, genelde kristal yapıya sahip, nadiren amorf yapıda olan inorganik bileşikler olarak tanımlanır. İki veya daha fazla mineralin iç içe geçerek büyümesi sonucunda oluşan büyük boyutlardaki inorganik maddeler, jeoloji biliminde “kayaç” olarak tanımlanır [67]. Jeokimyacılar, dünya gezegenini atmosfer, hidrosfer (ırmak, göl, okyanus) ve litosfer (dünyanın geri kalan katı kütlesi) olmak üzere üç bölgeye ayırırlar. Dünyanın hayat çeşitlerinin bulunduğu parçası ise biyosfer olarak adlandırılır ve atmosferin küçük bir kısmını, hidrosferin 11.000 metre derinliğe kadar olan kısmını, litosferin ise maksimum 2000 metre kadar derinlikte olan üst kısımlarını kapsar [68]. Litosferdeki temel kayaç oluşumları magmatik, tortul veya metamorfiktir. Magmatik çözeltiler soğudukça (yerinde iken veya basınçla derinlerden yükselirken), ana magma tabakasının farklı özelliklerdeki kristalleşme zinciri sonucunda çeşitli magmatik kayaçlar oluşur. En yüksek erime sıcaklığına sahip kayaçlar en önce, en düşük erime sıcaklığındaki kayaçlar ise en son kristalleşirler. Kristalleşme işleminin sonlarına doğru, orijinalde az miktarda bulunan değerli elementler, geride kalan magmatik ve termal sıvılarda konsantre hale gelirler. Son kristalleşme safhasında ise, hidrotermal kaynaklı değerli mineral depozitleri oluşur [69].

Nasıl oluştuklarına bakılmaksızın tüm kayaç ve mineraller, su tarafından etkilenirler. Çözünürlüklerine ve hidroliz olma eğilimlerine göre suda çökebilir veya çözünebilirler. Kayaların fiziksel, kimyasal ve biyolojik kuvvetlerin etkisi ile aşınması sonucunda, ortaya farklı kimyasal içerikli mineraller çıkar. Su, bu mineral bileşiklerini çözeltiye taşıyan en

önemli aracıdır. Su aynı zamanda mikroorganizmalar ve tüm hayat çeşitleri için vazgeçilemez bir hayat kaynağı olduğundan, temel mineral dönüşümlerinde mikroorganizmaların rolü tartışılırken suyun gözönüne alınması şarttır [69].

Dünya tarihinde, biyolojik aktivitelerin mineral dönüşümlerinde ne zaman etkili olmaya başladığı bilinmemektedir. Yer kabuğunun oluşumunun, yeryüzündeki ilk hayat çeşidinin ortaya çıkmasından çok önce gerçekleştiği farzedilmektedir. Bu yüzden, ilk mineral oluşum ve çözünme olayları, biyolojik müdahale olmadan ilerlemiş olmalıdır. Jeolojik katmanlardaki fosil ve canlı mikroorganizmalar izotop ayrıştırma çalışmaları ile incelendiğinde, Proterozoik (hayatın ilk belirlediği zaman), Paleozoik ve Mesozoik çağlarda geniş çaplı jeomikrobiyal aktivitenin olduğuna dair bulgular elde edilmiştir [70,73-75].

Pekçok mikroorganizma, belirli jeolojik proseslere aktif şekilde katkıda bulunur. Mikroorganizmaların jeolojik oluşumlardaki etkisi genelde fizyolojiktir. Bazı jeokimyasal süreçlerde katalizör olarak veya jeokimyasal açıdan aktif maddelerin üreticisi/tüketicisi olarak görev yapabilirler. Dolayısıyla, bu maddeler reaktant veya ürün olarak jeokimyasal reaksiyonların hızını etkilerler. Hücresel katabolizma ve anabolizma işlemlerinin her ikisi de, jeomikrobiyal açıdan önemli rol oynarlar. Katabolizmanın dahil olduğu süreçlerde, geniş çaplı oksidasyon olayları sonucunda inorganik maddelerin dönüşümü ve organik moleküllerin indirgenmesi gerçekleşir [74].

2.2 Sülfürlü Minerallerin Oluşumu

Sülfürlü mineraller, temel anyon olarak sülfid içeren bir mineral sınıfıdır. Doğada pek çok metal (demir, bakır, nikel, çinko, kurşun, gümüş v.b.) basit veya kompleks sülfürlü mineraller şeklinde bulunur. En çok bilinen ve işlenen sülfürlü minerallerden bazıları sırasıyla FeS_2 (pirit), Fe_{1-x}S (pirotit), CuFeS_2 (kalkopirit), Cu_2S (kalkosit), Cu_5FeS_4 (bornit), CuS (kovelit), FeAsS (arsenopirit), NiS (millerit), $(\text{Zn}, \text{Fe})\text{S}$ (sfelirit), PbS (galena) ve Ag_2S (akantit) şeklinde sıralanabilir. Sülfürlü mineral yataklarının çoğu magmatik veya hidrotermal kaynaklıdır [69].

Oksijen ve silikondan sonra, minerallerde en yaygın bulunan elementlerden biri olan sülfürün bilinen tüm bileşikleri, yer kabuğunun % 0.03'ünü oluşturur [75]. Sülfür, okyanuslarda ve toprakta ise genelde sülfat formunda bulunur [76].

2.2.1 Pirit

Kimyasal formülü FeS_2 olan pirit, metalik parlak bir rengi olan ve bu yüzden “yalancı altın” olarak adlandırılan bir demir sülfittir. Yeryüzünde çok yaygın olarak bulunur [57]. Ekonomik açıdan çok değerli olmamasına rağmen değerli minerallerle birleşmiş yapısından dolayı (sfelarit, kalkopirit, galena v.b.) piritin biyo-oksidasyonu üzerine pek çok çalışma yapılmıştır [12,21,30,77-79].



Şekil 2.1 Pirit minerali [80]

2.2.2 Pirotit

Kimyasal formülü $\text{Fe}_{(1-x)}\text{S}$ ($x = 0 - 0.2$) olan pirotit, yeryüzünde en yaygın bulunan ikinci sülfürlü mineraldir. Renginin pirit benzemesi ve zayıf magnetik özellikte olması nedeniyle, “magnetik pirit” olarak ta adlandırılır.



Şekil 2.2 Pirotit minerali [81]

2.2.3 Kalkopirit

Kalkopirit (CuFeS_2), dünyada bakır içeren en önemli mineral olup, hemen her sülfid yatağında bulunur [82]. Diğer minerallerin aksine, hidrometalurjik metotlara karşı dirençli olduğu için, bu mineralden bakır elde etmek zordur [61]. Kalkopiritin hem kimyasal hem de biyolojik liçe karşı dirençli olmasının sebepleri onlarca yıldır araştırılmaktadır. Demir oksitleyici bakterilerin, en önemli liç ajanı olan ferrik demiri üretmeleri nedeniyle bakteri varlığında liç hızı artar [83]. Kalkopiritin liçi boyunca mineral yüzeyinde oluşan ve demir/sülfür içeren çözünmeyen reaksiyon ürünleri, başka bir deyişle “pasivasyon tabakası” kalkopiritin yavaş çözünmesinin sebebi olarak görülür

[84,85]. Bu tabakanın oluşumu mineral yüzeyine iyonların difüzyonunu engeller ve liç işlemi yavaşlar [86,87]. Tüm bu zorluklara rağmen kalkopiritin biyoliçi üzerine çok fazla çalışma yapılmasının nedeni, bu mineralin yer kabuğunda oldukça yaygın bulunmasıdır [88]. Bakır endüstrisinde, düşük tenörlü bakır sülfat madenleri için yığın liçi, daha yüksek tenörlüler için tank biyoliçi, en yüksek tenörlüler içinse eritme yöntemi kullanılır [89].



Şekil 2.3 Kalkopirit minerali [90].

2.3 Sülfürlü Minerallerin Çözünme Mekanizmaları

Sülfürlü minerallerin çözünmesinde pek çok oksidasyon ajanı rol oynar. Bunlar oksijen, ferrik sülfat çözeltisi ve demir oksitleyici bakterilerdir. Metal sülfatlar madencilik aktiviteleri boyunca nem ve hava ile temas halinde olduğundan, metal sülfatlara ve sülfürik aside okside olurlar. Bu prosesin hızı, doğal ortamda bulunan asidofilik demir oksitleyici mikroorganizmalar (*Acidithiobacillus* cinsine ait bakteriler) tarafından kat kat artırılır. Doğada hangi oksidasyon ajanının daha etkili olduğu önemli bir sorudur. Zira metal sülfat yataklarında demir oksitleyici bakteriler genelde ferrik sülfat çözeltisi ve oksijen ile birlikte bulunur [69].

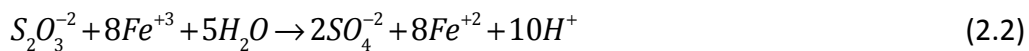
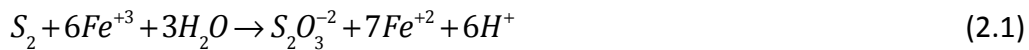
Düşük tenörlü sülfürlü minerallerin içerdiği metal oranı genelde % 0.5'ten daha azdır. Madenlerin öğütüldükten sonra eritilmesi ve müteakiben flotasyon ile zenginleştirme işleminin yapılması, elverişsiz gang/metal oranı sebebiyle ekonomik değildir. Bu tür sülfat madenlerin bakteriyel liçi daha ekonomiktir. Aynı zamanda biyoliç prosesleri oksijenli olduğu için, liç yapılmakta olan maden yığını içerisinde oksijenin difüzyonu çok önemlidir [91].

Sand ve arkadaşları, sülfürlü minerallerin Fe^{+3} ve/veya H^+ atağı ile çözünmeye uğradığını belirtmişlerdir. Pirit, pirotit ve kalkopirit de dahil olmak üzere pek çok metal sülfat, yarı iletkenlerdir. Yarı iletkenlerde valans bandı en yüksek enerji seviyesine sahip

olup tamamen elektronlarla doludur. Piritin valans bandı sadece metal atomunun orbitalleri ile dolu iken, pirotit ve kalkopiritin valans bandı metal ve sülfür atomunun orbitalleri ile doludur. Bu yüzden piritin kristal örgüsündeki metal-sülfür bağlarını sadece Fe^{+3} iyonları kırabilirken, pirotit ve kalkopiritin metal-sülfür bağlarını Fe^{+3} iyonları ve protonlar kırabilir. Sonuç olarak pirit asitte çözünemezken, pirotit ve kalkopirit asitte çözünebilir [92]. Schippers ve Sand asitte çözünemeyen metal sülfidler için tiyosülfat mekanizmasını, asitte çözünebilen metal sülfidler için ise polisülfid mekanizmasını önermişlerdir. Her iki mekanizmada da bakterinin rolü, Fe^{+3} iyonlarının ve protonların tekrar tekrar üretilmesidir [93].

2.3.1 Tiyosülfat Mekanizması

Asitte çözünemeyen metal sülfidler, Fe^{+3} iyonları tarafından elektron ekstraksiyonu yapılarak oksitlenirler. Bu mekanizma, oluşan ilk sülfür bileşiği olan tiyosülfatın adıyla adlandırılmıştır. Serbest tiyosülfat, pek çok ara üründen sonra sülfata oksitlenir. Tiyosülfat mekanizmasındaki kimyasal oksidasyon (sülfür oksitleyici bakterilerin yokluğunda) sırasında önemli miktarda elementel sülfür açığa çıkar (% 10 - 20) [93-95]. Tiyosülfat mekanizması pirit, molibdenit ve tungstenit gibi sülfürlü minerallerin biyoliçini açıklar. Asitte çözünemeyen pirit için tiyosülfat mekanizması reaksiyonları (2.1) ve (2.2) ile verilmiştir [92]:

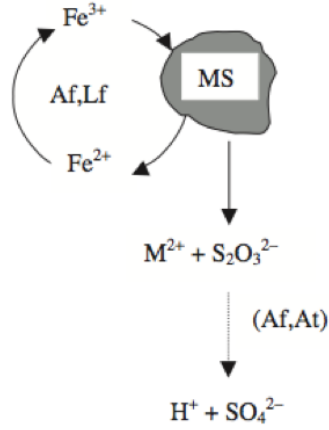


2.3.2 Polisülfüt Mekanizması

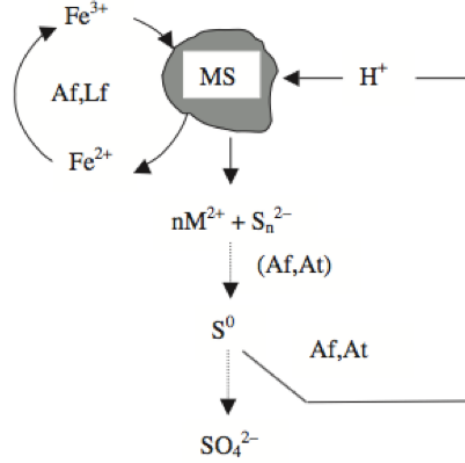
Asitte çözünen metal sülfidler, Fe^{+3} iyonları ve protonların atağı sonucu çözünürler [93]. Polisülfidler, metal sülfidlerin ferrik demir ve asitle liçi sonucunda oluşan birincil ara ürünlerdir. Polisülfidlerin daha ileri kimyasal/mikrobiyal oksidasyonu sonucunda genelde elementel sülfür veya daha az miktarda sülfat üretilir. Polisülfid mekanizması sfelarit, kalkopirit, pirotit ve galena gibi minerallerin biyoliç mekanizmasını açıklamak için kullanılır. Asitte çözünebilen metal sülfidler (MS) için polisülfid mekanizması reaksiyonu aşağıdaki gibidir:



Tiyosülfat mekanizması



Polisülfüt mekanizması



Şekil 2.4 Sülfürlü minerallerin bakteriyel liçinde tiyosülfat ve polisülfid mekanizmaları.

MS: metal sülfid, $S_2O_3^{2-}$: tiyosülfat, S_n^{2-} : polisülfid zincir uzunluğu (n), S^0 : elementel sülfür, Af, At, Lf: *At. ferrooxidans*, *At. tiyooksidans* ve *L. ferrooxidans* ile oksidasyon [92].

2.4 Geleneksel Liç Metotları

Günümüz medeniyeti, metallerin kullanımına ileri derecede bağlıdır. Kültür tarihimizin bazı basamakları bronz çağı, demir çağı gibi isimler almıştır [96]. Günümüzde mineral ve madenler, yüzlerce yıl önce yapıldığı gibi ham madde halinde yer kabuğundan çıkarılarak pirometalurjik veya hidrometalurjik yöntemlerle saflaştırılır [97]. Liç metotlarıyla altın kazanımı için ilk patentler 1887’de İngiltere’de ve 1889’da Amerika’da alınmıştır [98,99].

2.4.1 Hidrometalurji

Eski bir uluslararası atasözüne göre “bir damla su taşı deler”. Hidrometalurji, metallerin su ve çözülmüş kimyasallar yardımıyla madenlerden ayrıştırılmasının adıdır. Bu reaksiyona en uygun örnek, asit yağmurlarının bazı tarihi anıt ve yapıları korozyona uğratmasıdır. Madenler ve mineraller, suda tamamen çözünemezler. Bu yüzden, istenen metallerin kazanımı için minerallerin ana yapısının bozulması ve/veya metal şelatların oluşturulması gerekir. Minerallerdeki metal oranının düşük olması durumunda (< % 1), metal kazanımı ancak hidrometalurji (su metalurjisi) metoduyla gerçekleşir. Madenler sulu çözeltilerle işlem gördüğünde, metaller çözülmüş katyonlar

şeklinde elde edilirler. Metallerin bu çözeltiden endüstriyel yolla kazanımına “metallerin liçi” denir. Hidrometalurji yöntemi üç safhadan oluşur:

- Katı mineraldeki metallerin liç ile çözeltiye alınması,
- Çözeltinin işlenmesi ve metallerin konsantre hale getirilmesi,
- Hedeflenen ürünün çözeltiden kazanılması.

Prosesin doğasına ve mekanına bağlı olarak, farklı liç çeşitleri tanımlanmıştır:

- *Yığın liçi*: yığılmış mineraller üzerine belli bir liç solüsyonu akışı sağlanır.
- *Tank liçi*: mineraller bir varil içerisinde liç solüsyonu ile karıştırılır.
- *Yerinde liç*: düşük tenörlü madenler taşınmadan yer altında liç edilir.

Liç işlemi, nadir ve değerli metaller için de uygulanabilir. Liç oranı, ham mineralin kompozisyonu, çözelti kompozisyonu, sıcaklık, pH ve redoks potansiyeline bakılarak tespit edilir.

Hidrometalurji metodu bakır kazanımı amacıyla 17. yüzyılın ortalarından beri uygulanmaktadır. 18. yüzyılda asit solüsyonları, okside edilmiş maden yığınlarına gönderilerek endüstriyel bakır kazanımı yapılmaktaydı. Bu yöntem, maden yataklarından sızan renkli çözeltiler sayesinde keşfedilmiştir. Günümüzde de terkedilmiş bakır maden yataklarından sızan renkli sular bazı yerel su yollarını parlak maviye boyayarak kirletmektedir (Avustralya’daki İsa dağı) [96].

2.4.2 Pirometalurji

Antik zamanlardan beri bilinen pirometalurji metodu, madenlerdeki veya diğer minerallerdeki metallerin yüksek sıcaklıkta eritilerek elde edilmesi esasına dayanmaktadır. Kullanılan teknolojiye uygun olarak bu proses pirometalurji (ateş metalurjisi) olarak adlandırılmıştır. Bu yöntem, madenlerde yüksek konsantrasyonda metal bulunduğu durumlarda etkilidir. Bunun tersine, düşük oranda metal içeren madenlerden endüstriyel yollarla eritme metoduyla maden kazanımı pek mümkün görünmemektedir. Zira, maden yığınlarını ısıtmak çok pahalıdır ve üretilen metallerin önemli bir kısmı mineral atıklarının içerisinde kaybolur. Aynı zamanda ısıtma için gerekli yakıtlar, devamında oluşan duman ve atmosfer kirliliği, asit yağmurları gibi olumsuz etkenler de vardır [96].

2.5 Biyoliç

Mikroorganizmalar, su ve hava ile temas halinde olan sülfürlü mineral kaynaklarının biyolojik oksidasyona uğramalarına neden oldukları gibi, dünya yüzeyinin doğal dönüşümünde de rol oynamaktadırlar [100-102]. “Biyoliç”, madenlerdeki metallerin ortamda doğal olarak bulunan bazı mikroorganizmalar vasıtası ile suda çözünür hale getirilmesidir [103]. Biyoliç sırasında, sülfürlü minerallerdeki metaller mikroorganizmalar tarafından suda çözünebilir metal sülfatlara okside edilirler. Metal sülfidlerin endüstriyel biyoliçinde, doğada kendiliğinden gerçekleşen mikrobiyal prosesler, ortam şartlarının optimize edilmesi ile hızlandırılarak minerallerin mikrobiyal liçi de hızlandırılmış olur. Minerallerin doğal mikrobiyal oksidasyonu insanlar tarafından keşfedilmeden önce bu prosesler çok yavaş ilerliyordu [91]. Mikroorganizmaların metal çıkarmasında kullanılması, aslında doğada var olan bir prosesin ticari maksatla hızlandırılması olarak tanımlanabilir.

Sülfürlü minerallerin aşınması ile oluşan asidik maden sularının oluşumunda mikroorganizmaların rolünün 1940’larda farkedilmesi ile, biyoteknolojik yöntemler hidrometalurjiye uygulanmış ve “Biyohidrometalurji” yöntemi geliştirilmiştir [9]. Bu yöntem, mikroorganizmaların sulu ortamlarda mineral ile etkileşimi esasına dayanır. Bu bağlamda, mineral biyoteknolojisi hidrometalurji, jeomikrobiyoloji, mikrobiyal ekoloji ve mikrobiyal biyokimya gibi farklı disiplinleri bünyesinde barındırır [104].

Biyoliç sülfürlü minerallerin yanısıra madencilik atıklarından [105-107], hurdaya çıkmış elektronik atıklardan [106,108-113], kentsel ve endüstriyel atık sularından [114,115], yakılan kentsel atıkların küllerinden [116,117] ve kirletilmiş bölgelerden metal kazanımı için de test edilmektedir [118,119]. Güncel endüstriyel biyoliç uygulamaları öncelikle bakır, altın, nikel, kobalt [108,120] ve uranyum kazanımı için yapılmaktadır [121,122].

2.5.1 Bakteri-Mineral Etkileşimi

Tüm hücreler, biyolojik olarak mineral dönüşümü yaparlar. Ancak bazı dönüşümleri çok az sayıdaki organizma gerçekleştirebilir. Tüm canlı hücreler, enzim aktivasyonu ve fonksiyonu için gerekli iz elementlerin dönüşümünü küçük boyutta gerçekleştirirler. Bu prosesler, yeryüzüne dağılmış minerallerin aşınmasına nadiren sebep olurlar. Fakat bazı belirli mikroorganizma grupları, minerallerin jeolojik dağılımını doğrudan veya

dolaylı olarak etkileyebilirler [69].

Mikroorganizmalar, antik çağlardan beri ağır metallerin yer kabuğunda depolanması ve çözünmesine katkıda bulunmuşlardır. Bu aktivitede, demir ve sülfür döngüsü önemli bir yer tutar. Anaerobik sülfat indirgeyici bakteriler, pek çok metalle reaksiyona girerek çözünmeyen metal sülfidleri oluştururlar. Bu sülfidler, mineral depozitlerinde birikerek kayaç oluşumuna katkıda bulunurlar. Sülfürlü minerallerin aerobik sülfür oksitleyici mikroorganizmalar için elektron vericisi olarak görev yapması sonucunda ise metal sülfatlar oluşur. Oluşan metal sülfatların çoğu çözünür olduğu için, bu proses “metallerin mineral depozitlerinden liçi” olarak adlandırılır. Belirli mikroorganizmaların madenlerdeki metalleri çözünebilir hale getirebilme özelliklerinin keşfedilmesi ile biyomadencilik endüstrisi gelişmeye başlamıştır [123].

Mikroorganizmalar, salgıladıkları metabolik ürünlerin (NH_3 , HNO_3 , CO_2 , okzalik, sitrik ve glukonik asit) aşındırıcı etkisi ile mineral kayaçları çözünmeye uğrattırır. SEM görüntüleme tekniği kullanılan bazı çalışmalarda, mikroorganizmaların ürettiği liken gibi bazı organik bileşiklerin, belirgin şekilde mineral aşınmasına yol açtığı gözlenmiştir [124]. Mikroorganizmaların metabolizma ürünleri, aynı zamanda kayaçlarla etkileşime geçerek çözünmelerine veya ortaya çıkan mineral tortularının birleşerek kayaç oluşturmaya neden olurlar [76].

2.5.2 Demir Elementi

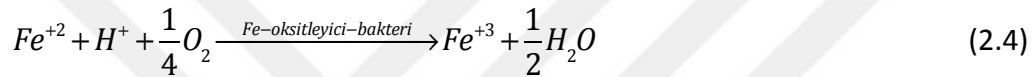
Demir, evrendeki en yaygın element olup Güneşte ve pek çok yıldızda bulunur. Yer kabuğundaki en yaygın dördüncü elementtir ve alüminyumdan sonra en yaygın ikinci metaldir. Yer kabuğunun yaklaşık % 5’ini oluşturduğu ve dünyanın çekirdeğinin temel bileşeni olduğu tahmin edilmektedir [125].

Demir, gezegenimizin her tabasında yüzlerce farklı bileşik halinde bulunabilir. Doğada nadiren saf halde ve düzenli kristalleşmiş mineral fazda bulunur. Yaygın olarak doğal organik maddelerle birleşmiş vaziyette, hidrosfer, litosfer, biyosfer ve atmosferde Fe^{+2} veya Fe^{+3} içerikli mineraller (genelde değerli metallerle birleşmiş halde) olarak, veya çözülmüş iyonlar halinde bulunabilir. Pek çok hücresel maddenin bileşenidir ve çok sayıda fizyolojik fonksiyona dahil olur. Bu yüzden, demir ökaryot hücrelerinin tümü ve prokaryotların çoğu için temel bir besin maddesidir. Bazı prokaryot hücreler enerji

üretimini demiri yükseltgeme yoluyla gerçekleştirirler. Demir oksidasyonu ile hücre gelişimi karşılıklı olarak birbirine bağımlıdır ve demir oksidasyonu, hücresel karbonda ölçülebilir derecede artışa sebep olur. *A. ferrooxidans* gibi demir oksitleyici asidofiller için en yaygın Fe^{+2} kaynağını demir sülfidler içerir.

Demirin redoks dönüşümleri, çözünmesi, çökmesi ve yeryüzündeki dağılımı kimyasal yoldan ziyade mikrobiyal yolla gerçekleşir. Mikroorganizmalar, oksijenli ve oksijensiz ortamlarda Fe^{+2} 'nin oksidasyonunu katalize ederken, oksijensiz ortamlarda ise Fe^{+3} 'ün indirgenmesini katalize ederler.

Ferröz demirin (Fe^{+2}) ferrik demire (Fe^{+3}) oksidasyon reaksiyonu aşağıda verilmiştir [91]:



Mikrobiyal demir döngüsü, kimyasal döngüden çok daha hızlıdır ve genelde toprakta, sedimentlerde, tatlı sularda ve denizlerde gerçekleşir. Aynı zamanda bu döngü, endüstri ve madencilik faaliyetleri sonucunda ortaya çıkan organik ve inorganik atıkların kaderini belirleyici bir rol oynar [78,126-133].



Şekil 2.5 Asidik ortamda mikrobiyal ve kimyasal demir döngüsü [130]

2.5.3 Sülfür Elementi

Yeryüzündeki sülfürün çoğunluğu, sülfid minerallerde ve sediment / kayalarda sülfat olarak bulunur. Sülfür, oksijen ve silikondan sonra minerallerde en yaygın bulunan elementlerdendir. Bilinen tüm bileşikler yer kabuğunun % 0.03'ünü oluşturur. Okyanuslarda ve toprakta genelde sülfat formunda bulunur. En çok bilinen ve işlenen sülfid içerikli mineraller, kalkosit, pirit, kalkopirit, galena, cinnabar, sfelarit, arjenit ve arsenopirittir.

Aynı zamanda sülfür, her canlı hücrede bulunan proteinleri oluşturan anahtar elementtir. Sülfür bileşikleri, çeşitli mikroorganizmalar tarafından elektron donörü veya akseptörü olarak kullanılırlar. Tüm hayat çeşitlerinin sülfüre bu derece sıkı şekilde bağımlı olması, doğada sülfürün sürekli bir devir halinde olmasını zorunlu kılar. Bu devir, sülfür döngüsü adını alır. Bu döngü boyunca, sülfür atomları farklı oksidasyon durumlarında bulunurlar. İnorganik bileşiklerde mineralize oldukları gibi, proteinlerin aminoasitlerinde de bulunurlar [77].

2.5.4 Tarihi Bilgi

Madenciler bakterilerin rolünden habersiz olsa da, biyomadenciliğin kökeni çok eskiye dayanır. Mikroorganizmaların bakır çıkarılmasında kullanılmasının temeli antik çağlara dayanmaktadır. 18. yüzyılda İspanya'nın güneyinde bulunan Sevilla'daki Rio Tinto bakır madeninde bakterilerin etkin olduğu biliniyordu. Rio Tinto madeninde, Roma öncesi dönemde gümüş, Roma döneminde de bakır çıkarılmaktaydı. Rio Tinto (kırmızı nehir), suyunun yüksek konsantrasyonda ferrik demir içermesinden dolayı kırmızı görünmesi nedeniyle bu ismi almıştı. Nehirdeki çözünmüş ferrik demir ve demire nazaran daha az farkedilen çözünmüş bakır, doğal mikrobiyal aktivitenin sonucu idi. Günümüze kadar ulaşan en erken kayıtlara göre, Rio Tinto nehrinin suyu, balık yetişmemesi ve içilememesi özellikleriyle bilinmektedir [134].

Romalılar, çözeltideki bakırı demirden ayırmak için "sementasyon" yöntemini kullanıyorlardı. Çözeltideki bakır üzerine demir ilave ederek bakırı çöktürüyor ve pirometalurjik yöntemle saflaştırıyorlardı.



Bazı modifikasyonlara uğrayan seimentasyon işlemi günümüzde hala kullanılmaktadır [135]. Milattan önce 1000 yıllarında, Akdeniz havzasında bakırın maden drenaj sularından kazanıldığına dair kayıtlar vardır [136].

1880'lerden beri, elementel sülfür ve indirgenmiş sülfür bileşiklerinin oksidasyonunun sülfürik asit oluşturduğu biliniyordu [137]. Metal sülfürlerin oksidasyona uğradığı, ilk defa 1922 yılında çinko sülfürden çinkonun ayrıştırılması ile anlaşılmıştır [7,8]. Bu oksidasyonda bakterilerin rolü ise 1947'de *Thiobacillus* cinsinin asidik maden sularında

bulunması ile anlaşılmıştır [9].

Madencilikteki ilk ticari biyoteknoloji uygulaması, mezofilik mikroorganizmalar kullanılarak refrakter (inatçı) altın içeren sülfid konsantreleri için yapılmıştır. Bu teknolojiye, altının siyanürle çözündürülmesinden önce, ön işlem olarak biyooksidasyon uygulanmıştır [122,138,139]. Daha sonra biyoteknoloji yöntemi uygulanan ilk metal bakır olmuştur. Mineral önce mikroorganizmalar ile çözündürülmüş, daha sonra elde edilen çözeltiye solvent ekstraksiyon ve elektrokazanım metotları uygulanmıştır [89].

Bu günlerde biyoliç, yeni gelişen bir metot sayılmaz. Değerli metallerin madenlerden ve katı atıklardan geri dönüşümünü sağlayan gerçek bir endüstriyel teknoloji haline gelmiştir. Teknik metotların geliştirilmesi ve yeni özelliklere sahip yeni organizmaların denenmesi biyoliçte yeni trendler arasında sayılabilir [96].

2.5.5 Biyoliç Yönteminin Avantaj ve Dezavantajları

Yer kabuğundaki yüksek tenörlü madenler giderek azalmakta ve bu yüzden düşük tenörlü madenlerin işlenmesi daha önemli hale gelmektedir [84,107]. Geleneksel ergitme ve basınç liçi ile kıyaslandığında, sülfürlü minerallerin biyoliçinin en büyük avantajı, düşük tenörlü madenlere ve küçük boyutlu operasyonlara uygun olması, başlama sürelerinin kısa, operasyon basınç ve sıcaklığının düşük olmasıdır. Ergitme tesisleri büyük sermaye gerektirir, biyoliç tesislerine kıyasla daha fazla enerji harcar ve çevreye ciddi zarar verecek gaz emisyonuna neden olur [84]. Düşük sermaye gereksinimi ve düşük operasyon masrafları, biyoliçi % 0.5'ten daha az değerli metal içeren madenlerin işlenmesinde iyi bir alternatif haline getirmektedir [105, 139].

SO₂ asit yağmurlarına neden olan en önemli gazdır. Klasik pirometalurjik metotlar, beraberinde küresel ısınmayı, atmosfer ve çevre kirliliğini getirir ve üretilen metallerin önemli bir kısmı mineral atıklarının içerisinde kaybolur [96]. Biyoliç işlemi minerallerdeki sülfür ve indirgenmiş sülfür bileşiklerini sülfata dönüştürdüğü için bu tip bir kirliliğe rastlanmaz [5]. Ayrıca biyoliç, cevherin yer kabuğundan çıkarıldığı yerde uygulanabilir. Bu şekilde bakır yer kabuğunun çok derinlerinden kolaylıkla çıkarılabilir [134].

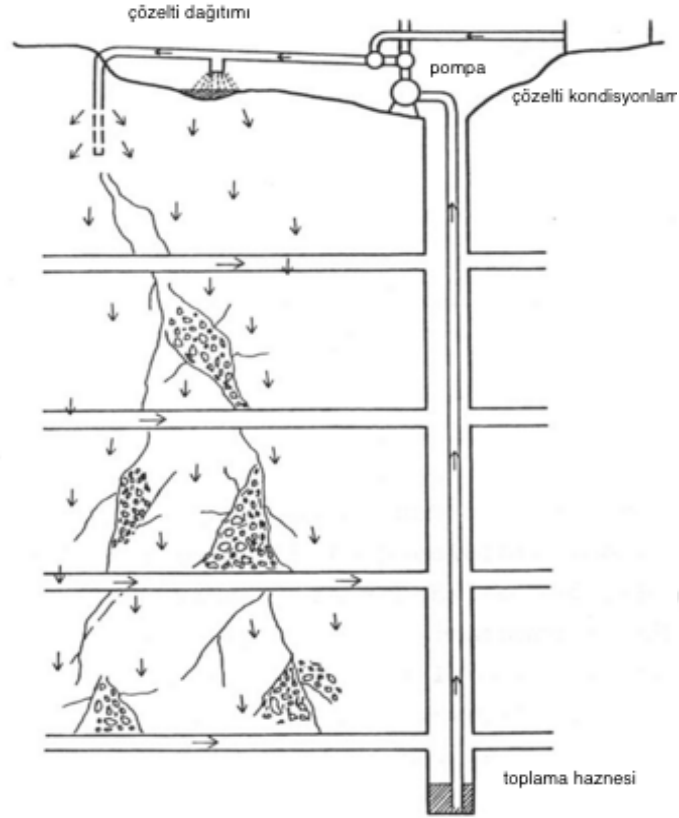
Biyoliçin geleneksel ergitme yöntemine kıyasla en büyük problemleri arasında, uzun liç

süresi, asidik metal sularının çevreye zararlı etkileri ve yığın liçinin çevre faktörlerine bağlı olması sayılabilir [84,106].

2.5.6 Güncel Biyoliç Teknikleri

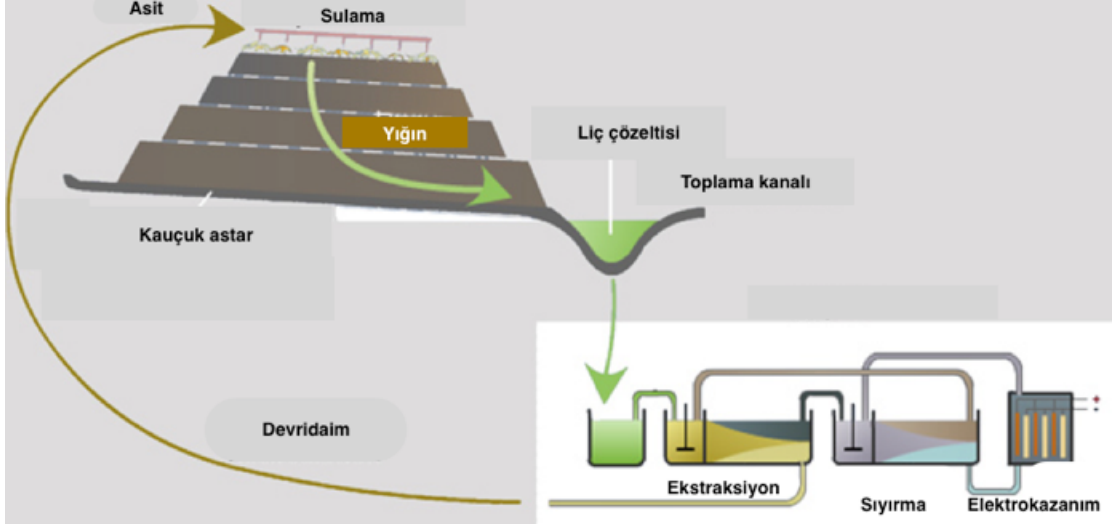
Temel biyoliç teknikleri, sulama-bazlı teknikler (yerinde liç, yığın liçi) ve sürekli karıştırmalı tank liçi şeklinde sınıflandırılabilir.

Yerinde liçte, metal içeren maddenin zeminden taşınması gerekmez. Bakteri içeren asidik liç solüsyonu, cevher kütlesine doğrudan enjekte edilir ve çözünmüş metalleri içeren liç solüsyonu sondaj delikleri açılarak toplanır. Bu metot, diğer geleneksel metotlarla işlenmesi ekonomik olmayan düşük tenörlü yataklar için kullanılır. Yerinde liç uzun zaman alır ve metal içeren asit çözeltilerinin sıkı şekilde kontrol edilmesi gerekir. Ancak, diğer metotlara göre çok daha ekonomik olup çevreye görünür etkileri çok daha azdır. Yine de çevreye zarar verme riski olduğundan, yerinde liç yapılacak alanın hidrolojik ve jeolojik özellikleri çok iyi bilinmelidir. Bu yüzden yerinde liç için resmi izin almak oldukça zordur. Bu teknik yüksek oranlarda üretim için uygun olmadığından, son yıllarda uygulaması azalmıştır [134,140].



Şekil 2.6 Yerinde liç düzeneği [141]

Yığın liçi, ekonomik açıdan en uygun biyoliç metodudur. Liç işlemi, minerallerin sızdırmaz bir zemin üzerine 6 - 10 m yüksekliğinde yığılması ile gerçekleşir. Yığılmadan önce, madenler küçük tanecik boyutuna ufalanır ve sülfürik asit ile bir araya toplanır. Bazı durumlarda, yığına mikroorganizmalar inokule edilir ve bazı besi maddeleri eklenerek mikrobiyal aktivite hızlandırılır. Fakat genelde yığındaki mikrobiyal gelişim, dışarıdan küçük bir müdahale ile doğal olarak hızlandırılır. Bakır, yüksek oranda yığın liçi yöntemi ile kazanılmaktadır [136].



Şekil 2.7 Yığın liçi düzeneği [142]

Alternatif biyoliç teknikleri içerisinde tank liçi en yüksek sermaye ve operasyon masrafı gerektiren yöntemdir. Bu tekniğin kısıtlayıcı yanı, düşük katı oranında etkin olmasıdır. Günümüzde özellikle bakır ve altın kazanımında kullanılan yığın ve tank biyoliçi, dünya genelinde iyi oturmuş sistemlerdir. Endüstriyel boyuttaki tank biyoliçi, yüksek sermaye ve pahalı operasyon özelliklerine sahip olduğu için, değerli mineral konsantreleri için uygun görülmektedir [107]. Kobalt, endüstriyel boyutta tank biyoliçi ile üretilmektedir [2]. Bakır, nikel ve çinko için de pilot uygulamalar yapılmaktadır [88].



Şekil 2.8 Tank biyoliçi düzeneği [143]

Pek çok endüstriyel yığın ve tank biyoliç işlemleri, genelde 40°C'nin altında yapılır. Daha yüksek sıcaklıklarda yapılan liç işlemleri ile daha yüksek oranda metal kazanımı elde edilir [122,144, 145].

2.6 Bakterilerin Gelişme Koşulları

Prokaryotlar, kemolitotrof, fotolitotrof, mikсотrof, fotoheterotrof ve heterotrof gibi pekçok fizyolojik gruba ayrılırlar. Bu grupların her biri, jeomikrobiyal açıdan önemli organizmaları içerir. Kemolitotroflar (kemosentetik ototroflar), metabolizmaları için gerekli enerjiyi inorganik bileşiklerin oksidasyonundan ve CO_2 , HCO_3^- veya CO_3^{2-} formundaki karbonun asimile edilmesinden elde ederler [76]. Farklı bakteriler, farklı enerji ve karbon kaynakları kullanırlar. Tarihi olarak bakıldığında, değerli metallerin sülfürlü minerallerden biyoliç ile kazanımında tiyonik (yunancada “tiyo”, “sülfür” anlamına gelir) bakteri veya *Thiobacilli* kullanılmıştır. Bu bakteriler kemolitotrofiktir, gerekli enerjiyi inorganik sülfür bileşiklerinden sağlarlar. Ayrıca hücre yapılımasında gerekli karbonu atmosferik CO_2 'ten ve/veya en azından bir kısmını organik bileşiklerden karşılayarak ototrofik ve/veya mikсотrofik olarak gelişirler [96]. Fosfor, nitrojen, potasyum ve diğer gerekli maddeleri ise biyoliç ortamından elde ederler [84].

Demiri ve indirgenmiş sülfür bileşiklerini okside edebilen, asidik ve yüksek metal konsantrasyonu içeren bir ortamda gelişimlerini sürdürebilen kemolitotrofik asidofilik bakteriler sülfürlü minerallerin biyoliçinde hayati bir rol oynarlar [146-149].

Yakın zamanda geniş çeşitlilikteki mikroorganizmaların sülfürlü minerallerin degradesyonunda payı olduğu anlaşılmışna rağmen [123,148,150], *Acidithiobacillus* ve *Leptospirillum* grubuna dahil olan bakteriler en çok bilinen ve ticari olarak en çok araştırılan çeşitler olmuştur. *A. ferrooxidans* kemolitotrofik, gram-negatif, çubuk şekilli, 0.2 – 0.8 μm çapında ve 0.9 – 2.0 μm uzunluğundadır [147,151,152]. Optimum gelişme sıcaklıkları 20 - 40°C'dir. pH değeri 1.0 - 5.0 arasındaki ortamlarda gelişir, optimum gelişim gösterdiği pH değeri ise 1.8 - 2.5 arasındır. *A. ferrooxidans*, gelişimi ve diğer metabolik fonksiyonları için gerekli olan enerjiyi ferröz demirin ve çeşitli inorganik sülfür bileşiklerinin oksidasyonundan sağlar.

Sülfürlü minerallerin biyoliçinde yaygın olarak kullanılan mikroorganizmalar, genelde ferröz demir ve indirgenmiş sülfür bileşiklerini gelişimleri için (elektron kaynağı olarak) kullanarak sülfürik asit ve ferrik demir üreten kemolitotrofik/asidofilik bakteri veya arkelerdir [134,153,154]. Optimum gelişme sıcaklıklarına göre mezofilik (~40°C), termofilik (~40 - 55°C), ve ileri derecede termofilik (~55 - 80°C) olarak sınıflandırılırlar [2]. Sülfür oksitleyici mikroorganizmalar, gelişimleri için gereken düşük pH değerinin

sürdürülmesi ve mineralin çözünmesini sağlayan proton atağı için gerekli sülfürik asidi üretirler [155, 156].



Bu mikroorganizmalar, çeşitlerine veya operasyon sıcaklığına bağlı olmaksızın, biyoliç için uygun olmalarını sağlayan ortak özelliklere sahiptirler. Bu özelliklerin en önemlileri:

- Atmosferdeki CO₂ fiksasyonu ile ototrofik olarak gelişmeleri,
- Ferröz demir veya indirgenmiş sülfür bileşiklerini veya her ikisini birden elektron donörü, genelde oksijeni elektron akseptörü olarak kullanmaları ve bu yolla enerji temin etmeleri,
- Genelde pH 1.0 – 5.0 değerleri arasında gelişebilen asidofilik bakteriler olmaları,
- Türler arasında farklılıklar olsa da, genelde metal iyonlarına karşı tolere düzeylerinin yüksek olması [156,157].

2.7 Bakterilerin Biyoliçteki Rolü

Bir minerali solumak düşüncesi garip gelse de, bakteriler bunu milyonlarca yıldır gerçekleştirmektedir. Solunum için gerekli enerji, elektronun bir elektron donöründen elektron akseptörüne transferi ile elde edilir. Bu transfer, hücre membranına yerleşmiş bir solunum zinciri yoluyla gerçekleşir. Belirli moleküller, elektronları birbirine aktararak hücre membranı boyunca bir potansiyel fark oluştururlar. Hücresel işlemlerin, (kimyasal enerjinin ATP formatında depolanması v.b.) gerçekleşmesinde bu potansiyel farktan yararlanılır. Solunumun başarıyla yapılabilmesi için, oksijen gibi bir nihai elektron akseptörünün mevcut olması gerekir [158]. Mikroorganizmalar aerobik (O₂ gereken organizmalar), anaerobik, mikroaerofilik (düşük konsantrasyonda O₂ gerektiren organizmalar) veya fakültatif organizmalar (katabolizmalarını oksijenli veya oksijensiz ortama adapte edebilen) şeklinde gruplandırılabilirler. Fakültatif organizmalar, ortamda O₂ varsa onu elektron akseptörü olarak kullanırlar. Ortamda O₂ yoksa, indirgenebilir inorganik (nitrat veya ferrik demir)/organik bileşikleri nihai elektron akseptörü olarak kullanırlar veya fermentasyon yaparlar [76].

Mikroorganizmaların biyoliç prosesindeki rolü, metal sülfid oksidasyon ürünlerini (Fe⁺²

iyonları ve sülfür bileşenleri) oksitleyerek, metal sülfat atak ajanları olan ferrik demir ve protonların üretilmesini sağlamaktır (Reaksiyon 2.4 ve 2.6). Aynı zamanda, proton üretimi sonucu pH düşer ve demir iyonları çözeltide çökelmeden kalır. Düşen pH değeri ile birlikte, minerallerin bakteriyel oksidasyon hızı da artar. Ferröz demirin biyooksidasyonu, kimyasal oksidasyondan yaklaşık $10^5 - 10^6$ kat daha hızlı olabilir [105].

2.8 Acidithiobacillus Cinsi Bakteriler

Acidithiobacilli cinsi bakteriler, değerli metallerin sülfürlü minerallerden çıkarılmasındaki etkili rolleri sebebiyle “biyomadencilik” alanında kullanılırlar. Asidofilik, gram-negatif ve çubuk şekillidirler. Hem mezofilik hem de termofilik olabilirler [77]. CO₂ fiksasyonu yapabildikleri için, organik karbon kaynağından bağımsız gelişebilirler. Bu özelliklerinden dolayı organik karbon konsantrasyonunun çok düşük olduğu maden atıkları ekosisteminde dahi hayatta kalabilirler [159].



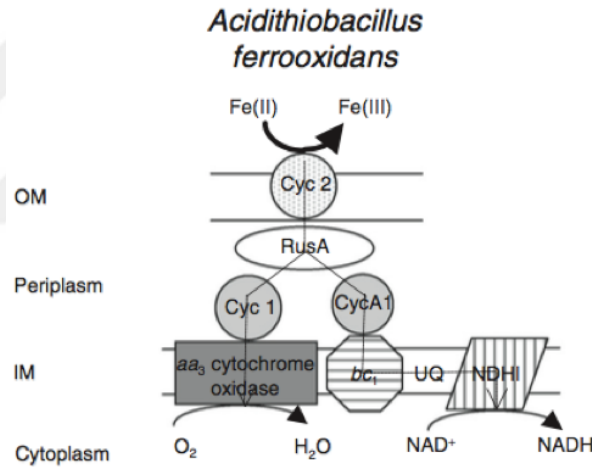
Şekil 2.9 *Acidithiobacillus ferrooxidans* bakterisinin TEM görüntüsü ($\times 30,000$) [160].

Günümüzde bilinen 6 çeşit *Acidithiobacilli* cinsi bakteri sırasıyla *A. thiooxidans*, *A. albertensis*, *A. caldus*, *A. ferrooxidans*, *A. ferrivorans* ve *A. ferridurans* olarak sayılabilir [133,161-166]. Tüm türleri inorganik sülfür bileşiklerini elektron donörü olarak kullanırlar. Bu yüzden, tüm dünyada metal sülfat yataklarında [167], sülfat yataklarıyla birleşmiş su kaynaklarında [168] ve deniz suyunda bulunurlar [169].

Mineralleri oksitlediği keşfedilen ilk bakteri *A. ferrooxidans*'tır ve tüm *thiobacilli* türleri arasında en iyi çalışılmış örnektir [9]. İndirgenmiş sülfür bileşiklerini oksijenli ve oksijensiz ortamda okside edebilir. Sülfür mobilizasyonundaki en önemli rolü, düşük pH değerlerinde metal sülfat oksidasyonunu katalize ederek çözeltiliye metal sülfat olarak salınmasını sağlamaktır [170]. Nitrojen kaynağı olarak amonyum kullanırlar [133].

Oksidasyon işleminde son elektron alıcısı genelde oksijendir [162]. *A. ferrooxidans* aerobik bir mikroorganizma olarak tanımlanmasına rağmen, elementel sülfür veya metal sülfürlerin bulunduğu ortamlarda, Fe^{+3} ü elektron alıcısı olarak kullanmak suretiyle oksijensiz olarak da büyüebilmektedir [171,172].

A. ferrooxidans diğer biyoliç bakterilerine nispeten daha hızlı büyüebilir ve genellikle 20 - 35°C arasındaki sıcaklıklarda rahatlıkla gelişme gösterir [173]. Çeşitli metal iyonlarının çözünmüş formları birçok bakterinin gelişimini inhibe ederken *A. ferrooxidans* metal iyonlarına yüksek oranda tolerans gösterir [134,174]. *A. ferrooxidans*'ın ferröz demiri oksitlemesi ile ilgili pek çok model ileri sürülmüştür. Ehrlich bu modellerle ilgili kritik bir makale kaleme almıştır [100]. En çok kabul gören modele göre ferröz demirin oksidasyonu, hücrenin dış membran yüzeyinde gerçekleşir [175].



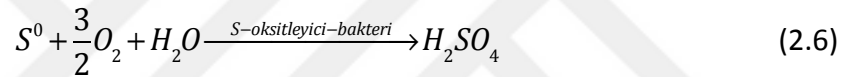
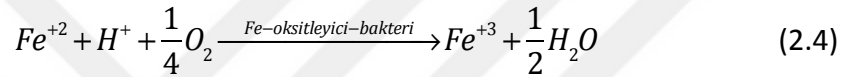
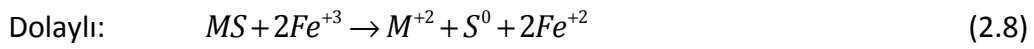
Şekil 2.10 *A. ferrooxidans* bakterisinde demir oksidasyonunun metabolik yolu [175].

OM: dış membran, IM: iç membran

2.9 Biyoliç Mekanizmaları

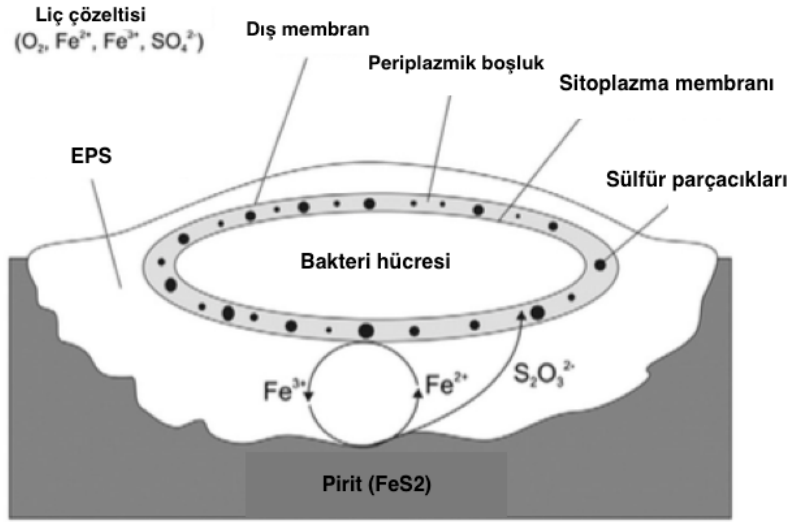
Biyojenik veya abiyojenik (canlı organizmalar tarafından üretilmemiş) kaynaklı olduğuna bakılmaksızın, doğadaki tüm metal sülfidler mikrobiyal oksidasyona uğrayabilir [69]. Bakteriyel oksidasyon işlemi, çoklu basamaklarla gerçekleşir. Mineralin kristal yapısı kırılır, oksidasyon ajanları (Fe^{+3} , H^{+}) kırılmış kristal yapıya nüfuz eder ve mineralin demir/sülfür bileşiklerindeki elektronlarının oksijene transferi vesilesiyle, mineral daha ileri derecede oksidasyona uğramış olur [176].

Geçmiş yıllarda, biyoliç sırasında minerallerin çözünme mekanizmaları tartışılmıştır. Eski literatürde, doğrudan ve dolaylı biyoliç tanımlaması vardır [105,152]. Doğrudan liç mekanizmasına göre, mineral yüzeyine tutunan bakteriye metal sülfid tarafından elektron transferi yapılır. Dolaylı liç ise bakterilerin ürettiği Fe^{+3} aracılığıyla gerçekleşir. Planktonik veya mineral yüzeyine tutunan *A. ferrooxidans* gibi Fe^{+2} oksitleyici asidofilik organizmalar, demir piritlerden Fe^{+3} iyonu üretebilirler [2]. Dolaylı mekanizmada, mikroorganizmalar demiri, demir de metal sülfidi oksitler.



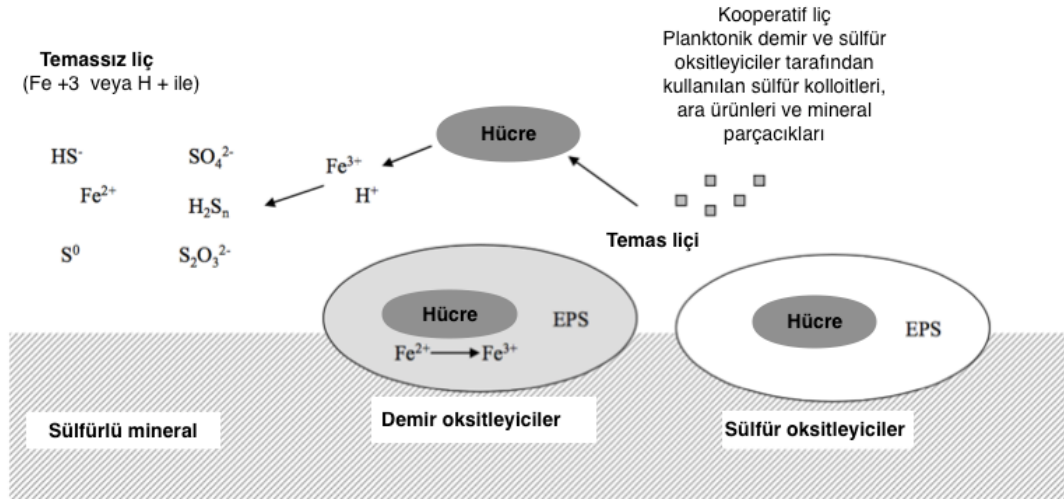
M, uygun bir oksidasyon durumundaki herhangi bir metal olabilir. *A. ferrooxidans*'ın dolaylı oksidasyondaki ana rolü, yukarıdaki reaksiyonda oluşan Fe^{+2} 'nin tekrar Fe^{+3} 'e oksidasyonudur. Biyokimyasal oksidasyonun aksine kimyasal oksidasyonda, bir mineralin sülfid kısmı çoğunlukla elementel sülfüre oksitlenir. Elementel sülfürün yeniden kimyasal oksidasyona uğrayarak sülfürik aside dönüşümü çok yavaştır. Fakat bu proses, *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* gibi bakteriler tarafından oldukça hızlandırılır [91].

Metal sülfid ile, ona tutunan bakteri arasında doğrudan elektron transferi yapabilecek herhangi bir enzim gözlenemediği için doğrudan liç mekanizması pek muhtemel görünmemektedir [2]. Bunun yerine, mineral yüzeyine tutunan bakterilerin, Fe^{+3} vasıtası ile dolaylı liçi gerçekleştirdiği EPS ile dolu bir alan oluşturduğu düşünülmektedir [92,177]. Rodriguez ve Tributsch, bakteri hücresi ile mineral yüzeyi arasında birkaç nm genişliğinde bir mesafe olduğunu ispatlamışlardır. Bu mesafenin EPS'yi işaret ettiği ve EPS ile kompleks oluşturan Fe^{+3} iyonlarının minerallerin çözünme fonksiyonunu bu bölgede yerine getirdiği düşünülmektedir. Yine de bu süreçler tam olarak anlaşılamamıştır [178].



Şekil 2.11 Pirit yüzeyine tutunan *A. ferrooxidans* hücresi ve EPS tabakası [179].

Doğrudan ve dolaylı biyoliç tanımlarından kaçınmak amacıyla, sırasıyla mineral yüzeyine tutunan ve planktonik bakteriler aracılığıyla gerçekleştiği düşünülen yeni terimler olan “temas liçi” ve “temassız liç” tanımları önerilmiştir. Sülfür kolloitlerinin, sülfür ara ürünlerinin ve mineral parçalarının çözünmesini açıklamak için ise, üçüncü bir terim olarak “kooperatif liç” tanımlanmıştır [134,180]. Temas liçi mekanizmasına göre, biyoliç reaksiyonlarının bakteri hücresi ve mineral yüzeyi arasındaki EPS tabakası içinde gerçekleştiği varsayılmıştır [134]. Kooperatif liç, dolaylı ve temas liçinin birleşmesiyle oluşur. Bu mekanizmaya göre bazı mikroorganizmalar mineral yüzeyine tutunarak gelişirken, serbest halde bulunan (planktonik) demir ve sülfür oksitleyici mikroorganizmalar da mineralin çözünme sırasında salgıladığı sülfür ve mineral parçacıkları ile beslenirler [179,180].



Şekil 2.12 Sulfürlü minerallerde dolaylı liç mekanizmalarının şematik gösterimi [134]

2.10 Biyoliç Etkileyen Faktörler

2.10.1 Sıcaklık

Sıcaklık, yaşayan mikroorganizmaları iki farklı yönde etkileyebilir. Sıcaklık optimum bir değere kadar arttıkça, reaksiyon hızı da artar ve hücre içindeki kimyasal/enzimatik reaksiyonlar hızlanır, hücre daha hızlı gelişir. Bununla birlikte, maksimum sıcaklığın üstünde belirli proteinler geri dönülemez şekilde denatürasyona uğrarlar. Ferrik demirin çözünürlüğü, yüksek sıcaklıklarda pH değerleri düşük olsa dahi azalır. Sıcaklık arttıkça, metabolik reaksiyonlar denatürasyonun başladığı noktaya kadar hızlanır ve hücre fonksiyonları keskin bir şekilde sıfıra iner [135]. Bu yüzden sıcaklık biyoliç reaksiyon hızı üzerinde önemli derecede etkilidir.

2.10.2 pH

Biyoliç ortamının pH değeri, asidofilik bakterilerin gelişimini ve aktivitesini önemli derecede etkiler [181-183]. Aynı zamanda asidik ortamda bulunan protonlar (H^+), oksijeni indirgeyerek su oluşturma işleminde kullanıldığı için bakterilerin gelişimi açısından önemlidir [184]. Düşük pH değerinde hem mineralin çözünürlüğü artar hem de ferrik demir çözünür fazda kalarak biyoliç için kullanışlı olmaya devam eder. Bununla beraber, yığın liç sırasındaki pH değerleri, heterojen şartlar ve farklı maden karakteristikleri nedeniyle, önemli oranda değişebilir. Sulfürlü minerallerin ferrik demir ile oksidasyonu asit üreten bir reaksiyonken, sulfürlü minerallerin içerisinde bulunan pek çok gang maddeler (kuartz, mika, klorit, potasyum- ve kalsiyum-feldspar) asit

tüketirler [107]. Fe^{2+} 'nin Fe^{3+} 'e oksidasyonu da asit tüketen bir reaksiyondur (Reaksiyon 2.4).

Ferröz demirin ferrik demire oksidasyonunun tersine, ferrik demirin hidrolizi asit üreterek pH değerini düşürür. Ferrik hidroksit oluşumu eşitlik (2.9) ile gösterilmiştir [185].



Ferrik iyon çöktürmeleri sülfürlü mineralin yüzeyini kaplamak suretiyle çözeltideki oksidasyon ajanlarının minerale difüzyonunu engileyebilir. Bu yüzden liç işlemi yavaşlar [181,182].

Biyoliç sırasında ortaya çıkan elementel sülfür *A. ferrooxidans* ve *Sulfobacillus* tipi bakterilerce okside edilirken asit üretilir [185,186]. Biyoliç esnasında eş zamanlı olarak gerçekleşen çözünme, çökme, oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları net asit üretimi veya tüketimine katkı sağlarlar. Bu yüzden özellikle yığın liçinde pH değerini sabit bir seviyede tutmak oldukça zordur [107].

2.10.3 Besi Ortamı

Biyoliç işleminde kullanılan mikroorganizmalar kemolitotrofik olduğundan, gelişimleri için inorganik bileşiklere ihtiyaç duyarlar. Gelişimleri sırasında sülfürlü minerallerden metal ekstraksiyonunu gerçekleştirirler. İdeal gelişme ortamının sağlanması için, besi ortamına sülfürlü minerallerin yanısıra amonyum, fosfat ve magnezyum tuzlarının ilavesi gerekir [105].

2.10.4 Diğer Metaller

Mikroorganizmalar, pek çok metale çeşitli biyokimyasal rollerinden dolayı (katalizör, enzim ko-faktörü ve protein yapısını stabilize etmeleri bakımından) gereksinim duyarlar [187]. Ancak normal fizyolojik konsantrasyonun üzerinde, bu metaller toksik etki yaparlar. *A. ferrooxidans* için 20.0 g/L Fe^{+2} ve Fe^{+3} iyonlarının bakteri gelişimini engellediği rapor edilmiştir [188,189].

2.10.5 Tane Boyutu

Ufalanmış mineralin tanecik boyutu küçüldükçe yüzey alanı artar ve biyoliç çözeltisi mineralin daha geniş yüzeyiyle etkileşebildiği için biyoliç hızı artar [105].

2.10.6 Madenin Karakteristik Yapısı

Madenin mineralojisi ve mineral kompozisyonu biyoliç verimini etkiler. Fakat şaşırtıcı şekilde, maden mineralojisi, kristal yapısı ve reaksiyon kimyası arasındaki bağlantıya ilişkin çok az sayıda araştırma yapılmıştır [84]. Bir mineralin kristal yapısı, o mineralin oksidasyon eğilimini belirleyen önemli bir faktördür. Pirit minerali bakteri atağına çok elverişli iken, bazı çok düzenli kristal yapıya sahip mineraller bakteriyel oksidasyona karşı oldukça dirençlidir [194,195]. Muhtemelen çok düzenli kristal yapıya sahip mineraller, düzensiz kristal yapıdaki minerallere kıyasla, oksidasyona daha az eğilim gösterirler [69].

MATERYAL VE METOTLAR

3.1 Kullanılan Besi Yeri ve Kimyasallar

Pirotit (Ward's Scientific, 46 E 6498), Pirit (Ward's Scientific, 46 E 6418), Kalkopirit (Ward's Scientific, 46 E 0068), Immersion oil (Cat # 16915-01), Koptec 200 proof pure ethanol, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , Wolfe mineral solüsyonu, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Hydroxylamine hydrochloride, H_2SO_4 , HCl, Ferrozine (Sigma P-9762 3-(2-Pyridyl)-5,6-bis(4-phenylsulfonic acid)-1,2,4-triazine), Bathocuproinedisulfonic acid disodium salt hydrate, HEPES (Sigma-Aldrich H-0891), Paraform aldehyde, agarose, Mounting medium, Gliserol ($\text{HOCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$).

3.2 Bakteri Kültürlerinin Yetiştirilmesi

Biyoliç deneylerinde kullanılan saf *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 kültürü, American Type Culture Collection (ATCC) firmasından temin edilmiştir. Bakteri kültürünün gelişimi amacıyla kullanılan besiyeri ve Wolfe mineral solüsyonunun içeriği sırasıyla Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2'de verilmiştir.

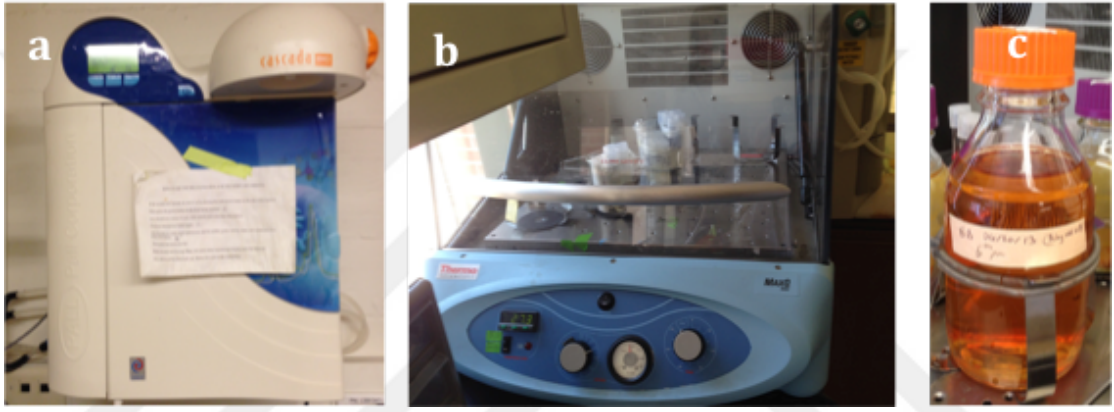
Çizelge 3.1 A. ferrooxidans bakterisinin gelişimi için kullanılan besi yeri (ATCC 2039)

Çözelti A	Miktar
$(NH_4)_2SO_4$	0.8 g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.0 g/L
K_2HPO_4	0.4 g/L
Wolfe mineral solüsyonu	0.5 % (V/V)
Çözelti B	Miktar
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	20.0 g/L

Çizelge 3.2 Wolfe mineral solüsyonu içeriği

Kimyasal	Miktar
Nitriloasetikasit	1.5 g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3.0 g/L
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.5 g/L
$NaCl$	1.0 g/L
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1 g/L
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.1 g/L
$CaCl_2$	0.1 g/L
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1 g/L
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.01 g/L
$AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	0.01 g/L
H_3BO_3	0.01 g/L
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.01 g/L
Distile su	1000 mL

Çizelge 3.1’de gösterilen kimyasallar kullanılarak ultra saf su içerisinde hazırlanan çözelti A’nın pH değeri, sülfürik asit kullanılarak 2.3 değerine ayarlanmış ve 121°C sıcaklıkta 15 dakika otoklav işlemine tabi tutularak sterilize edilmiştir. Çözelti B ayrıca hazırlandıktan sonra, 0.22 µm boyutundaki filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir. Son olarak, çözelti A ve B steril şartlar altında sırasıyla 4:1 oranında karıştırılarak nihai besi yeri elde edilmiştir. Bu besi yerine ekilen *Acidithiobacillus ferrooxidans* kültürü, çalkalamalı inkübatörde 120 rpm hızında karıştırılarak 7 gün boyunca geliştirildikten sonra, biyoliç işlemlerinde kullanılmak üzere hasat edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Besi yerinin hazırlanması için kullanılan
a) ultra saf su cihazı, b) çalkalamalı inkübatör, c) geliştirilen *A. ferrooxidans* kültürü

3.3 Minerallerin hazırlanması

Biyoliç deneylerinde kullanılan sülfürlü mineraller, Ward’s Scientific firmasından temin edilmiştir. Kullanılan mineraller ve temin edildikleri bölgeler:

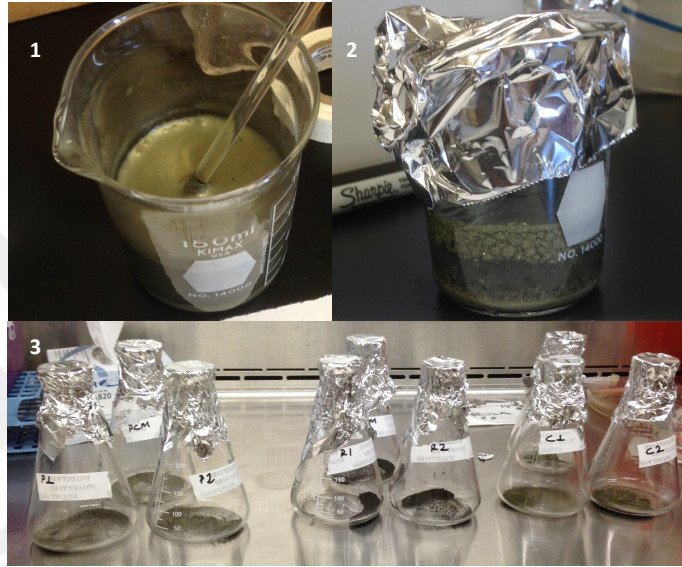
- Pirit (Huanzala, Peru)
- Pirotit (Virginia, USA)
- Kalkopirit (Durango, Mexico)

Tüm mineraller seramik havanda öğütülmüş ve 355 µm’lik elekten geçirilerek $\leq 355 \mu\text{m}$ boyutuna getirilmiştir. Mineraller daha sonra üç basamaklı bir işlemde geçirilerek sterilize edilmiştir (Şekil 3.2):

1. Çok ince parçacıkların uzaklaştırılması amacıyla distile su ile yıkanmıştır. Her yıkamada ultrasonik temizleyicide 1-2 dk. bekletilerek, üste çıkan ince partiküller uzaklaştırılmıştır. Bu işlem, ince partiküller görülmeyinceye kadar

tekrarlanmıştır.

2. Mineraller % 10 HCl çözeltisinde 2 saat bekletildikten sonra, % 100 etanol ile durulanmıştır. Geniş bir kaba konularak steril kabinde kurumaya bırakılmıştır.
3. 250 mL'lik steril erlenlere kurutulan minerallerin her birinden 2'şer gram konulduktan sonra 121°C sıcaklığında 8 dk. otoklav işlemine tabi tutulmuştur [18].



Şekil 3.2 Öğütülmüş minerallerin biyolojik deneyleri öncesi sterilizasyon basamakları



Şekil 3.3 Mineral temizliğinde kullanılan ultrasonik temizleyici

3.4 Biyoliç Deneyleri

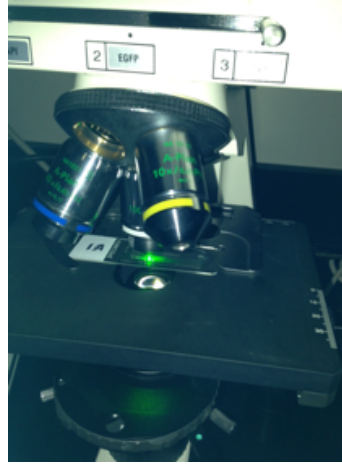
Demir kaynağı olarak $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ kullanılan besi yerinde 1 hafta boyunca geliştirilen *Acidithiobacillus ferrooxidans* kültürlerinden 30'ar mL alınarak 50 mL'lik tüpler içerisine konulmuştur. Daha sonra 20 dk. boyunca 10.000 rpm hızında santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Süpernatantları boşaltılan tüplere, pH'ı sülfürik asitle 1.5 değerine ayarlanan ve filtrasyon yöntemi ile sterilize edilen distile su eklenerek 10.000 rpm hızında 15 dk. daha santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Tekrar süpernatantı boşaltılarak, her bir tüp içerisine 2'şer mL steril A çözeltisi eklenerek resüspansiyon yapılmıştır. Son işlem olarak içerisinde 2'şer gram steril mineral ve 35 mL steril A çözeltisi bulunan 250 mL'lik erlenler, her bir tüpte bulunan yıkanmış hücre süspansiyonları ile inokule edilerek biyoliç işlemleri başlatılmıştır [18]. Her bir mineral için ikişer tane biyotik (*A. ferrooxidans* + besi yeri + öğütülmüş mineraller) ve birer tane kontrol (besi yeri + öğütülmüş mineraller) erlenleri hazırlanmış ve 25°C sıcaklığında, 30 gün boyunca çalkalamadan inkübe edilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Pirit, pirotit ve kalkopirit minerallerini içeren biyotik ve kontrol erlenlerin 30 günlük biyoliç deneyleri sonucundaki görünümü

3.5 Analitik Teknikler

Erlenlerden günlük olarak alınan liç çözeltileri kullanılarak planktonik bakteri hücre sayısı, pH, Fe^{+2} , toplam Fe ve Cu^{+2} iyon konsantrasyonları ölçümü yapılmıştır. Hücre sayımı için mikroskop lamelleri % 1 agaroz ile kaplanmış ve kuruması beklenmiştir. Daha sonra, lamelin üzerindeki 4 mm çaplı dairenin içerisi 2 μL hacmindeki biyoliç hücre kültürü ile doldurulmuştur [192]. Kuruyan hücre kültürü, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ile boyandıktan sonra 100 X büyütmeli Axiostar Plus floresans mikroskobu altında, daire içerisindeki 50 ayrı alan sayılarak çözeltideki mL başına düşen bakteri konsantrasyonu belirlenmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 Axiostar Plus floresans mikroskobu

Liç solüsyonlarından her gün 1 mL örnek alınarak 0.2 μm 'lik filtrelerden geçirilmiş ve Thermo Scientific pH-metre ile pH ölçümü yapılmıştır.



Şekil 3.6 Thermo Orion 2 star pH metre

Fe^{+2} ve toplam Fe iyon ölçümleri için, günlük olarak alınan 1'er mL liç çözeltileri 0.2 μm 'lik filtrelerden geçirilmiş ve çözeltinin iyonca fazla doymun olduğu durumlarda, 1 mM HCl çözeltisi ile 10 kat seyreltilmiştir. Cu^{+2} iyon konsantrasyonu ölçümü için de günlük 1 mL örnek alınarak 0.2 μm 'lik filtrelerden geçirilmiş ve distile su ile 100 kat seyreltilmiştir. Tüm iyon ölçümleri, UV-Spektrofotometre (Schimadzu UV-1601) kullanılarak kolorimetrik metotla gerçekleştirilmiştir. Günlük örnek alınması sonucu azalan çözelti hacmi, aynı hacimde steril A çözeltisi eklenerek tamamlanmıştır.

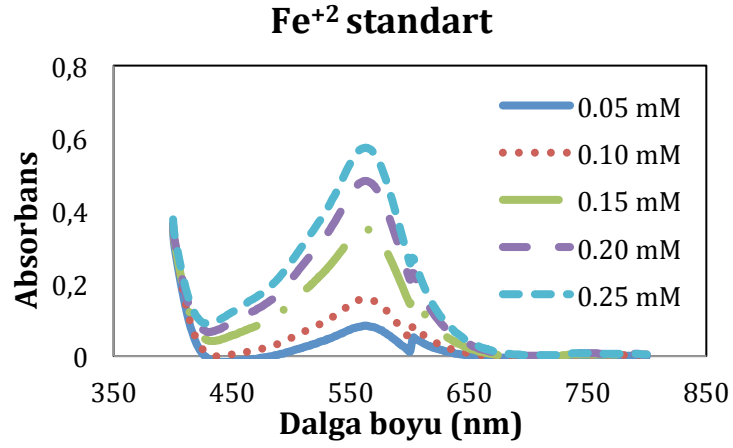
Toplam Fe ve Fe^{+2} iyon konsantrasyonları, orijinal ferrozin metodu modifiye edilerek geliştirilen bir protokolle ölçülmüştür. Sulu çözeltide ferrozin ile ferröz demir bir

kompleks oluşturarak magenta renginde bir bileşik oluşturur (Şekil 3.7). Oluşan kompleks, görünür ışıktaki 562 nm dalgaboyunda keskin bir pik verir [193]. Bu sayede çözeltide bulunan Fe^{+2} iyon konsantrasyonu spektrofotometrik metotla ölçülebilir. Toplam demir iyon ölçümü için çözeltideki Fe^{+3} iyonları bir indirgeyici ajan yardımıyla (hydroxylamine hydrochloride) Fe^{+2} 'ye indirgenerek aynı metotla ölçülmüştür. Referans olarak kullanılmak üzere, 1 mM HCl içerisinde belirli konsantrasyonlarda FeSO_4 çözeltileri hazırlanmıştır. Standart solüsyonların ve alınan liç örneklerinin 520 nm dalga boyundaki absorbans değerleri kullanılarak demir iyon konsantrasyonları belirlenmiştir (Şekil 3.8 ve 3.9).

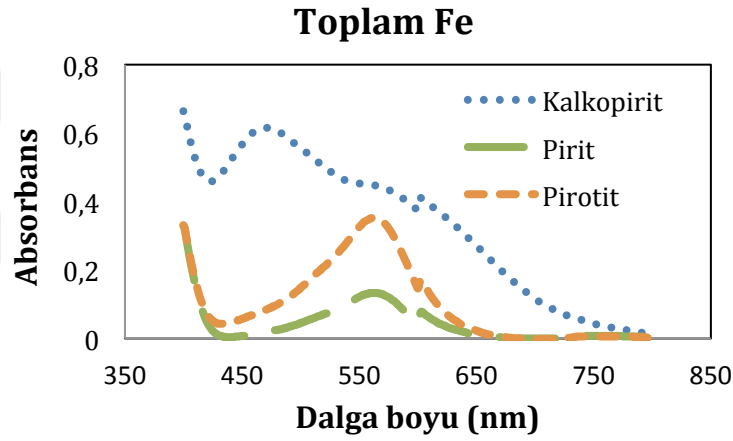
Cu^{+2} iyon konsantrasyonu ölçümü için ise 0.1 mM Bathocuprione disulfonik asit (BC) ve indirgeyici reaktif (hydroxylamine hydrochloride) kullanılmıştır. Ölçüm metodu, Moffett ve arkadaşlarının çalışması modifiye edilerek geliştirilmiştir [194]. BC ile Cu^{+2} iyonları, sarı-turuncu renkli bir kompleks oluşturur ve 484 nm civarında pik verir (Şekil 3.7). Referans olarak kullanılmak üzere, distile su içerisinde belirli konsantrasyonlardaki CuSO_4 çözeltileri hazırlanmıştır (Şekil 3.10). Cu^{+2} iyon konsantrasyonlarının ölçümü için, standart solüsyonların ve alınan liç örneklerinin 400-800 nm dalga boyları arasındaki absorbans değerleri kullanılmıştır. Cu^{+2} iyon konsantrasyonlarının tespiti için, 484 nm dalga boyunda oluşan pikin alanı Shimadzu UV Probe Version 2.20 software kullanılarak hesaplanmıştır.



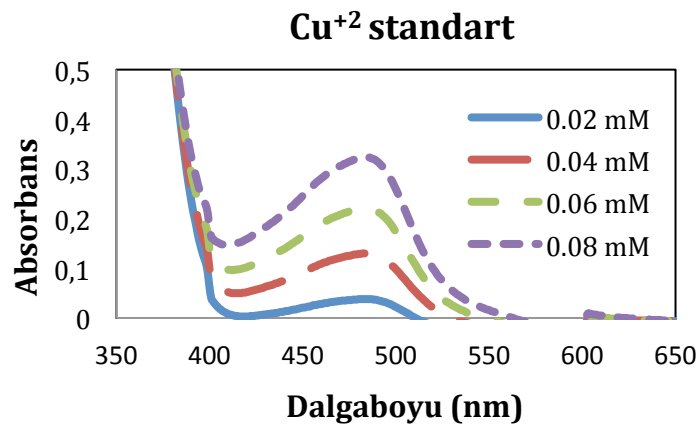
Şekil 3.7 Demir ve bakır iyon konsantrasyonlarının UV-Spektrofotometre ile kolorimetrik olarak tespiti.



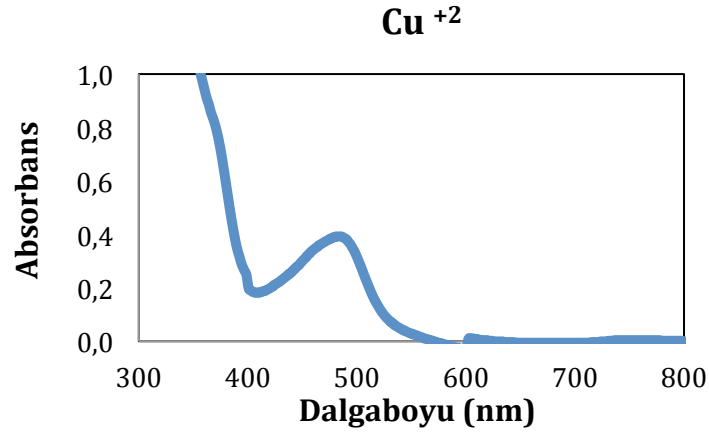
Şekil 3.8 Liç çözeltilerindeki Fe²⁺ iyon konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla hazırlanan standart solüsyonun dalgaboyuna bağlı absorbans grafiği



Şekil 3.9 28 günlük deney sonucunda kalkopirit (100 kat seyreltilmiş), pirit ve pirotit minerallerinin liç çözeltilerinin toplam Fe absorbans grafiği



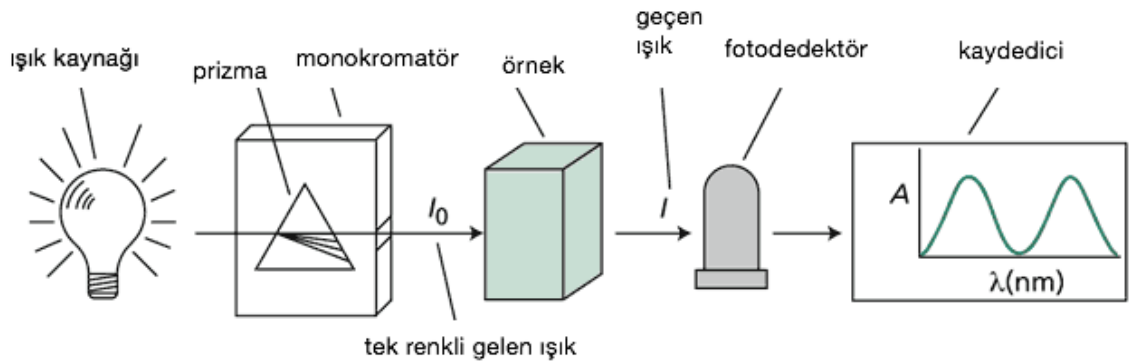
Şekil 3.10 Liç çözeltilerindeki Cu²⁺ iyon konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla hazırlanan standart solüsyonun dalgaboyuna bağlı absorbans grafiği



Şekil 3.11 28 günlük deney sonucunda kalkopirit (100 kat seyreltilmiş) mineralinin liç çözeltisinin Cu⁺² absorbe grafiği

Spektrofotometre ve Çalışma Prensibi

Spektrofotometre, herhangi bir maddede veya çözeltide bulunan kimyasal bileşenlerin ışığın belli bir dalga boyunu ne derece absorbe ettiğini, örnekten geçirilen bir ışık demetinin şiddetini (I) ölçmek suretiyle belirler. Çalışma prensibi, her bir kimyasal bileşenin gelen ışığın belirli bir dalga boyunu geçirmesi veya yansıtması esasına dayanır.



Şekil 3.12 Bir spektrofotometrenin elemanları

Gelen ışık demetindeki azalma denklem (3.1) ile gösterilebilir:

$$dI / dx = -I\sigma C \quad (3.1)$$

Denklem (3.1)'de I ışın demetinin şiddetini, x mesafeyi (cm), σ molar soğurma katsayısını (cm^2/mol) ve C ışığı absorbe eden maddenin konsantrasyonunu (mol/cm^3)

ifade eder.

Bu eşitliğin çözümü Beer-Lambert yasası olarak bilinir:

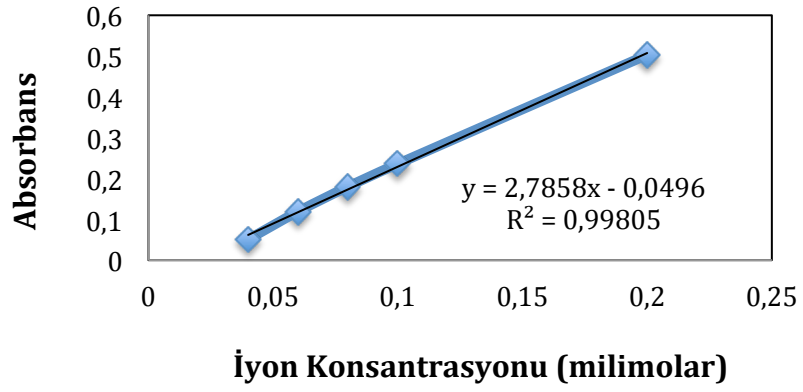
$$I = I_0 e^{-\sigma C x_0} \quad (3.2)$$

Denklem (3.2)'de I_0 ışığı absorbe eden herhangi madde olmadığı durumda çözeltilerden geçen ışığın şiddetini ve x_0 spektrofotometre küvetinin uzunluğunu ifade eder. Eşitliğin her iki tarafı da I_0 'a bölünür ve logaritması alınır, Beer eşitliği lineer hale getirilir. k sabit bir sayı, A ise örneğin absorpsiyon değeridir.

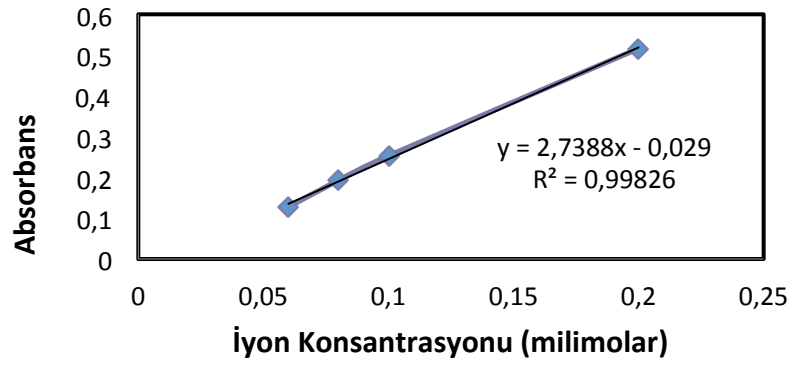
$$A = -\log(I / I_0) = kC \quad (3.3)$$

Spektrofotometre tarafından ölçülen A absorpsiyon değeri, örneğin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Örneklerdeki demir ve bakır iyon konsantrasyon değerini tam olarak hesaplamak için, öncelikle bilinen konsantrasyon değerlerinde FeSO_4 ve CuSO_4 çözeltileri hazırlanarak bu çözeltilerin absorpsiyon değerleri kullanılarak absorpsiyon - konsantrasyon eğrisi ($C - A$ eğrisi), diğer bir ifadeyle "Standart eğri" elde edilmiştir. UV-Spektrofotometre (Schimadzu UV-1601) yardımı ile hazırlanan standart eğrilerin eğimi ve ölçülen örneklerin absorpsiyon/pik alanı değerleri kullanılarak örneklerin konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır.

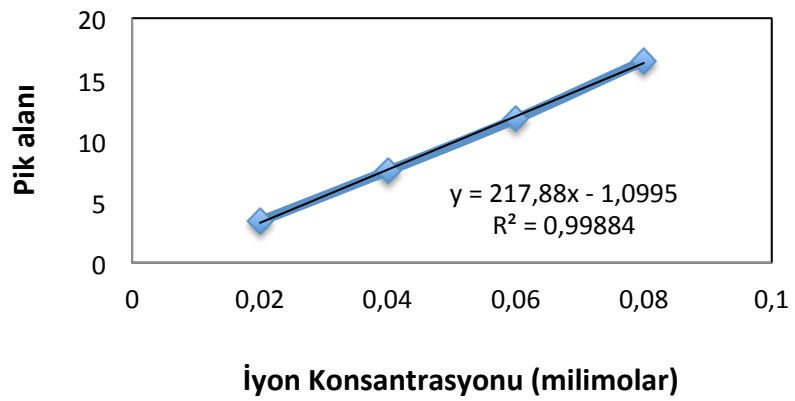
Fe²⁺ standard eğri



Toplam Fe standard eğri



Cu²⁺ standard eğri



Şekil 3.13 Fe²⁺, toplam Fe ve Cu²⁺ iyon ölçümü için kullanılan standard eğriler

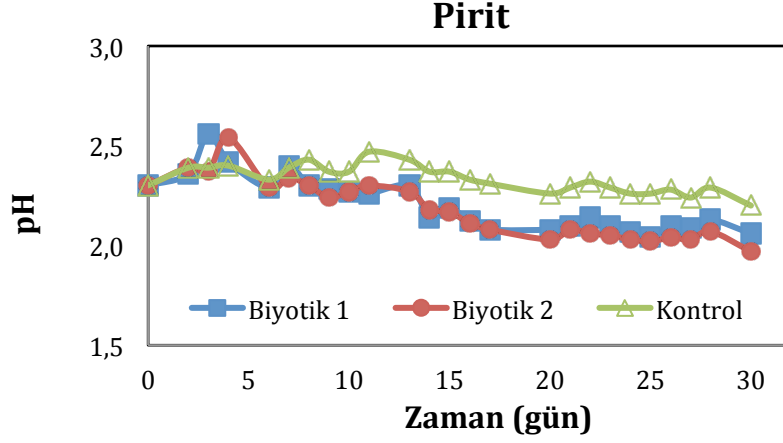
BÖLÜM 4

BULGULAR

Bu tez çalışması kapsamında sırasıyla Peru, Amerika ve Meksika'dan temin edilen pirit, pirotit ve kalkopirit minerallerinin biyotik (*A. ferrooxidans* ATCC 23270) ve kimyasal (kontrol) çözünme mekanizmaları incelenmiştir. Her bir mineralin bulunduğu biyoliç ve kontrol çözeltilerinin pH değeri, biyoliç çözeltilerindeki bakteri konsantrasyonu, çözeltilerin içerdiği Fe^{+2} , Fe^{+3} ve kalkopirit biyoliç çözeltisinin içerdiği Cu^{+2} iyon konsantrasyonları ölçülmüş, kullanılan minerallerin deney öncesi XRD ve XRF analizleri yapılmış ve elde edilen sonuçlar tartışma kısmında detaylı şekilde analiz edilmiştir.

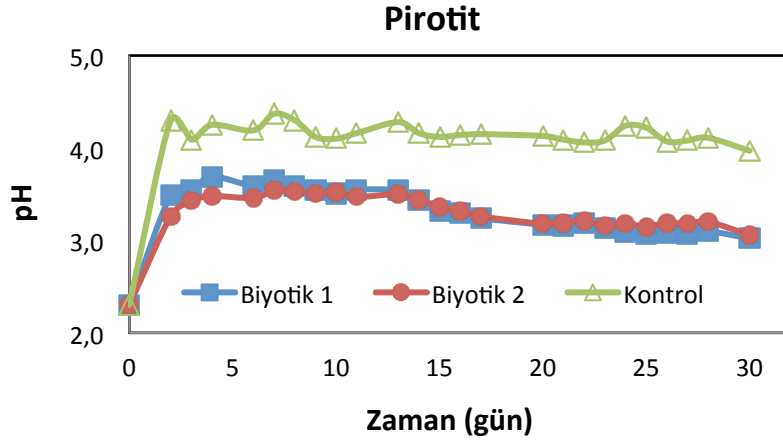
4.1 Liç Çözeltilerinin pH Değerleri

Tüm çözeltilerin başlangıç pH değeri 2.3 olarak ayarlanmıştır. Pirit mineralinin bulunduğu biyotik ve kontrol çözeltilerinin her ikisinde de pH değerinde zamanla bir azalma gözlenmiştir. Kontrol çözeltisinin pH değeri, 30 gün boyunca biyotik çözeltilerinin pH değerinden yüksek çıkmıştır.



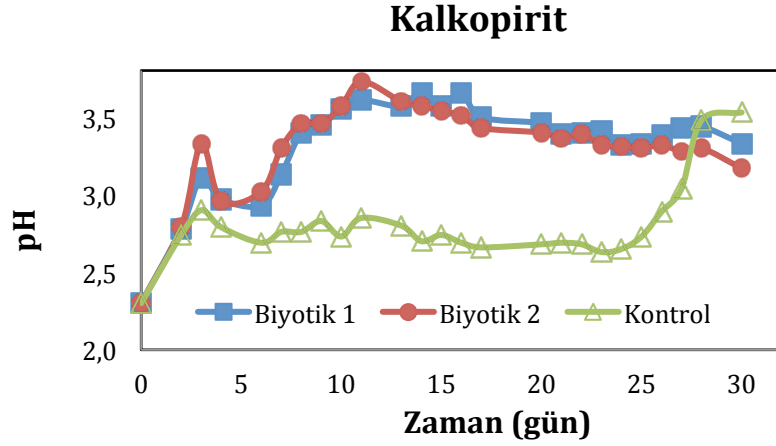
Şekil 4.1 Pirit minerali içeren biyotik (*A. ferrooxidans* ile inokule edilen) (● ve ■) ve kontrol (inokule edilmeyen) (Δ) pH değerlerinin zamanla değişimi

Pirit mineralini içeren biyotik ve kontrol çözeltilerinin pH değerleri, ilk 3-4 gün boyunca artmış, daha sonra hafif şekilde azalmıştır. Kontrol çözeltisinin pH değeri 30 gün boyunca biyotik çözeltilerinin pH değerlerinden yüksek olarak gözlenmiştir.



Şekil 4.2 Pirotit minerali içeren biyotik (● ve ■) ve kontrol çözeltilerinin (Δ) pH değerlerinin zamanla değişimi

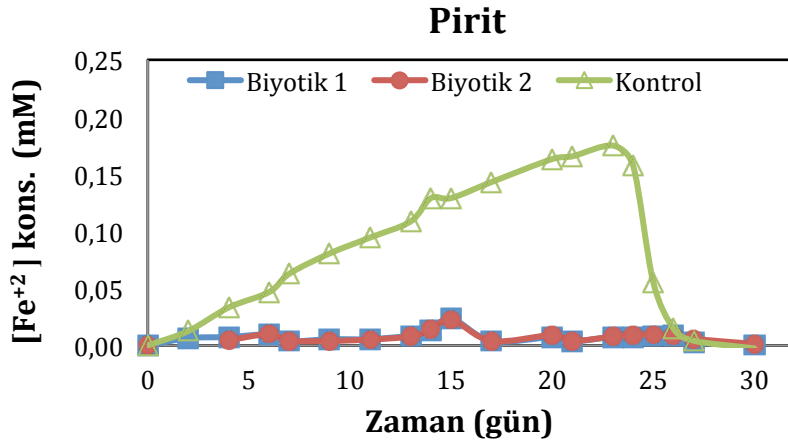
Kalkopirit mineralini içeren biyotik ve kontrol çözeltilerinin pH değerleri, ilk 3 - 4 gün boyunca keskin şekilde artmıştır. Biyotik çözeltilerin pH değerleri yaklaşık 15 gün boyunca artmaya devam ederken, ilerleyen günlerde hafif şekilde azalmıştır. Kontrol çözeltisinin pH değerleri ise yaklaşık 20. güne kadar belirgin bir farklılık göstermemiş, son 5 günde artmıştır.



Şekil 4.3 Kalkopirit minerali içeren biyotik (● ve ■) ve kontrol (Δ) çözeltilerinin (Δ) pH değerlerinin zamanla değişimi

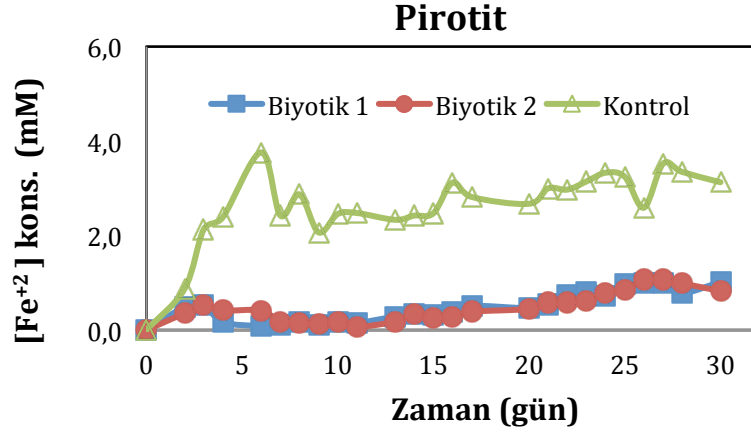
4.2 Liç Çözeltilerinin Fe^{+2} İyon Konsantrasyonları

Fe^{+2} iyonlarının bakteriler tarafından hızlı oksidasyonu sonucunda, biyoliç çözeltilerinde çok düşük değerlerde, kontrol (abiyotik) çözeltilerinde ise yüksek değerlerde Fe^{+2} iyon konsantrasyonları gözlenmiştir. Pirit mineralinin kontrol çözeltisinde en fazla 0.2 milimolar düzeyinde Fe^{+2} konsantrasyonu gözlenmiş, biyotik çözeltilerde ise hemen hemen sıfıra yakın değerlerde kalmıştır.



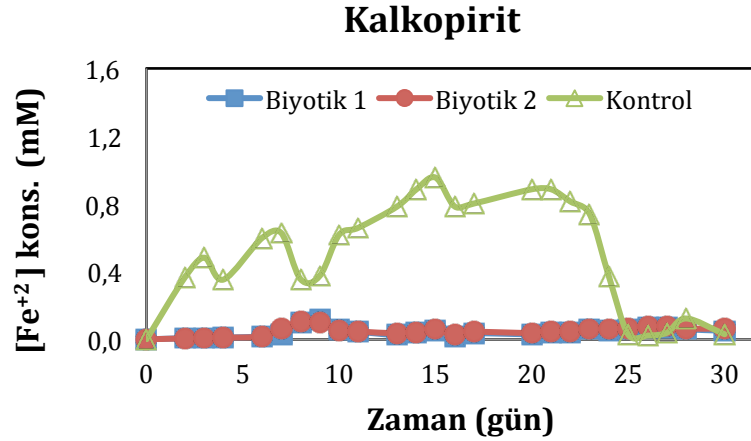
Şekil 4.4 Pirit minerali içeren biyotik (● ve ■) ve kontrol (Δ) çözeltilerindeki Fe^{+2} iyon konsantrasyonlarının (milimolar) zamanla değişimi

Piritit mineralinin kontrol çözeltisinde en fazla 4.0 milimolar düzeyinde Fe^{+2} konsantrasyonu gözlenmiş, biyotik çözeltilerde ise ilk 10 - 12 gün boyunca artış gözlenmemiş ve son günlerde 1.0 milimolara kadar bir artış gözlenmiştir.



Şekil 4.5 Pirotit minerali içeren biyotik (● ve ■) ve kontrol (Δ) çözeltilerindeki Fe⁺² iyon konsantrasyonlarının zamanla değişimi

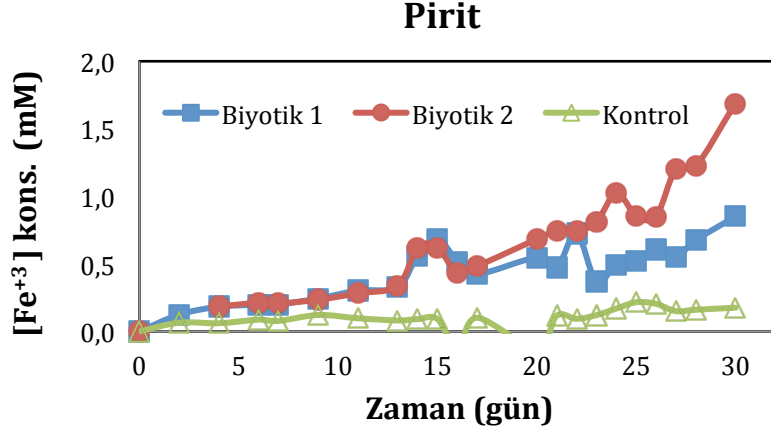
Kalkopirit mineralinin kontrol çözeltisinde en fazla 1.0 milimolar düzeyinde Fe⁺² iyon konsantrasyonu gözlenmiş, biyotik çözeltilerde ise hemen hemen sıfıra yakın değerlerde kalmıştır.



Şekil 4.6 Kalkopirit minerali içeren biyotik (● ve ■) ve kontrol (Δ) çözeltilerindeki Fe⁺² iyon konsantrasyonlarının zamanla değişimi

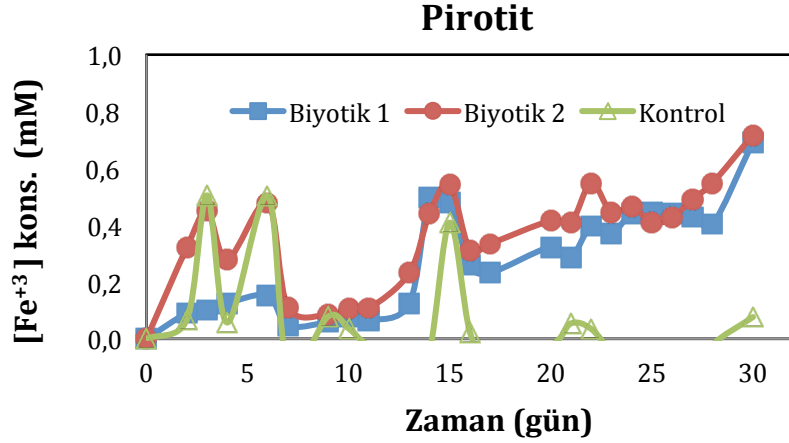
4.3 Liç Çözeltilerinin Fe⁺³ İyon Konsantrasyonları

Pirit mineralinin kontrol çözeltisinde Fe⁺³ konsantrasyonu hemen hemen sıfıra yakın değerlerde kalmış, biyotik çözeltilerde ise düzenli bir artış gözlenmiştir.



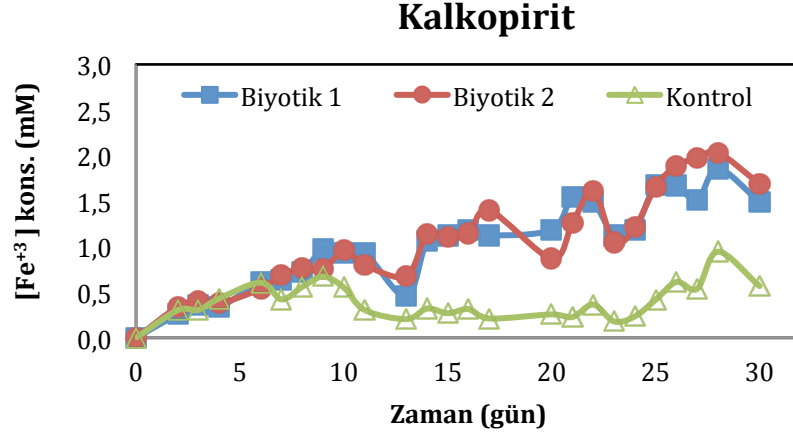
Şekil 4.7 Pirit minerali içeren biyotik (● ve ■) ve kontrol (Δ) çözeltilerindeki Fe⁺³ iyon konsantrasyonlarının zamanla değişimi

Piritit mineralinin kontrol çözeltisinde ilk günlerdeki dalgalanmanın dışında Fe⁺³ konsantrasyonu hemen hemen sıfıra yakın değerlerde kalmış, biyotik çözeltilerde ise düzenli bir artış gözlenmiştir.



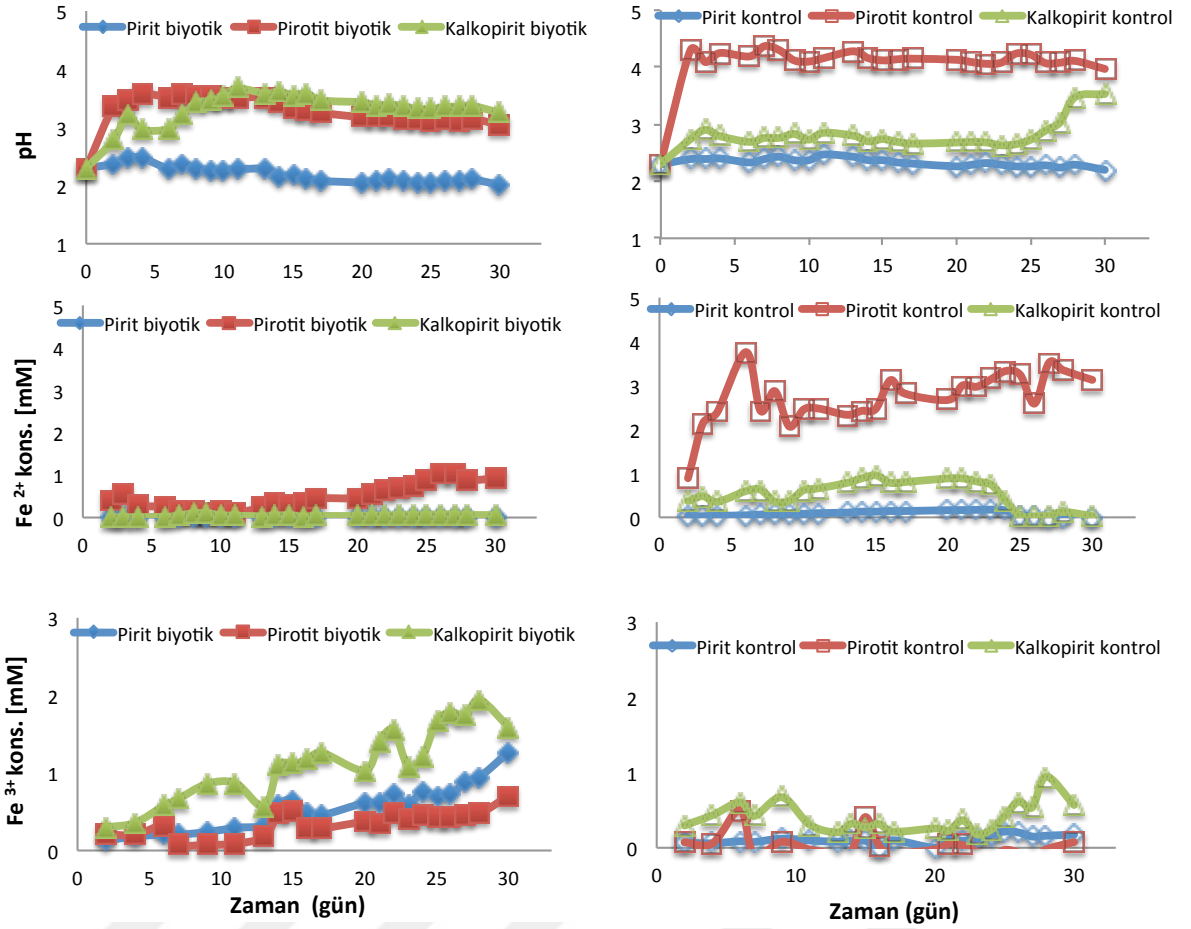
Şekil 4.8 Pirotit minerali içeren biyotik (● ve ■) ve kontrol (Δ) çözeltilerindeki Fe⁺³ iyon konsantrasyonlarının zamanla değişimi

Kalkopirit mineralinin kontrol çözeltisinde Fe⁺³ konsantrasyonu ilk hafta artmış ve daha sonraki 10 gün hemen hemen sabit değerlerde kalmış, biyotik çözeltilerde ise 30 gün boyunca düzenli bir artış gözlenmiştir.



Şekil 4.9 Kalkopirit minerali içeren biyotik (● ve ■) ve kontrol (Δ) çözeltilerindeki Fe⁺³ iyon konsantrasyonlarının zamanla değişimi

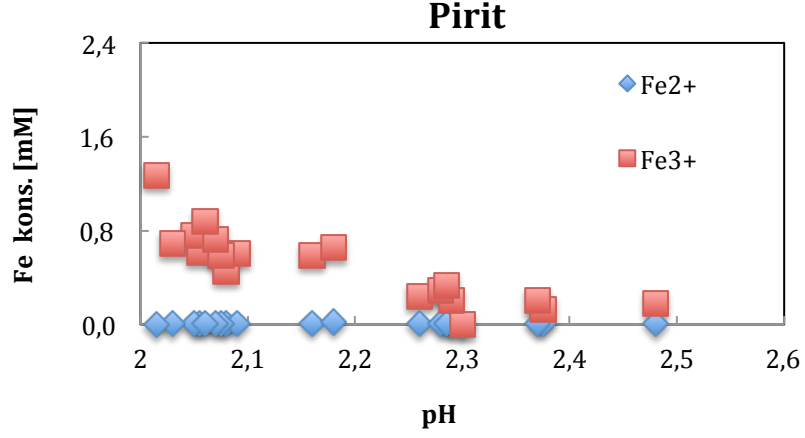
Pirit içeren biyoliç çözeltilisinin pH değeri çok hafif azalırken, pirotit ve kalkopirit biyoliç çözeltilerinde pH değerleri ilk günlerde artmış ve sonra sabite yakın değerlerde kalmıştır. Pirotit kontrol çözeltilisinin pH değeri ilk günlerde keskin şekilde artıp sabitlenmiş, pirit ve kalkopirit kontrol çözeltilerinde ise çok az değişime uğramıştır. Pirit ve kalkopirit biyotik çözeltilerinin Fe⁺² iyon konsantrasyonları çalışma boyunca hemen hemen sıfıra yakın kalmış, pirotit biyotik çözeltilisinde ise son 10 gün artmıştır. Pirotit kontrol çözeltilisinin Fe⁺² iyon konsantrasyonları çalışma boyunca en yüksek değerleri almış, arkadaşlarında kayda değer bir artış gözlenmemiştir. Kalkopirit biyotik çözeltilerinde Fe⁺³ iyon miktarı en yüksek, pirotit biyotik çözeltilerinde ise en düşük değerlerde gözlenmiştir. Tüm minerallerin kontrol çözeltilerindeki Fe⁺³ iyon miktarı çok düşük değerlerde kalmıştır (Şekil 4.10).



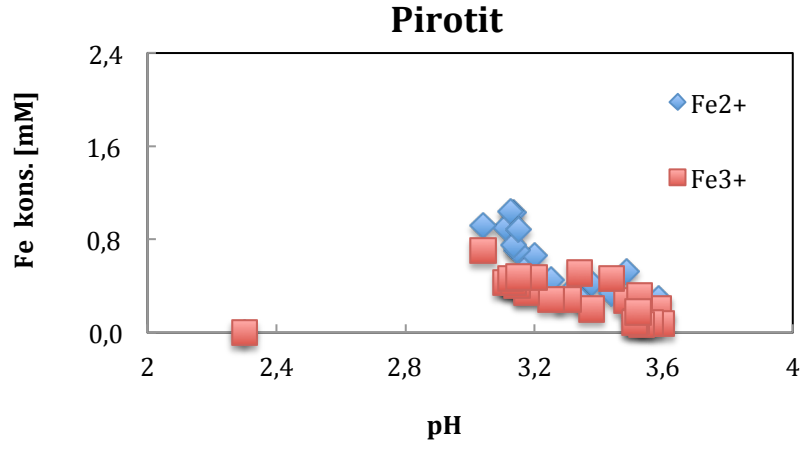
Şekil 4.10 Tüm minerallerin biyotik ve kontrol çözeltilerindeki pH ve Fe²⁺, Fe³⁺ iyon konsantrasyon değişimleri

4.4 Liç Çözeltilerinin Demir ve Bakır İyon Konsantrasyonlarının pH ile Değişimi

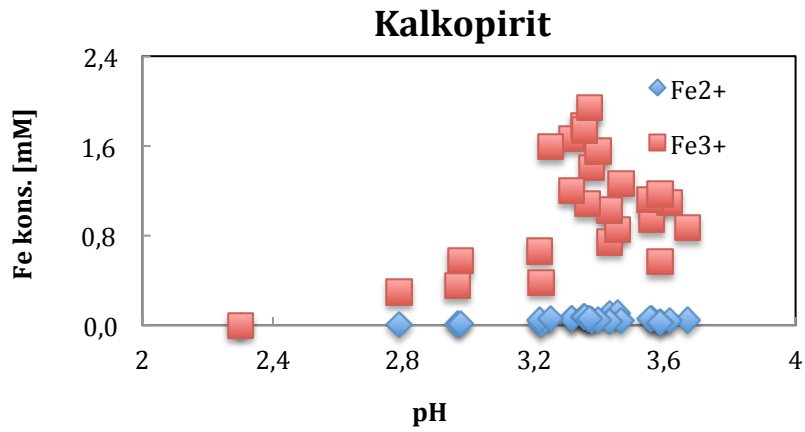
Pirit biyotik çözeltilerinde artan pH değeri ile Fe³⁺ iyon konsantrasyonu azalırken, pirotit ve kalkopirit biyotik çözeltilerinde pH 3.4 değerine ulaşıncaya kadar Fe³⁺ iyon konsantrasyonu artmış sonra azalmıştır.



Şekil 4.11 Pirit içeren biyotik çözeltideki Fe^{+2} (♦) ve Fe^{+3} (■) iyon konsantrasyonlarının pH değerine bağlı değişimleri



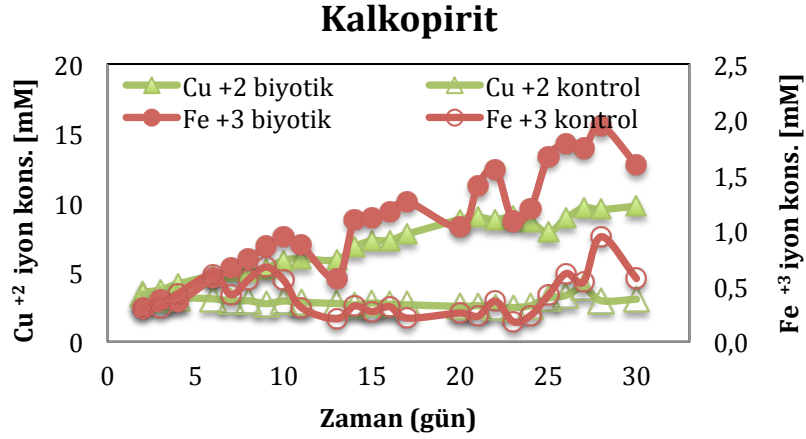
Şekil 4.12 Pirotit içeren biyotik çözeltideki Fe^{+2} (♦) ve Fe^{+3} (■) iyon konsantrasyonlarının pH değerine bağlı değişimleri



Şekil 4.13 Kalkopirit içeren biyotik çözeltideki Fe^{+2} (♦) ve Fe^{+3} (■) iyon konsantrasyonlarının pH değerine bağlı değişimleri

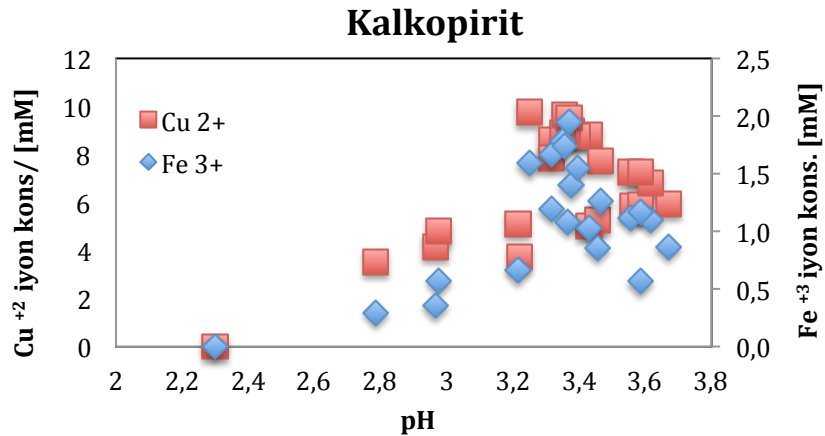
4.5 Kalkopirit Liç Çözeltilerinin Fe^{+3} ve Cu^{+2} İyon Değişimleri

Kalkopirit biyotik ve kontrol çözeltilerindeki Fe^{+3} ve Cu^{+2} iyon konsantrasyonlarının zamanla değişimi benzer karakterde gözlenmiştir. Biyotik çözeltilerde zamanla iyonlar artarken, kontrol çözeltilerinde ise yaklaşık sabit kalmıştır. Cu^{+2} iyon konsantrasyonu 10.0 milimolar değerine kadar yükselirken, Fe^{+3} konsantrasyonu 2.0 milimolar değerine kadar artmıştır.



Şekil 4.14 Kalkopirit biyotik ve kontrol çözeltilerindeki Fe^{+3} ve Cu^{+2} iyon konsantrasyonlarının zamanla değişimi

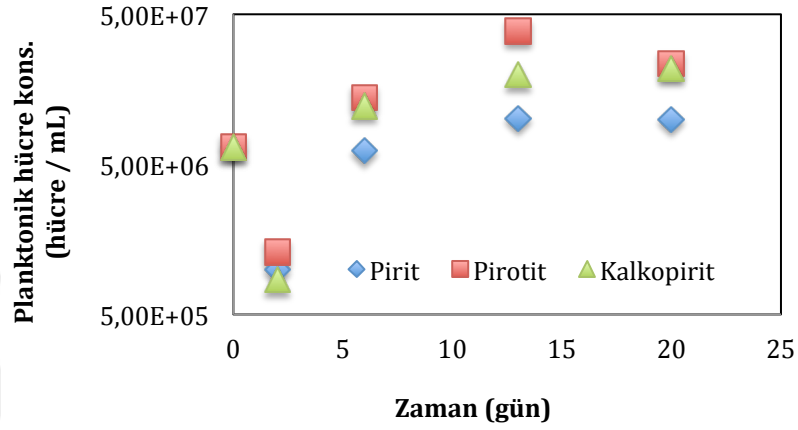
Kalkopirit biyoliç çözeltisindeki Fe^{+3} ve Cu^{+2} iyon konsantrasyonları pH 3.4 değerine ulaşıncaya kadar artmış, daha sonra artan pH değeri ile azalmıştır (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 Kalkopirit içeren biyotik çözeltilerdeki Cu^{2+} (♦) ve Fe^{3+} (■) iyon konsantrasyonlarının pH değerine bağlı değişimleri

4.6 Biyoliç Çözeltilerinin Bakteri Konsantrasyonu

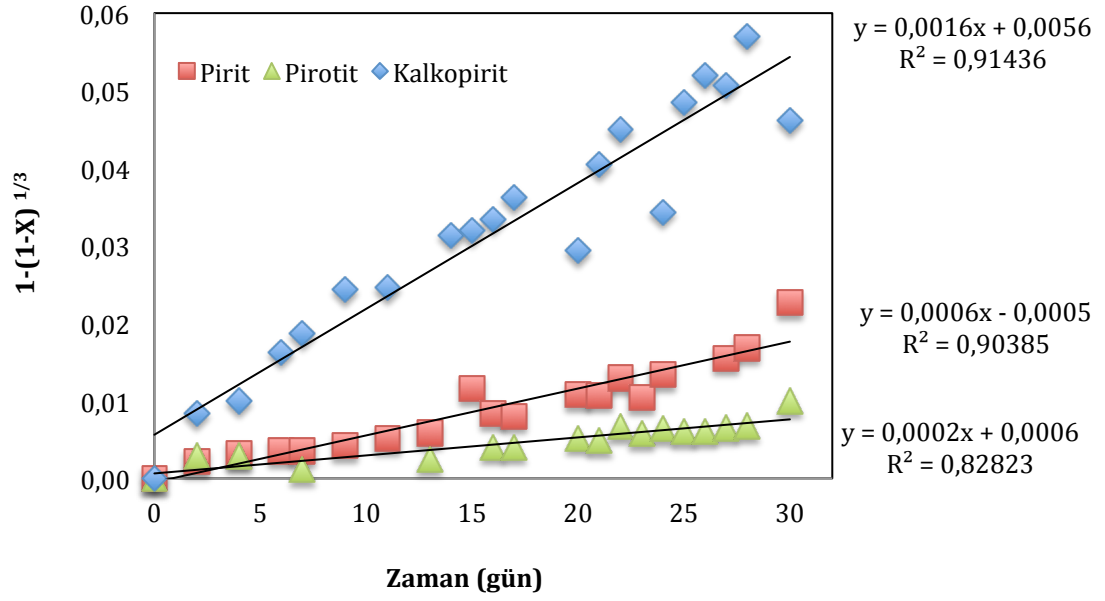
Hemen hemen tüm minerallerin biyoliç çözeltisindeki bakteri yoğunluğu ikinci gün keskin bir azalış göstermiş, ortalama 13 gün boyunca artmaya devam etmiş ve sonrasında durağan faza ulaşmıştır.



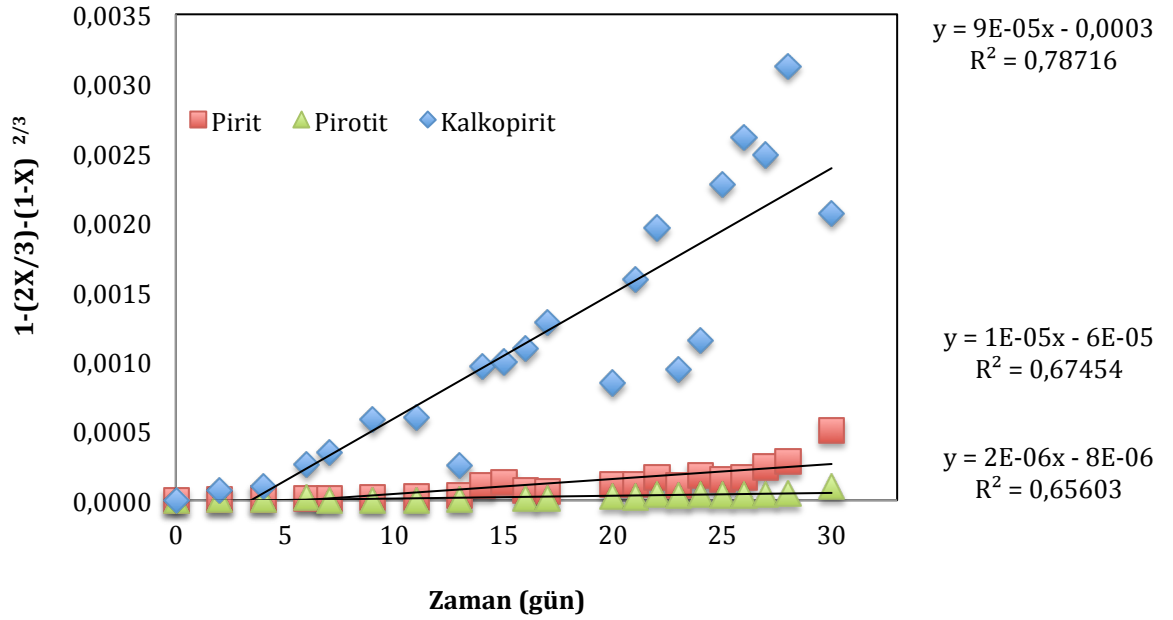
Şekil 4.16 Pirit, pirotit ve kalkopirit biyoliç çözeltilerindeki planktonik bakteri konsantrasyonu.

4.7 Minerallerin Çözünme Kinetikleri

Mineral çözünürlüklerinin kontrol mekanizmasını tespit etmek amacıyla, x değeri pirit, pirotit ve kalkopirit minerallerini içeren biyoliç çözeltilerinde bulunan okside edilmiş demir oranını verecek şekilde hazırlanan $1 - (1-x)^{1/3}$ ve $1 - (2x/3) - (1-x)^{2/3}$ değerlerinin zamana bağlı değişim grafikleri Şekil 4.17 ve 4.18’de verilmiştir.



Şekil 4.17 Pirit, pirotit ve kalkopirit minerallerinin biyoliç çözeltilerinin $1 - (1-x)^{1/3}$ değerinin zamana bağlı değişimi



Şekil 4.18 Pirit, pirotit ve kalkopirit minerallerinin biyoliç çözeltilerinin $1 - (2x/3) - (1-x)^{2/3}$ değerinin zamana bağlı değişimi

Bu grafiklerden elde edilen korelasyon katsayıları (R^2) ve liç sabitleri (k_c ve k_d) Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 k_c ve k_d değerleri ile korelasyon katsayıları

Mineral	k_c (10^{-3} gün^{-1})	R^2	k_d (10^{-3} gün^{-1})	R^2
Kalkopirit	1.6	0.914	9.0	0.787
Pirit	0.6	0.904	1.0	0.674
Pirotit	0.2	0.828	0.2	0.656

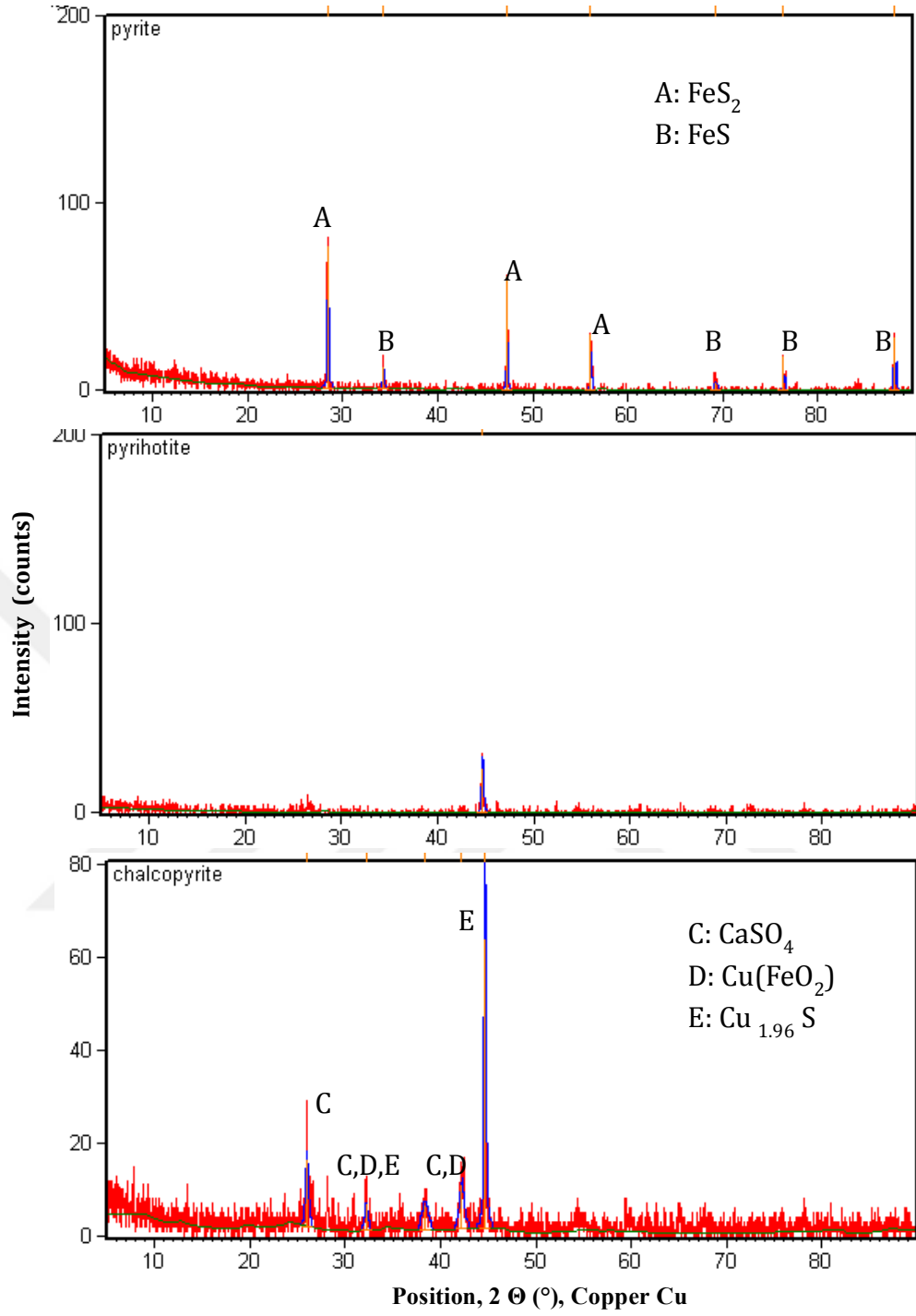
4.8 Minerallerin Biyoliç Öncesi Kristal yapı ve Kimyasal Analizi

Pirit, pirotit ve kalkopirit minerallerinin kristal yapıları X-Ray Diffraction (XRD) metodu ile belirlenmiştir (Şekil 4.19). Minerallerin içerdiği element yüzdeleri ise X-Ray Fluorescence (XRF) metodu ile belirlenmiştir (Çizelge 4.2). XRD yöntemi, malzemelerin örgü parametrelerini belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemle malzemenin kristal yapıya sahip olup olmadığı ve kristal yönelimleri bilgilerine ulaşılabilir. XRF yönteminde ise, X-ışınları ile bombardımana tabi tutulan numuneden salınan karakteristik X-ışınları yardımıyla numunenin kimyasal analizi yapılır.

Çizelge 4.2 Sülfürlü minerallerin kimyasal analizi (wt%)

Mineral	Fe	S	Cu	Zn	Si	Ca
Kalkopirit	33.7	21.0	29.3	-	4.9	11.1
Pirit	53.5	45.1	0.69	0.67	-	-
Pirotit	66.4	24.7	1.90	3.30	3.7	-

XRF analizi sonucunda, en düşük demir içeren mineral kalkopirit, en yüksek demir içeren mineral ise pirotit olarak belirlenmiştir.



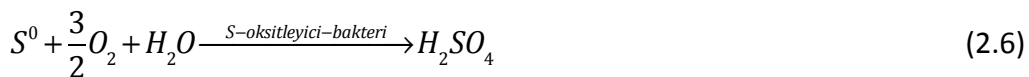
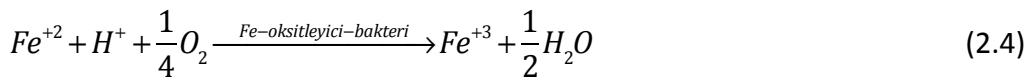
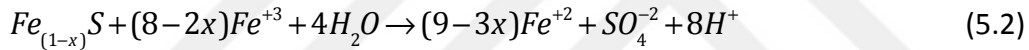
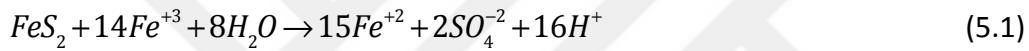
Şekil 4.19 İşlem görmemiş pirit, pirotit ve kalkopirit minerallerinin XRD diyagramları

XRD analizi sonucunda, pirit ve kalkopirit minerallerinin kristal yapıda olduğu, pirotit mineralinin ise amorf yapıda olduğu tespit edilmiştir.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Pirit, pirotit ve kalkopirit minerallerinin ferrik demir (Fe^{+3}) tarafından çözünme reaksiyonları aşağıda sırasıyla verilmiştir [196]:



Pirit mineralini içeren liç çözeltilerinin pH değerleri, bu mineralin asitte çözünememe özelliğinden dolayı (Reaksiyon 2.1 ve 2.2) sürekli azalmıştır (Şekil 4.1). Pirotit ve kalkopirit liç çözeltilerinin pH değerleri ise, ilk günlerde bu minerallerin asitte çözünebilir yapılarından dolayı (Reaksiyon 2.3) asidi tüketmeleri neticesinde artmış ve daha sonra azalmıştır (Şekil 4.2, 4.3).

Biyoliç çözeltilerinde bakterilerin ferröz demiri (Fe^{+2}) oksitlemeleri neticesinde (Reaksiyon 2.4), pirit ve pirotit minerallerinin çözünme reaksiyonlarına giren Fe^{+3} iyon konsantrasyonu artarak daha fazla sülfat ve proton üretimine neden olmuştur

(Reaksiyon 5.1 ve 5.2). Bakterilerin aynı zamanda sülfür oksidasyonunu da hızlandırmaları, daha fazla asit üretimini beraberinde getirmiştir (Reaksiyon 2.6). Bunun sonucunda pirit ve pirotit minerallerinin biyoliç çözeltilerinin pH değerleri, kontrol çözeltilerine göre daha fazla düşmüştür (Şekil 4.1, 4.2). Ancak kalkopirit mineralinde bu durumun tam tersi gözlenmiştir (Şekil 4.3). Kalkopirit mineralinin liç mekanizması günümüzde hala tamamen anlaşılmış değildir. Zira liç aşamalarında oldukça karmaşık oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları yer almaktadır (Reaksiyon 5.3, 2.4 ve 2.6). Kalkopirit mineralinin liç çözeltilerinin pH davranışının diğer minerallerden farklı olması, bu reaksiyonların toplu etkisi ile açıklanabilir. Bunun yanısıra yakın zamanda yapılan bir çalışmada, kalkopirit liç çözeltisine Cu^{+2} iyonlarının eklenmesi sonucunda, mineral çözünürlüğünün arttığı belirlenmiştir [197]. Bizim çalışmamızda kalkopirit mineralinin biyoliç çözeltisinde, kontrol çözeltisine kıyasla çok daha yüksek konsantrasyonda Cu^{2+} iyonu gözlenmiştir (Şekil 4.14). Çalışılan mineraller arasında kalkopirit en düşük oranda Fe içermesine rağmen (Çizelge 4.2), en yüksek oranda demir oksidasyonu kalkopirit biyoliç çözeltilerinde tespit edilmiştir. Bu yüzden, kalkopiritin biyoliçinde rol alan karmaşık reaksiyonlardan demir oksidasyonunun baskın reaksiyon olduğu ve böylece biyotik çözeltilerde pH yükselmesine yol açtığı söylenebilir (Şekil 4.3).

Bakteriyel Fe^{+2} oksidasyonu sonucunda tüm minerallerin biyoliç çözeltilerinde düşük konsantrasyonda Fe^{+2} iyonu, ve giderek artan konsantrasyonlarda Fe^{+3} iyonu gözlenmiştir (Şekil 4.4 – 4.9). Tüm minerallerin biyoliç ve kontrol çözeltilerinin pH, Fe^{+2} ve Fe^{+3} iyon konsantrasyonlarının zamanla değişimi ise Şekil 4.10'da gösterilmiştir.

Minerallerden salınan Fe^{+2} iyonları (Reaksiyon 2.1 - 2.3), bakteriyel Fe^{+2} oksidasyonu (Reaksiyon 2.4) ve Fe^{+3} 'ün mineral çözünmesi sırasında harcanması sonucunda, indirgenmiş ve yükseltgenmiş fazlar arasında bir döngü izler. Pirit, pirotit ve kalkopirit çözünme reaksiyonları sırasında, çözeltideki Fe^{+3} iyonları harcanır (Reaksiyon 5.1 - 5.3). Liç çözeltilerinde serbest halde bulunan Fe^{+3} iyonları mineral yüzeyi ile reaksiyona girerek, mineralin ileri derecede çözünmesine katkı sağlarlar.

Demirin doğada bulunduğu oksidasyon durumları, pH gibi çevre faktörlerine bağlı olarak değişir. 3.0'ı aşan pH değerlerinde demir iyonları çözünemez hale gelerek çökeler [198]. Mineral çözünmesinde önemli rol oynayan Fe^{+3} iyonlarının çökmesinden

dolayı, liç çözeltilerindeki serbest Fe^{+3} konsantrasyonu azalır (Reaksiyon 5.1 - 5.3). Şekil 4.11, 4.12 ve 4.13, minerallerin biyoliç çözeltilerindeki Fe iyon miktarlarının pH değerlerine bağlı değişimini göstermektedir. Pirit biyoliç çözeltisinde Fe^{+3} iyonları artan pH değeri ile azalmakta, pirotit ve kalkopirit biyoliç çözeltilerinde ise sırasıyla pH 3.0 ve 3.4 değerine kadar artmakta, daha sonra azalmaktadır. Fe^{+3} iyonlarının pirit ve pirotit çözeltilerindeki davranışı reaksiyon 2.4 ile açıklanabilir. Ancak, kalkopirit biyoliç çözeltisindeki demir iyonlarının oksidasyonu hem bakteri (Reaksiyon 2.4) hem de Cu^{+2} (Eşitlik 5.4) iyonları tarafından gerçekleştirilmiştir [199].



Matematik modellemeler, katı-sıvı sistemlerinin (metallerin liçi v.b) reaksiyon mekanizmalarını anlamak ve elde edilen sonuçları yorumlamak açısından önemlidir. Liç süresince minerallerin yüzeyinde pek çok çözünme ürünü birikir. Araştırmacılar, kalkopirit yüzeyinde jarosit, kalkosit, kovelit ve sülfür gibi pek çok liç ürününün oluştuğundan bahsetmişlerdir [84,85,200,201]. Pirotit nemli hava ile oksidasyona girdiğinde, mineral yüzeyinde Fe(III) oksihidroksit tabakası [202-204], *A. ferrooxidans* ile biyoliçe maruz kaldığında ise elementel sülfür, jarosit, geotit gibi liç kalıntıları tespit edilmiştir [205]. Pirit Fe^{+3} iyonları ile asidik ortamda (pH~2) çözündüğünde ise mineral yüzeyinde bir sülfür tabakasının oluştuğu gözlenmiştir [206].

Mineral yüzeyinde oluşan liç ürünlerinin gözenekli olması ve Fe^{+3} iyonları gibi oksidasyon ajanlarına karşı geçirgen olması durumunda, mineral çözünme prosesi kimyasal kontrollüdür ve çözünme kinetiği aşağıdaki eşitlikle ifade edilir:

$$k_c t = 1 - (1 - x)^{1/3} \quad (5.5)$$

Mineral yüzeyinde oluşan liç ürünleri liç ajanlarına karşı geçirgen değilse, mineral çözünürlüğü difüzyon yoluyla kontrol edilir ve çözünme kinetiği aşağıdaki eşitlikle ifade edilir:

$$k_d t = 1 - (2x / 3) - (1 - x)^{2/3} \quad (5.6)$$

Bu ifadelerde k_c ve k_d liç hız sabitlerini, X ise oksidasyona uğrayan demir yüzdesini temsil eder [53].

Düşük tenörlü kalkopiritin *A. ferrooxidans* ile biyoliçi yapılan bir çalışmada, kinetik dataların difüzyon kontrol modeline uyduğu tespit edilmiştir [66]. Doğal pirit örneklerinin farklı şartlar altında liç işlemine maruz bırakıldığı bir başka çalışmada ise, çözünme mekanizmasının kimyasal kontrollü olduğu belirlenmiştir [62-65].

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçların her iki mekanizmayı temsil eden eşitliklere uygulanması sonucunda, eşitlik 5.6 ile daha lineer bir doğru elde edilmiştir. Şekil 4.17 ve 4.18’de tüm mineraller için hesaplanan $1 - (1-x)^{1/3}$ ve $1 - (2x/3) - (1-x)^{2/3}$ değerlerinin zamana bağlı eğrisi görülmektedir. Eşitlik 5.5 ve 5.6 için hesaplanan liç sabitleri ve elde edilen doğruların R^2 değerleri Çizelge 4.1’de gösterilmiştir. Eğrilerin R^2 değerlerine göre pirit, pirotit ve kalkopirit minerallerinin *A. ferrooxidans* ile biyoliç prosesinin kimyasal kontrollü olduğu sonucuna varılmıştır. Bu veriler ışığında minerallerin biyoliç hızları büyükten küçüğe doğru kalkopirit, pirit ve pirotit şeklinde sıralanabilir (Çizelge 4.1).

Minerallerin kimyasal analiz sonuçları Çizelge 4.2’de gösterilmiştir. Buna göre pirit, pirotit ve kalkopiritte bulunan demir yüzdeleri sırasıyla % 53.5, % 66.4 ve % 33.7 olarak tespit edilmiştir.

Biyoliç işleminin gerçekleşmesinde ileri sürülen kooperatif mekanizmaya göre bir kısım bakterinin liç edilen mineralin yüzeyine tutunması esastır. Biyoliç çözeltisinde serbest halde bulunan Fe^{+3} iyonları mineralin çözünmesinde rol alırlar [207]. Aynı zamanda biyoliğin üç basamak halinde gerçekleştiği ifade edilmiştir. İlk aşamada, bakteri hücreleri mineral yüzeyine tutunurlar. İkinci aşamada ise, mineral yüzeyi doygunluğa ulaşır ve bakterilerin yüzeye tutunma oranı azalır. Böylece bakteriler çözelti içerisinde çoğalmaya başlayarak planktonik (asılı) bakteri konsantrasyonunun artmasına neden olurlar. Son aşamada ise planktonik ve mineral yüzeyine tutunmuş hücreler arasında bir denge oluşur [208].

Yang ve arkadaşları, pirit ve kalkopirit minerallerinin *A. ferrooxidans* ile biyoliç çalışmasında, hücrelerin her iki minerale de eşit oranlarda tutunduğunu belirlemişlerdir [209]. Africa ve arkadaşları, *A. ferrooxidans* hücrelerinin, pirit yüzeyine tutunma oranının kalkopirit yüzeyine tutunma oranından daha yüksek olduğunu tespit

etmişlerdir [210]. Zhu ve arkadaşları, *A. ferrooxidans* hücrelerinin kalkopirit yüzeyine tutunma oranları arttıkça biyoliç oranlarının da arttığını göstermişlerdir [60].

Bu tez çalışması kapsamında pirit, pirotit ve kalkopirit minerallerini içeren biyoliç çözeltilerindeki planktonik hücre konsantrasyonlarının, yaklaşık 13. günde durağan faza ulaştığı tespit edilmiştir (Şekil 4.16). Bu durum, *A. ferrooxidans* hücrelerinin mineralleri biyoliç deneylerinin ilk iki haftası boyunca etkin şekilde okside edebildiğini göstermiştir (Reaksiyon 2.4 ve 2.6). Bakterilerin biyoliç sırasında mineral yüzeyine tutunarak geliştiği bilinmektedir. Tüm biyoliç çözeltilerindeki planktonik hücre konsantrasyonlarının deneylerin ikinci gününde azaldığı ve daha sonra artmaya devam ettiği gözlenmiştir. Bu durum, bakterilerin bir kısmının ilk iki gün içerisinde mineral yüzeyine tutunarak gelişimine devam etmesi şeklinde açıklanabilir. Schippers ve arkadaşları, inokule edilen bakteri sayısının yaklaşık % 80'inin biyoliç çözeltisinden ilk gün içerisinde kaybolduğunu rapor etmişlerdir [2]. Bizim çalışmamızın ikinci gününde ise kalkopirit, pirit ve pirotit içeren biyoliç çözeltilerinden ikinci gününde kaybolan hücre konsantrasyonları, inokule edilen konsantrasyon değerinin sırasıyla % 86, % 84 ve % 80'i olarak tespit edilmiştir. Bu durum, sonuçlarımızın Schippers ve arkadaşlarının raporu ile uyum içerisinde olduğunu göstermektedir. Mineral yüzeyine tutunan bakteri sayısı, inokule edilen hücre sayısı ile ikinci gün çözeltide bulunan hücre sayısı arasındaki fark hesaplanarak belirlenmiştir. Kalkopirit, pirit ve pirotit için bu değerler sırasıyla 5.64×10^6 , 5.51×10^6 ve 5.20×10^6 (hücre/mL) olarak hesaplanmıştır. Bu değerler, aynı zamanda Çizelge 4.1'de hesaplanan liç oranlarını da desteklemektedir.

Kalkopirit biyoliç çözeltisinde açığa çıkan Cu^{+2} iyon konsantrasyonlarının (0.31 mM Cu^{+2} /gün), okside olmuş Fe iyon konsantrasyonundan (0.054 mM Fe^{3+} /gün) yaklaşık 5 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.14). Bu durumun sebebi, Fe^{+3} iyonlarının çoğunun çökelmeye uğraması ve bir kısmının mineralin ileri derecede oksidasyonuna harcanması ile açıklanabilir.

Minerallerin kristal yapısını belirlemek amacıyla, biyoliç öncesi X-ışını kırınım (XRD) analizi yapılmıştır (Şekil 4.19). Pirit mineralinde FeS_2 ve FeS ana pikleri gözlenirken, kalkopirit mineralinde djurleite ($\text{Cu}_{1.96}\text{S}$), anhydrite (CaSO_4) ve $\text{Cu}(\text{FeO}_2)$ pikleri tespit edilmiştir. Pirotit ise, belirgin olmayan zayıf bir pik göstermiştir. Bu durum, pirotitin amorf yapıda olduğunu gösterir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1 Sonuçlar

Sülfürlü minerallerin biyoliçi, metal sülfitleri metal sülfatlara dönüştüren bir ekstraksiyon metodudur. Bu tez çalışması kapsamında, pirit (FeS_2 ; Ward's Scientific, Huanzala, Peru), pirotit (Fe_{1-x}S , $x=0 - 0.2$; Ward's Scientific, Galax, Virginia, USA) ve kalkopirit (CuFeS_2 ; Ward's Scientific, Durango, Mexico) minerallerinin *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 bakterisi ile çözünme oranları karşılaştırılarak, biyoliç kinetikleri incelenmiştir. Biyoliç ve kontrol deneyleri 250 mL hacmindeki erlenlerde yapılarak liç çözeltilerinden belirli aralıklarla alınan örneklerin pH ve Fe^{+2} , Fe^{+3} , Cu^{+2} iyon konsantrasyon ölçümleri yapılarak sonuçlar analiz edilmiştir. Aynı zamanda biyoliç çözeltilerinden belirli aralıklarla alınan örneklerde bulunan planktonik bakteri sayımı yapılmıştır. Minerallerin kristal yapılarını ve kimyasal kompozisyonlarını belirlemek amacıyla işlem görmemiş minerallerin XRD ve XRF analizleri yapılmıştır. Elde edilen tüm sonuçlar Bölüm 5'te ayrıntılı şekilde tartışılmıştır.

Bu tez çalışması sonucunda elde edilen temel bulgular ve analizleri aşağıda verilmiştir:

- Tez çalışmamızda elde edilen verilerin değerlendirilmesi sonucunda, *A. ferrooxidans* varlığında minerallerin çözünme mekanizmalarının kimyasal kontrollü olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda çözünme hızları aşağıdaki sıralamada gerçekleşmiştir:
kalkopirit > pirit > pirotit

- Biyoliç deneylerinin başlangıcında erlenler $\approx 6.5 \times 10^6$ hücre/mL bakteri konsantrasyonu ile inokule edilmiştir. Deneylerin ikinci gününde biyoliç çözeltilerindeki bakteri sayıları azalmıştır. Bu azalma, bakterilerin ilk günlerde mineral yüzeyine tutunduğu anlamına gelmektedir. Kalkopirit, pirit ve pirotit mineral yüzeylerine tutunan bakteri sayıları sırasıyla 5.64×10^6 , 5.51×10^6 ve 5.20×10^6 (hücre/mL) olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, mineral yüzeyine tutunan bakteri sayısı ile biyoliç hızının doğru orantılı olduğunu göstermiştir.
- Bakteri hücresi başına düşen demir oksidasyon oranları kalkopirit, pirit ve pirotit için sırasıyla 9.57×10^{-9} mM $\text{Fe}^{+3}/(\text{hücre.gün})$, 5.80×10^{-9} mM $\text{Fe}^{+3}/(\text{hücre.gün})$ ve 3.07×10^{-9} mM $\text{Fe}^{+3}/(\text{hücre.gün})$ olarak belirlenmiştir.
- Piritin çözünmesinde rol alan oksidasyon ajanı Fe^{+3} iyonu iken, pirotit ve kalkopiritin çözünmesinde Fe^{+3} ve H^+ oksidasyon ajanı olarak rol alır. Bu durum piritin asitte çözünmemesini, diğer minerallerin ise asitte çözünmesini netice verir. Bu durumu destekler mahiyette, pirit mineralinin liç çözeltilerinin pH değerleri deneyler boyunca sürekli azalmış, pirotit ve kalkopirit minerallerinin liç çözeltilerinin pH değerleri ise ilk günlerde minerallerin asidi tüketerek çözünmesi neticesinde artmıştır.
- Asitte çözünemeyen piritin kimyasal liç çözeltilerinde sıfıra yakın değerlerde Fe^{+2} iyonları gözlenmesine karşılık, pirotit liç çözeltisinde Fe^{+2} iyon konsantrasyonları 4.0 mM'a, kalkopirit liç çözeltisinde ise 1.0 mM'a kadar ulaşmıştır. Ferröz demirin bakterilerce ferrik demire oksidasyonu neticesinde ise, biyoliç çözeltilerinde kayda değer Fe^{+2} iyon konsantrasyonları gözlenmemiştir.
- Bakterilerin ferröz demiri okside etmesi neticesinde, tüm minerallerin biyoliç çözeltilerinde, kontrol çözeltilerine oranla daha yüksek konsantrasyonda Fe^{+3} iyonları tespit edilmiştir. En yüksek değerler kalkopirit için 1.94 mM, pirit için 1.27 mM, pirotit için ise 0.70 mM olarak ölçülmüştür. Tüm biyoliç çözeltilerindeki Fe^{+3} konsantrasyonlarının zamanla düzenli olarak artması, bakterilerin deneyler boyunca aktif olduğunu göstermiştir.
- Kalkopirit (CuFeS_2) mineralinin biyoliç çözeltilerinde elde edilen bakır oksidasyon hızı ($0.310 \text{ mM Cu}^{2+}/\text{gün}$), demir oksidasyon hızının ($0.054 \text{ mM Fe}^{3+}/\text{gün}$) neredeyse 5 katı olarak tespit edilmiştir. Bu durum, demir iyonlarının

bir kısmının 3.0'ı geçen pH değerlerinde çökmesi ve bir kısmının da mineralin ileri oksidasyonu için harcanması ile açıklanabilir.

- XRD analizleri sonucunda pirit ve kalkopirit minerallerinin kristal yapıda olduğu, pirotit mineralinin ise amorf yapıda olduğu belirlenmiştir. Pirit mineralindeki temel pikler FeS_2 ve FeS , kalkopirit mineralindeki pikler ise djurleite ($\text{Cu}_{1.96}\text{S}$), anhydrite (CaSO_4) ve $\text{Cu}(\text{FeO}_2)$ olarak belirlenmiştir.
- XRF analizleri sonucunda kalkopirit, pirit ve pirotit minerallerinde bulunan demir miktarları sırasıyla % 33.7, % 53.5, ve % 66.4 olarak belirlenmiştir.

6.2 Öneriler

Günümüzde kimyasal liç metotlarına göre pek çok avantajı bulunan biyoliç yöntemi, belirli ülkelerde endüstriyel olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ancak, biyoliç canlı mekanizmaları içeren bir metot olması yönüyle, her zaman umulmadık problemlerle karşılaşılması muhtemeldir. Bu amaçla pek çok büyük biyoliç firması, bünyesinde araştırma laboratuvarları bulundurmaktadır. Sülfürlü minerallerin çözünme mekanizmalarının ve bakterilerin demir oksidasyonu mekanizmalarının tam olarak anlaşılması endüstriyel biyoliç uygulamalarında karşılaşılan problemlerin çözümüne büyük oranda katkı sağlayacaktır. İleriki çalışmalarda, sülfürlü minerallerde bulunan demir/sülfür oranlarının ve minerallerin kristal yapılarının biyoliç verimine olan etkisinin araştırılmasının, minerallerin çözünme mekanizmalarının anlaşılmasına büyük katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Farklı bakır yataklarından alınacak sülfürlü bakır minerallerinin, alındıkları bölgeden izole edilen yerel asidofilik bakteri kültürleri ile çeşitli sıcaklık ve pH ortamlarında biyoliç işlemine tabi tutularak optimum şartların belirlenmesi, metal kazanım oranlarının artmasına katkı sağlayacaktır. Aynı zamanda bu çalışmaların daha büyük hacimlerde yapılması, endüstriyel boyuttaki uygulamalara geçiş için faydalı olacaktır.

Asidofilik bakterilerin metabolik aktiviteleri, zamanla çözelti pH'sını yükseltmekte, bu durum en etkin liç ajanı olan Fe^{+3} iyonlarının çökerek devre dışı kalmasına neden olmaktadır. Liç süresince pH değerlerinin kontrol edilerek yaklaşık 2 ile 3 değerleri arasında sabit tutulması, biyoliç hızını artırabilir.

KAYNAKLAR

-
- [1] Johnson, D.B., (2013). "Development and application of biotechnologies in the metal mining industry". *Environ Sci. Pollut. Res*, 20:7768–7776.
 - [2] Schippers, A.S., Vasters, J., Drobe, M., Sand, W. ve Willscher, S., (2014). "Biomining: Metal Recovery from Ores with Microorganisms", *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 141: 1–47.
 - [3] Silva, G. D., Lastra, M. R. ve Budden, J. R. (2003). "Electrochemical passivation of sphalerite during bacterial oxidation in the presence of galena". *Minerals Engineering*, 16(3):199-203.
 - [4] Rawlings, D.E. ve Silver, S., (1995). "Mining with microbes". *Biotechnology*, 13:773-778.
 - [5] Vera, M., Schippers, A. ve Sand, W., (2013). "Progress in bioleaching: Fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation—Part A". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97:7529–7541.
 - [6] Crundwell, F.K., (2013). "The Dissolution And Leaching Of Minerals Mechanisms, myths and misunderstandings". *Hydrometallurgy*, 139:132–148.
 - [7] Rudolfs, W., (1922). "Oxidation of Iron Pyrites by S-Oxidizing Organisms and Their Use for Making Mineral Phosphates Available". *Soil Science*, 14:135-146.
 - [8] Rudolfs, W. ve Helbronner, A., (1922). Oxidation of zinc sulfide by microorganisms, Cilt 14, *Soil Science*, Editör Lipman, J. G., Rutgers College, New Brunswick, New Jersey, 459-464.
 - [9] Colmer, A.R. ve Hinkle, M.E., (1947). "The Role of Microorganisms in Acid Mine Drainage:*Preliminary Report*", *Science*, 106 (2751): 253-256.
 - [10] Zimmerley, S. R., Wilson, D. G. ve Prater, J. D., (1958). "Cyclic Leaching Process Employing Iron Oxidizing Bacteria", U.S. Patent 2,829,964.
 - [11] Silverman, M.P., (1967). "Mechanism of Bacterial Pyrite Oxidation". *Journal of Bacteriology*, 94(4):1046.
 - [12] Singer, P.C. ve Stumm, W., (1970). "Acidic Mine Drainage: The rate-determining step". *Science*, 167:1121-1123.

- [13] Corrans, I.J., Harris, B. ve Ralph, B.J., (1972). "Bacterial leaching: an introduction to its application and theory and a study on its mechanism of operation". *Journal of The South African Institute of Mining and Metallurgy*, 221-229.
- [14] Nielsen, A.M. ve Beck, J.V., (1972). "Chalcocite Oxidation and Coupled Carbon Dioxide Fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*". *Science*, 175:1124-1126.
- [15] Bennett, J.C. ve Tributsch, H., (1978). "Bacterial Leaching Patterns on Pyrite Crystal Surfaces". *Journal of Bacteriology*, 134(1):310-317.
- [16] Pugh, C.E., Hossner, L.R. ve Dixon, J.B., (1984). "Oxidation Rate of Iron Sulfides as Affected by Surface Area, Morphology, Oxygen Concentration, and Autotrophic Bacteria". *Soil Science*, 137(5):309-314.
- [17] McGuire, M.M., Edwards, K.J., Banfield, J.F. ve Hamers, R.J., (2001). "Kinetics, surface chemistry, and structural evolution of microbially mediated sulfide mineral dissolution". *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65(8): 1243–1258.
- [18] Edwards, K.J., Hu, B., Hamers, R.J. ve Banfield, J.F. (2001). "A new look at microbial leaching patterns on sulfide minerals". *FEMS Microbiology Ecology*, 34:197-206.
- [19] Edwards, K.J., Bond, P.L. ve Banfield, J.F., (2000). "Characteristics of attachment and growth of *Thiobacillus caldus* on sulphide minerals: a chemotactic response to sulphur minerals?". *Environmental Microbiology*, 2(3):324-332.
- [20] Edwards, K.J. ve Rutenberg, A.D., (2001). "Microbial response to surface microtopography: the role of metabolism in localized mineral dissolution". *Chemical Geology*, 180: 19–32.
- [21] Edwards, K.J., McCollom, T.M., Konishi, H. ve Buseck, P.R., (2003). "Seafloor bioalteration of sulfide minerals: Results from in situ incubation studies". *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67(15):2843–2856.
- [22] Rodriguez, Y., Ballester, A., Blazquez, M.L., Gonzalez, F. ve Munoz, J.A., (2003). "New information on the chalcopyrite bioleaching mechanism at low and high temperature". *Hydrometallurgy*, 71:47 –56.
- [23] Ndlovu, S. ve Monhemius, A.J., (2004). "The role of orientation of crystal lattice on the development of bacterial leaching patterns on pyrite single crystals". *The Journal of The South African Institute of Mining and Metallurgy*, 104:573-578.
- [24] Harneit, K., Göksel, A., Kock, D., Klock, J.H., Gehrke, T. ve Sand, W., (2006). "Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*". *Hydrometallurgy*, 83:245–254.
- [25] Lei, J., Huai Yang, Z. ve Xiao Tong, P., (2007). "Bio-oxidation of pyrite, chalcopyrite and pyrrhotite by *Acidithiobacillus ferrooxidans*". *Chinese Science Bulletin*, 52 (19):2702-2714.
- [26] NareshKumar, R. ve Nagendran, R., (2008). "Changes in nutrient profile of soil subjected to bioleaching for removal of heavy metals using *Acidithiobacillus*

thiooxidans". Journal of Hazardous Materials, 156:102–107.

- [27] Olubambi, P.A., Potgieter, J.H., Ndlovu, S. ve Borode, J.O., (2009). "Electrochemical studies on interplay of mineralogical variation and particle size on bioleaching low-grade complex sulphide ores". Trans. Nonferrous Met. Soc. China, 19: 1312-1325.
- [28] Riekkola-Vanhanen, M., (2010). "Talvivaara Sotkamo Mine – Bioleaching of a Polymetallic Nickel Ore In Subarctic Climate". Nova Biotechnologica, 10-1:7-13.
- [29] Florian, B., Noël, N., Thyssen, C., Felschau, I. ve Sand, W., (2011). "Some quantitative data on bacterial attachment to pyrite". Minerals Engineering, 24:1132–1138.
- [30] Bulaev, A.G., Pivovarova, T.A., Kuznetsov, B.B., Kolganova, T.V. ve Kondrat'eva, T.F., (2012). "Rates of sulfide mineral oxidation by acidophilic Chemolithotrophic microbial communities from various sources". Microbiology, 81(4):397–404.
- [31] Zhu, J., Li, Q., Jiao, W., Jiang, H., Sand, W., Xia, J., Liu, X., Qin, W., Qiu, G., Hu, Y. ve Chai, L., (2012). "Adhesion forces between cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* or *Leptospirillum ferrooxidans* and chalcopryite". Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 94:95–100.
- [32] Dong, Y., Lin, H., Fu, K., Xu, X. ve Zhau, S., (2013). "Bioleaching of two different types of chalcopryite by *Acidithiobacillus ferrooxidans*". International Journal of Minerals, Metallurgy and Materials, 20(2):119-124.
- [33] Fu, K., Lin, H., Mo, X., Wang, H., Wen, H. ve Wen, Z., (2012). "Comparative study on the passivation layers of copper sulphide minerals during bioleaching". International Journal of Minerals, Metallurgy and Materials, 19(10):886-892.
- [34] Yu, R., Liu, J., Chen, A., Zhong, D., Li, Q., Qin, W., Qiu, G. ve Gu, G., (2013). "Interaction mechanism of Cu^{2+} , Fe^{3+} ions and extracellular polymeric substances during bioleaching chalcopryite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 2370". Trans. Nonferrous Met. Soc. China, 23:231–236.
- [35] Romo, E., Weinacker, D.F., Zepada, A.B., Figueroa, C.A., Chavez-Crooker, P. ve Farias, J.G., (2013). "Bacterial consortium for copper extraction from sulphide ore consisting mainly of chalcopryite". Brazilian Journal of Microbiology, 44(2): 523-528.
- [36] Manafi, Z., Abdollahi, H. ve Tuovinen, O.H., (2013). "Shake flask and column bioleaching of a pyritic porphyry copper sulphide ore". International Journal of Mineral Processing, 119:16–20.
- [37] Abhilash, Pandey, B.D. ve Singh, A.K., (2013). "Comparative performance of uranium bioleaching from low grade Indian apatite rock in column and bioreactor". Energy Procedia, 2013 (39):20-32.
- [38] Zhao, H., Wang, J., Hu, M., Qin, W., Zhang, Y. ve Qiu, G., (2013). "Synergistic bioleaching of chalcopryite and bornite in the presence of *Acidithiobacillus ferrooxidans*". Bioresource Technology, 149:71–76.

- [39] Fu, K., Lin, H., Cheng, H., Mo, X. ve Dong, Y., (2013). "Bioleaching of djurleite using *Acidithiobacillus ferrooxidans*". *Minerals Engineering*, 40:38–41.
- [40] Yu, R., Liu, J., Tan, J., Zeng, W., Shi, L., Gu, G., Qin, W. ve Qiu, G., (2014). "Effect of pH values on the extracellular polysaccharide secreted by *Acidithiobacillus ferrooxidans* during chalcopryrite bioleaching". *International Journal of Minerals, Metallurgy and Materials*, 21(4):311-316.
- [41] Wang, Y., Zeng, W., Qiu, G., Chen X. ve Zhou, H., (2014). "A Moderately Thermophilic Mixed Microbial Culture for Bioleaching of Chalcopryrite Concentrate at High Pulp Density ". *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(2):741-750.
- [42] Fu, K., Lin, H., Luo, D., Jiang, W. ve Zeng, P., (2014). "Comparsion of bioleaching of copper sulphides by *Acidithiobacillus ferrooxidans*". *African Journal of Biotechnology*, 13(5):664-672.
- [43] Gan, M., Zhou, S., Li, M., Liu, X. ve Chai, L., (2015). "Bioleaching of multiple heavy metals from contaminated sediment by mesophile consortium". *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 22(8):5807-16.
- [44] Li, S., Zhong, H., Zhao, J., He, Z. ve Gu. G., (2014). "Bioleaching of a low-grade nickel-copper sulfide by mixture of four thermophiles". *Bioresour. Technol.*, 153:300-6.
- [45] Feng, S., Yang, H. ve Wang, W., (2015). "Improved chalcopryrite bioleaching by *Acidithiobacillus* sp. via direct step-wise regulation of microbial community structure". *Bioresour. Technol.*, 192:75-82.
- [46] Brisson, V.L., Zhuang, W.Q. ve Alvarez-Cohen, L., (2016). "Bioleaching of Rare Earth Elements from Monazite Sand". *Biotechnology and Bioengineering*, 113(2):339-348.
- [47] Maneesuwannarat, S., Vangnai, A.S., Yamashita, M. ve Thirvetyan, P., (2016). "Bioleaching of gallium from gallium arsenide by *Cellulosimicrobiurn funkei* and its application to semiconductor/electronic wastes". *Process Safety and Environmental Protection.*, 99:80-87.
- [48] Kaksonen, A.H., Saerkijaervi, S., Puhakka, J.A., Peuraniemi, E., Junnikkala, S. ve Tuovinen, O.H., (2016). "Chemical and bacterial leaching of metals from a smelter slag in acid solutions". *Hydrometallurgy*, 159:46-53.
- [49] Karwowska, E., Wojtkowska, M. ve Andrzejewska, D., (2015). "The influence of metal speciation in combustion waste on the efficiency of Cu, Pb, Zn, Cd, Ni and Cr bioleaching in a mixed culture of sulfur-oxidizing and biosurfactant-producing bacteria". *Journal of Hazardous Materials*, 299:35-41.
- [50] Xia, L., Tang, L., Xia, J., Yin, C., Cai, L., Zhao, X., Nie, Z., Liu, J. ve Qui, G., (2012). "Relationships among bioleaching performance, additional elemental sulfur, microbial population dynamics and its energy metabolism in bioleaching of chalcopryrite". *Trans. Nonferrous Met. Soc. China*, 22:192-198.
- [51] Yang, H., Feng, S., Xin, Y. ve Wang, W., (2014). "Community dynamics of attached and free cells and the effects of attached cells on chalcopryrite bioleaching by *Acidithiobacillus* sp.". *Bioresource Technology*, 154:185-191.

- [52] Shrihari, R.K., Gandhi, K.S. ve Natarajan, K.A., (1991). "Role of cell attachment in leaching of chalcopyrite mineral by *Thiobacillus ferrooxidans*". Appl. Microbiol. Biotechnol., 36:278-282.
- [53] Pradhan, D., Kim, D.J. ve Chaudhury, G.R., (2010). "Dissolution kinetics of complex sulfides using acidophilic microorganisms". Materials Transactions, 51(2):413-419.
- [54] Wong, J.W.C., Zhou, J., Kurade, M.B. ve Murugesan, K., (2015). "Influence of ferrous ions on extracellular polymeric substances content and sludge dewaterability during bioleaching". Bioresource Technology, 179:78-83.
- [55] Ballester, A., Gonzales, F., Blazquez, M.L., Gomez, C. ve Mire, J.L., (1992). "The use of catalytic ions in bioleaching". Hydrometallurgy, 29:145-160.
- [56] Vilcaez, J., Suto, K. ve Inoue, C., (2008). "Bioleaching of chalcopyrite with thermophiles: Temperature–pH–ORP dependence". Int. J. Miner. Process, 88(1-2):37-44.
- [57] Edwards, K.J., Schrenk, M.O., Hamers, R. ve Banfield, J.F., (1998). "Microbial oxidation of pyrite: Experiments using microorganisms from an extreme acidic environment". American Mineralogist, 83:1444–1453.
- [58] Korehi, H., Blöthe, M. ve Schippers, A., (2014). "Microbial diversity at the moderate acidic stage in three different sulfidic mine tailings dumps generating acid mine drainage". Research in Microbiology, 165:713-718.
- [59] Niemela, S.I., Vanhanen, M.R., Sivela, C., Viguera, F. ve Tuovinen, O.H., (1994). "Nutrient effect on the biological leaching of a black-schist ore". Applied and Environmental Microbiology, 60(4):1287- 1291.
- [60] Zhu, J., Wang, Q., Zhou, S., Li, Q., Gan, M., Jiang, H., Qin, W., Liu, X., Hu, Y. ve Qiu, G., (2015). "Insights into the relation between adhesion force and chalcopyrite-bioleaching by *Acidithiobacillus ferrooxidans*". Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 126:351-357.
- [61] Lotfalian, M., Ranjbar, M., Fazelipour, M.H., Schaffie, M. ve Manafi, Z., (2015). "Continuous bioleaching of chalcopyritic concentrate at high pulp density". Geomicrobiology Journal, 32:42-49.
- [62] Wiersma, C.L. ve Rimstidt, J.D. (1984). "Rates of reaction of pyrite and marcasite with ferric iron at pH 2". Geochimica et Cosmochimica Acta, 48(1):85-92.
- [63] Antonijevic, M.M., Dimitrijevic, M. ve Jankovic, Z., (1997). "Leaching of pyrite with hydrogen peroxide in sulphuric acid". Hydrometallurgy, 46:71–83.
- [64] Dimitrijevic, M., Antonijevic, M.M. ve Dimitrijevic, V. (1999). "Investigation of The Kinetics of Pyrite Oxidation By Hydrogen Peroxide In Hydrochloric Acid Solutions". Minerals Engineering, 12(2):165-174.
- [65] Dimitrijevic, M., Antonijevic, M.M. ve Jankovic, Z. (1996). "Kinetics of pyrite dissolution by hydrogen peroxide in perchloric acid". Hydrometallurgy, 42:377–386.
- [66] Abhilash., Mehta, K.D. ve Pandey, B.D. (2013). "Bacterial leaching kinetics for

- copper dissolution from a low- grade Indian chalcopyrite ore”. Rem: Rev. Esc. Minas, Ouro Preto, 66(2):245-250.
- [67] Ehrlich, H.L. ve Newman, D.K., (2009). Geomicrobiology, Chapter 4, Lithosphere as Microbial Habitat, Fifth Edition, Taylor & Francis group.
 - [68] Mason, B., (1952). Soil Science, Volume 74, Issue 3, Principles of Geochemistry, Wiley, New York.
 - [69] Silverman, M.P. ve Ehrlich, H.L., (1964). Advances in Applied Microbiology, Volume 6, Microbial formation and degradation of minerals, Academic Press Inc, New York, 153-206.
 - [70] Thode, H. C., Dunford, H. B. ve Shima, M., (1962). “Sulfur isotope abundances in rocks of the Sudbury District and their geological significance”. Economic Geology, 57(4):565-578.
 - [71] Glock, W. S., (1923). “Algae as limestone makers and climatic indicators”. American Journal of Science, 6:377-408.
 - [72] Reiser, R. ve Tasch, P., (1960). “Investigation of the Viability of Osmophile Bacteria of Great Geological Age”. Transactions of the Kansas Academy of Science, 63(1),31-34.
 - [73] Tasch, P. (1960). “Paleoecological Observations of the Wellington Salt (Hutchinson Member)”. Transactions of the Kansas Academy of Science, 63(1):24-30.
 - [74] Ehrlich, H.L. ve Newman, D.K., (2009). Geomicrobiology, Chapter 6, Geomicrobial Processes: Physiological and Biochemical Overview, Fifth Edition, Taylor & Francis group.
 - [75] Rzhapishevskaya, O.I., (2008). Physiology and Genetics of *Acidithiobacillus* species: Applications for Biomining, PhD thesis, Umeå University, Finland, ISBN 978-91-7264-509-7.
 - [76] Weller, J.M., (1960). Glossary of Geology and Related Sciences, Edited by G.R. Committee, Washington, D.C.: Williams and Heinz Lithograph Div.- Kaufmann Printing Inc.
 - [77] Bellenberg, S., Barthen, R., Boretska, M., Zhang, R., Sand, W. ve Vera, M., (2015). “Manipulation of pyrite colonization and leaching by iron-oxidizing *Acidithiobacillus* species”. Appl. Microbiol. Biotechnol., 99:1435-1449.
 - [78] Konhauser, K.O., Lalonde, S.V., Planavsky, N.J., Pecoits, E., Lyons, T.W., Mojzsis, S.J., Rouxel, O.J., Barley, M.E., Ros`iere, C., Phillip, W., Fralick, P.W., Kump, L.R. ve Bekker, A., (2011). “Aerobic bacterial pyrite oxidation and acid rock drainage during the Great Oxidation Event”. Nature, 478:369-373.
 - [79] Chandra, A.P. ve Gerson, A.R., (2010). “The mechanisms of pyrite oxidation and leaching: A fundamental perspective”. Surface Science Reports, 65: 293–315.
 - [80] Ward’s Science, Pyrite Crystal Group,
https://www.wardsci.com/store/catalog/product.jsp?catalog_number=470210-866, 9 Mart 2016.

- [81] Dakota Matrix Minerals,
<http://www.dakotamatrix.com/products/2400/pyrrhotite>, 9 Mart 2016.
- [82] Dutrizac, J.E., (1978). "The kinetics of dissolution of chalcopyrite in ferric iron media". *Metallurgical Transactions B*, 9(3):431–439.
- [83] Third, K.A., Cord-Ruwisch, R. ve Watling, H.R., (2000). "The role of iron-oxidizing bacteria in stimulation or inhibition of chalcopyrite bioleaching". *Hydrometallurgy*, 57:225–233.
- [84] Watling, H. R., (2006). "The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides – a review". *Hydrometallurgy*, 84:81–108.
- [85] Pradhan, N., Nathsarma, K. C., Srinivasa Rao, K., Sukla, L. B. ve Mishra, B.K. (2008). "Heap bioleaching of chalcopyrite: a review". *Minerals Engineering*, 21:355–365.
- [86] Mateos, F.B., Perez, I.P. ve Mora, F.C., (1987). "The passivation of chalcopyrite subjected to ferric sulphate leaching and its reactivation with metal sulphide". *Hydrometallurgy*, 19:159 – 167.
- [87] Biegler, T. ve Horne, M.D., (1985). "The electrochemistry of surface oxidation of chalcopyrite". *J. Electrochem. Soc.* 132:1363 – 1369.
- [88] Brierley, C.L. ve Brierley, J.A., (2013). "Progress in bioleaching: Part B: Applications of microbial processes by the minerals industries". *Appl Microbiol Biotechnol*, 97:7543–7552.
- [89] Clark, M. E., Batty, J. D., van Buuren, C. B., Dew, D. W. ve Eamon, M. A., (2006). "Biotechnology in minerals processing: technological breakthroughs creating value". *Hydrometallurgy*, 83:3–9.
- [90] Chalcopyrite Minerals Fact, http://nevada-outback-gems.com/mineral_information/Chalcopyrite_mineral_info.htm, 9 Mart 2016.
- [91] Ehrlich, H.L. ve Newman, D.K., (2009). *Geomicrobiology*, Chapter 20, Biogenesis and Biodegradation of Sulfide Minerals at Earth's Surface, Fifth Edition, Taylor & Francis group.
- [92] Sand, W., Gehrke, T., Jozsa, P.G. ve Schippers, A., (2001). "Bio/chemistry of bacterial leaching-direct vs. indirect bioleaching". *Hydrometallurgy*, 59:159–175.
- [93] Schippers, A. ve Sand, W., (1999). "Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur". *Appl Environ Microbiol*, 65:319–321.
- [94] Steudel, R., (1996). "Mechanism for the formation of elemental sulfur from aqueous sulfide in chemical and microbiological desulfurization processes". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 35:1417–1423.
- [95] Rohwerder, T. ve Sand, W., (2007). *Microbial Processing of Metal Sulfides*, Editors Donati, E. R. ve Sand, W., Mechanisms and biochemical fundamentals of bacterial metal sulphide oxidation, Springer, Dordrecht, Netherlands, 35–58.
- [96] Vainshtein, M., (2014). *Current Environmental Issues and Challenges*, Editors

- Orru, R. ve Cao, G., *Bioleaching of Metals as Eco-friendly Technology*, Springer Science+Business Media Dordrecht, 197-205.
- [97] Çolak, D.N., (2014). *Acidithiobacillus ferrooxidans* M1 Yaban Tip ve Mutant (Q9F Ve S21Y/V22D) Demir Oksidazlarının Biyokimyasal Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- [98] McArthur, J.C., Forrest, R.W. ve Forrest, W., (1887). Process obtaining gold and silver from ores. Brit. Patent 14174.
- [99] McArthur, J.C., Forrest, R.W. ve Forrest, W., (1889). Process obtaining gold and silver from ores. US Patent 403,202.
- [100] Ehrlich, H.L., (1996). *Geomicrobiology*, Third Edition, Marcel-Dekker Inc., New York, USA.
- [101] Ehrlich, H.L., (2004). "Beginnings of rational bioleaching and highlights in the development of biohydrometallurgy: A brief history". *The European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection*, 4: 102-112.
- [102] Johnson, D.B., (2006). "Biohydrometallurgy and the environment—Intimate and important interplay". *Hydrometallurgy*, 83: 153-166.
- [103] Atlas, R. M. ve Bartha, R., (1997). *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*, Fourth Edition, Addison Wesley Longman, The Benjamin/Cumming Publishing Company, Inc., 694.
- [104] Cupp, C.R., (1985). "After *Thiobacillus ferrooxidans* what?". *Canadian Metallurgical Quarterly: The Canadian Journal of Metallurgy and Materials Science*, 24(2):109-113.
- [105] Bosecker, K., (1997). "Bioleaching: metal solubilization by microorganisms". *FEMS Microbiology Reviews*, 20:591–604.
- [106] Krebs, W., Brombacher, C., Bosshard, P.P., Bachofen, R. ve Brandl, H. (1997). "Microbial recovery of metals from solids". *FEMS Microbiology Reviews*, 20:605–617.
- [107] Rawlings, D.E., Dew, D. ve du Plessis, C. (2003). "Biomining of metal-containing ores and concentrates". *Trends in Biotechnology*, 21:38–44.
- [108] Brandl, H., (2001). *Biotechnology*, Editor Rehm, H.J., Volume 10, Microbial leaching of metals, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 191–224.
- [109] Brandl, H., Bosshard, R. ve Wegmann, M. (2001). "Computer-munching microbes: metal leaching from electronic scrap by bacteria and fungi". *Hydrometallurgy*, 59:319–326.
- [110] Cui, J. ve Zhang, L. (2008). "Metallurgical recovery of metals from electronic waste: A review". *Journal of Hazardous Materials*, 158:228–256.
- [111] Ilyas, S., Anwar, M. A., Niazi, S. B. ve Ghauri, M. A. (2007). "Bioleaching of metals from electronic scrap by moderately thermophilic acidophilic bacteria". *Hydrometallurgy*, 88:180–188.
- [112] Natarajan, G. ve Ting, Y., (2015). "Gold biorecovery from e-waste: An improved strategy through spent medium leaching with pH modification". *Chemosphere*,

136:232-238.

- [113] Shah, M.B., Tipre, D.R. ve Dave, S.R., (2014). "Chemical and biological processes for multi-metal extraction from waste printed circuit boards of computers and mobile phones". *Waste Manag. Res*, 32 (11):1134-41.
- [114] Cheik, M., Magnin, J.P., Gondrexon, N., Willioson, J. ve Hassen, A., (2010). "Zinc and lead leaching from contaminated industrial waste sludges using coupled processes". *Environmental Technology*, 31(14):1577-85.
- [115] Solisio, C., Lodi, A. ve Veglio, F. (2002). "Bioleaching of zinc and aluminium from industrial waste sludges by means of *Thiobacillus ferrooxidans*". *Waste Management*, 22:667–675.
- [116] Yang, J., Wang, Q., Wang, Q. ve Wu, T., (2009). "Heavy metals extraction from municipal solid waste incineration fly ash using adapted metal tolerant *Aspergillus niger*". *Bioresource Technology*, 100:254–260.
- [117] Jadhav, U.U. ve Hocheng, H., (2015). "Analysis of metal Bioleaching from thermal power plant fly ash by *Aspergillus niger* 34770 culture supernatant and reduction of phytotoxicity during the process". *Appl Biochem Biotechnol.*, 175(2):870-81.
- [118] Bosecker, K., (2001). "Microbial leaching in environmental clean-up programmes". *Hydrometallurgy*, 59:245–248.
- [119] Fonti, V., Dell'Anno, A. ve Beolchini, F., (2013). "Influence of biogeochemical interactions on metal bioleaching performance in contaminated marine sediment". *Water Res.*, 47(14):5139-52.
- [120] Rawlings, D.E. ve Johnson, D.B., (2007). "The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia". *Microbiology*, 153:315–324.
- [121] Abhilash. ve Pandey, B.D., (2013). "Microbial processing of apatite rich low grade Indian uranium ore in bioreactor". *Bioresour Technol.*, 128:619-23.
- [122] Olson, G.J., Brierley, J.A. ve Brierley C.L., (2003). "Bioleaching review part B: progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63:249–257.
- [123] Rawlings, D.E., (1997). *Biomining: Theory, Microbes and Industrial Processes*. Chapter 11, Mesophilic, autotrophic, bioleaching bacteria: Description, physiology and role, Springer-Verlag, Berlin, Germany, 229-245.
- [124] Jones, D., Wilson, M.J. ve McHardy, W.J., (1981). "Lichen weathering of rock-forming minerals: Application of scanning electron microscopy and microprobe analysis". *Journal of Microscopy*, 124(1):95–104.
- [125] Ilbert, M. ve Bonnefoy, V., (2013)., "Insight into the evolution of the iron oxidation pathways". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1827:161–175.
- [126] Thamdrup, B., (2000). *Advances in microbial ecology, Bacterial manganese and iron reduction in aquatic sediments*. Editor Schink, B., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 41-84.

- [127] Straub, K.L., Benz, M. ve Schink, B., (2001). "Iron metabolism in anoxic environments at near neutral pH". *FEMS Microbiol Ecol.*, 34:181-186.
- [128] Cornell, R.M. ve Schwertmann, U., (2003). *The Iron Oxides: Structures, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*, Second Edition, Wiley-VCH, Weinheim.
- [129] Mottana, A., R. Crespi, R. ve Liborio, G., (1983). *The Macdonald Encyclopedia of Rocks and Minerals*, London: Macdonald & Co, London & Sydney.
- [130] Kappler, A. ve Straub, K.L., (2005). "Geomicrobiological Cycling of Iron". *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 59:85-108.
- [131] Kraemer, S.M., Butler, A., Borer, P. ve Cervini-Silva, J., (2005). "Siderophores and the dissolution of iron-bearing minerals in marine systems". *Rev Mineral Geochem*, 59:53-84.
- [132] Konhauser, K.O., (1997). "Bacterial iron biomineralization in nature". *FEMS Microbiol Rev*, 20:315-326.
- [133] Temple, K.L. ve Colmer, A.R., (1951). "The Autotrophic Oxidation of Iron By a New Bacterium: *Thiobacillus Ferrooxidans*". *Journal of Bacteriology*, 62(5):605-611.
- [134] Rawlings, D. E., (2002). "Heavy Metal Mining Using Microbes", *Annu. Rev. Microbiol.*, 56:65-91.
- [135] Smith, J.V., (2005). "Geochemical Influences on Life's Origins and Evolution". *Elements*, 1:151-156.
- [136] Nurmi, P., (2009). *Oxidation and Control of Iron in Bioleaching Solutions*, Ph.D Thesis, Tampere University of Technology, Publication 840.
- [137] Winogradsky, S., (1887). "Ueber Schwefelbakterien". *Botanische Zeitung*, 31:489-507.
- [138] Brierley, J. A., (2008). "A perspective on developments in biohydrometallurgy". *Hydrometallurgy*, 94:2-7.
- [139] Brierley, J. A. ve Brierley, C. L., (2001). "Present and future commercial applications of biohydrometallurgy". *Hydrometallurgy*, 59:233-239.
- [140] Plessis, C.A., Batty, J.D. ve Dew, D.W., (2007). *Biomining*, Editors Rawlings, D.E. ve Johnson, D.B., Commercial applications of thermophile bioleaching, Springer, Heidelberg, Germany, 57-80.
- [141] Nèveke, R., (1986). "Bacterial leaching of ores and other materials". <http://www.spaceship-earth.de/REM/Naeveke.htm>, 9Mart 2016.
- [142] *Neuzeitliche Minen auf Zypern*, http://homersheimat.de/themen/minen-auf-zypern/minen_zypern.php, 9Mart 2016.
- [143] *Bioshale, Search for a sustainable way of exploiting Black Shale Ores using Biotechnologies*, http://bioshale.brgm.fr/description_objectives.asp, 9Mart 2016.
- [144] Ahmadi, A., Schaffie, M., Petersen, J., Schippers, A. ve Ranjbar, M., (2011).

- "Conventional and electrochemical bioleaching of chalcopyrite concentrates by moderately thermophilic bacteria at high pulp density". *Hydrometallurgy*, 106:84–92.
- [145] Batty, J.D. ve Rorke, G.V., (2006). "Development and commercial demonstration of the BioCOP™ thermophile process". *Hydrometallurgy*, 83(1-4):83–89.
- [146] Brierley, C.L., (1978). "Bacterial leaching". *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 6:207-262.
- [147] Brierley, C.L., (1982). "Microbial mining". *Scientific American*, 247:42- 53.
- [148] Johnson, D.B., (2001). "Importance of microbial ecology in the development of new mineral technologies". *Hydrometallurgy*, 59: 147-157.
- [149] Akcil, A. ve Ciftci, H., (2006). "Mechanisms of bacterial leaching in metal recovery". *The Journal of the Chamber of Mining Engineers of Turkey*, 45: 19-27.
- [150] Norris, P.R., (1997). *Biomining: Theory, Microbes and Industrial Processes*. Editor Rawlings, D.E., *Thermophiles and bioleaching*, Springer-Verlag, Berlin, Germany, 247-258.
- [151] Norris, P.R., (1990). *Microbial Mineral Recovery*. Editors Ehrlich, H.L. ve Brierley, C.L., *Acidophilic bacteria and their activity in mineral sulphide oxidation*, McGraw-Hill, New York, USA, 3-27.
- [152] Barrett, J., Hughes, M.N., Karavaiko, G.I. ve Spencer, P.A., (1993). "Metal Extraction by Bacterial Oxidation of Minerals". Ellis Horwood Ltd., London, UK.
- [153] Johnson, D.B., (1998). "Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms". *FEMS Microbiology Ecology*, 27: 307-317.
- [154] Robbins E.I., (2000). "Bacteria and archaea in acidic environments and a key to morphological identification". *Hydrobiologia*, 433: 61-89.
- [155] Johnson, D. B., (2008). "Biodiversity and interactions of acidophiles: key to understanding and optimizing microbial processing of ores and concentrates". *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 18:1367–1373.
- [156] Rawlings, D. E., (2005). "Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates". *Microbial Cell Factories*, 4:1–15.
- [157] Schippers, A., (2007). *Microbial Processing of Metal Sulfides*, Editors Donati, E.R. ve Sand, W., *Microorganisms involved in bioleaching and nucleic acid-based molecular methods for their identification and quantification*, Springer, Dordrecht, Netherlands, pp. 3–33.
- [158] Newman, D.K., (2001). "How bacteria respire minerals". *Science*, 292:1312-1313.
- [159] Dold, B., Blowes, D.W., Dickhout, R., Spangenberg, J.E. ve Pfeifer, H.R., (2005). "Low molecular weight carboxylic acids in oxidizing porphyry copper tailings". *Environ Sci Technol*, 39:2515-2521.

- [160] Ehrlich, H.L. ve Newman, D.K., (2009). Geomicrobiology, Chapter 16, Geomicrobiology of Iron, Fifth Edition, Taylor & Francis group, 283.
- [161] Waksman, S.A. ve Joffe, J.S., (1922). "The Chemistry of the Oxidation of Sulfur by Microorganisms to Sulfuric Acid and Transformation of Insoluble Phosphates into Soluble Forms". Jour. Biol. Chem., 50:35-45.
- [162] Kelly, D.P. ve Wood, A.P., (2000). "Re-classification of Some Species of *Thiobacillus* to the Newly Designated Genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov.". Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50:511–16.
- [163] Bryant, R.D., McGroarty, K.M., Costerton, J.W. ve Laishley, E.J., (1988). "*Thiobacillus albertis* sp. nov. in Validation of the Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published Outside the IJSB, List no. 25". Int J. Syst Bacteriol, 38:220-222.
- [164] Hallberg, K.B. ve Lindström, E.B., (1994). "Characterization of *Thiobacillus caldus* sp. nov., a Moderately Thermophilic Acidophile". Microbiology, 140:3451–3456.
- [165] Hallberg, K.B., González-Toril, E. ve Johnson, D.B., (2010). "*Acidithiobacillus ferrivorans* sp. nov.; Facultatively Anaerobic, Psychrotolerant, Iron- and Sulfur-Oxidizing Acidophiles Isolated from Metal Mine-Impacted Environments". Extremophiles, 14:9-19.
- [166] Hedrich, S. ve Johnson, D. B., (2013). "*Acidithiobacillus ferridurans*, sp. nov.; an Acidophilic Iron, Sulfur and Hydrogen-metabolizing Chemolithotrophic *Gammaproteobacterium*". International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63:4018-4025.
- [167] Karavaiko, G.I., Turova, T.P., Kondrat'eva, T.F., Lysenko, A.M., Kolganova, T.V., Ageeva, S.N., Muntyan, L.N. ve Pivovarov, T.A. (2003). "Phylogenetic heterogeneity of the species *Acidithiobacillus ferrooxidans*". Int J Syst Evol Microbiol, 53:113-119.
- [168] Gonzalez-Toril, E., Llobet-Brossa, E., Casamayor, E.O., Amann, R. ve Amils, R., (2003). "Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River". Appl Environ Microbiol, 69:4853-4865.
- [169] Kamimura, K., Higashino, E., Moriya, S. ve Sugio, T. (2003). "Marine acidophilic sulfur- oxidizing bacterium requiring salts for the oxidation of reduced inorganic sulfur compounds". Extremophiles, 95-99.
- [170] Schrenk, M.O., Edwards, K.J., Goodman, R.M., Hamers, R.J. ve Banfield, J.F. (1998). "Distribution of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*: Implications for generation of acid mine drainage". Science, 279, 1519-1522.
- [171] Donati, E., Pogliani, C. ve Boiardi, J.L., (1997). "Anaerobic Leaching of Covellite by *Thiobacillus ferrooxidans*". Appl Microbiol Biotechnol, 47:636-9.
- [172] Pronk, J.T. ve Johnson, D.B., (1992). "Oxidation and Reduction of Iron by Acidophilic Bacteria". Geomicrobiology Journal, 10:153-171.

- [173] Vian, M., Creo, C., Dalmastri, C., Gionni, A., Palazzolo, P. ve Levi, G., (1986). "*Thiobacillus ferrooxidans* Selection in Continuous Culture". Fundamental and Applied Biohydrometallurgy, 395–406.
- [174] Leduc, L.G. ve Ferroni, G.D., (1994). "The Chemolithotrophic Bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*". FEMS Microbiol Lett, 14:103–120.
- [175] Ingledew, W.J. (1982). "Thiobacillus ferrooxidans: The bioenergetics of an acidophilic chemolithotrophs". Biochimica et Biophysica Acta, 683: 89-117.
- [176] Karavaiko, G.I., Kuznetsov, S.I. ve Golonizik, A.I., (1977). "The Bacterial Leaching of Metals from Ores". Translated by Burns W., Technicopy Ltd., London. UK.
- [177] Sand, W., Gehrke, T., Hallmann, R. ve Schippers, A., (1995). "Sulfur chemistry, biofilm, and the (in)direct attack mechanism: a critical evaluation of bacterial leaching". Appl Microbiol Biotechnol, 43:961–966.
- [178] Rodriguez-Leiva, M. ve Tributsch, H., (1988). "Morphology of bacterial leaching patterns by *Thiobacillus ferrooxidans* on synthetic pyrite". Arch. Microbiol, 149:401–405.
- [179] Rohwerder, T., Gehrke, T., Kinzler, K. ve Sand, W., (2003). "Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation". Appl Microbiol Biotechnol, 63: 239–248.
- [180] Tributsch, H., (2001). "Direct versus indirect bioleaching". Hydrometallurgy, 59:177–185.
- [181] Garcia Frutos, F.J., (1998). Mineral Processing and the Environment, Editors Gallios, G.P. ve Matis, K.A., Volume 43, Bacterial leaching of minerals, Kluwer Academic Publishers, 43-72.
- [182] Deveci, H., Akcil, A. ve Alp, I., (2004). "Bioleaching of complex zinc sulphides using mesophilic and thermophilic bacteria: Comparative importance of pH and iron". Hydrometallurgy, 73 (3-4), 293-303.
- [183] Deveci, H., Akcil, A. ve Alp, I., (2003). "Parameters for control and optimization of bioleaching of sulphide minerals". International Symposium Process Control and Optimization in Ferrous and Non Ferrous, 9-12 November, Chicago, USA.
- [184] Apel, W.A. ve Dugan, P.R., (1978). Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena Editors Murr, E.L., Torma, A.E. ve Brierley, J.A., Hydrogen ion utilisation by iron-grown *Thiobacillus ferrooxidans*, Academic Press, New York, 45-59.
- [185] Nemati, M., Harrison, S.T.L., Hansford, G.S. ve Webb, C., (1998). "Biological oxidation of ferrous sulphate by *Thiobacillus ferrooxidans*: a review on the kinetic aspects". Biochemical Engineering Journal, 1:171–190.
- [186] Yahya, A. ve Johnson, D.B., (2002). "Bioleaching of pyrite at low pH and low redox potentials by novel mesophilic Gram-positive bacteria". Hydrometallurgy, 63:181–188.
- [187] Bruins, M.R., Kapil, S. ve Oehme, R.W., (2000). "Microbial resistance to metals in the environment". Ecotoxicology and Environmental Safety, 45:198–207.

- [188] Barron, J.L. ve Lueking, D.R., (1990). "Growth and maintenance of *Thiobacillus ferrooxidans* cells". Applied and Environmental Microbiology, 56:2801–2806.
- [189] Shrihari, R.K. ve Gandhi, K.S., (1990). "Modelling of Fe²⁺ oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*". Applied Microbiology and Biotechnology, 33:524–528.
- [190] Leathen, W.W., Braley, S.A. ve McIntyre, L.D. (1953). Appl. Microbiol., 1:65-68.
- [191] Silverman, M.P., Rogoff, M.H. ve Wender, I., (1961). "Bacterial Oxidation of Pyritic Materials in Coal". Appl. Microbiol. 9(6):491-496.
- [192] Emerson, D. ve Moyer, C.L., (2002). "Neutrophilic Fe-oxidizing bacteria are abundant at the Loihi seamount hydrothermal vents and play a major role in Fe oxide deposition". Applied and Environmental Microbiology, 68(6):3085-3093.
- [193] Stookey, L.L., (1970). "Ferrozine-A new spectrophotometric reagent for iron". Analytical Chemistry, 42(7):779-781.
- [194] Moffett, J.W., Zika, R.G. ve Petasne, R.G., (1985). "Evolution of Bathocuprione for the spectrophotometric determination of copper (I) in copper redox studies with applications in studies of natural waters". Analytica Chimica Acta, 175:171-179.
- [195] Nicholson, R.V. ve Scharer, J.M., (1994). Environmental Geochemistry of Sulfide Oxidation, Editors Alpers, C.N. ve Blowes, D.W., Chapter 2, Laboratory studies of pyrrhotite oxidation kinetics, ACS Symposium Series, Washington, DC, 550:14–30.
- [196] Dutrizac, J.E. ve MacDonald, R.J.C., (1974). "Ferric ion as a leaching medium". Minerals Science and Engineering, 6(2):59–100.
- [197] Zhao, H., Wang, J., Yang, C., Hu, M., Gan, X., Tao, L., Qin, W. ve Qiu G., (2015). "Effect of redox potential on bioleaching of chalcopyrite by moderately thermophilic bacteria: An emphasis on solution compositions". Hydrometallurgy, 151:141-150.
- [198] Bird, L.J., Bonnefoy, V. ve Newman, D.K., (2011). "Bioenergetic challenges of microbial iron metabolisms". Trends in Microbiology, 19(7):330-340.
- [199] Cher, M. ve Davidson, N., (1955). "The kinetics of the oxygenation of ferrous iron in phosphoric acid solution". J. Am. Chem. Soc., 77(3):793-798.
- [200] Karimi, G.R., Rowson, N.A. ve Hewitt, C.J. (2010). "Bioleaching of copper via iron oxidation from chalcopyrite at elevated temperatures". Food Bioprod. Process, 88(1):21–25.
- [201] Gericke, M., Govender, Y. ve Pinches, A., (2010). "Tank bioleaching of low-grade chalcopyrite concentrates using redox control". Hydrometallurgy, 104:414–419.
- [202] Buckley, A.N. ve Woods, R., (1985). "X-ray photoelectron spectroscopy of oxidized pyrrhotite surfaces:I. Exposure to air". Appl. Surf. Sci, 22-23(1):280–287.
- [203] Pratt, A.R, Muir, I.J. ve Nesbitt, ve H.W., (1994). "X-ray photoelectron and Auger electron studies of pyrrhotite and mechanism of air oxidation". Geochim.

Cosmochim. Acta., 58:827–841.

- [204] Mycroft, J.R., Nesbitt, H.W. ve Pratt, A.R. (1995). “X-ray photoelectron and Auger electron spectroscopy of air-oxidized pyrrhotite: Distribution of oxidized species with depth”. *Geochim. Cosmochim. Acta.*, 59:721–733.
- [205] Bhatti, T.M., Bigham, J.M., Carlson, L. ve Tuovinen, O.H., (1993). “Mineral Products of Pyrrhotite Oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*”. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(6):1984-1990.
- [206] Sasaki, K., Tsunekawa, M., Ohtsuka, T. ve Konno, H., (1995). “Confirmation of a sulfur-rich layer on pyrite after oxidative dissolution by Fe(III) ions around pH 2”. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59(15):3155-3158.
- [207] Li, Y., Kawashima, N., Li, J., Chandra, A.P. ve Gerson, A.R., (2013). “A review of the structure, and fundamental mechanisms and kinetics of the leaching of chalcopyrite”. *Advances in Colloid and Interface Science*, 197-198:1-32.
- [208] Rodríguez, Y., Ballester, A., Blázquez, M.L., González, F. ve Muñoz, J.A., (2003). “Study of Bacterial Attachment During the Bioleaching of Pyrite, Chalcopyrite, and Sphalerite”. *Geomicrobiology Journal*, 20(2):131-141.
- [209] Yang, Y., Tan, S.N., Glenn, A.M., Harmer, S., Bhargava, S. ve Chen, M., (2015). “A direct observation of bacterial coverage and biofilm formation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* on chalcopyrite and pyrite surfaces”. *Biofouling*, 31(7):575–586.
- [210] Africa, C.J., van Hille, R.P. ve Harrison, S.T.L., (2013). “Attachment of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferriphilum* cultured under varying conditions to pyrite, chalcopyrite, low-grade ore and quartz in a packed column reactor”. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 97:1317–1324.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ayşe Tuba KOCAMAN
Doğum Tarihi ve Yeri : 16.07.1975 İzmir
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : tubakcmn@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y.Lisans	Fizik	Marmara Üniv.	2011
Lisans	Fizik	Ege Üniv.	1997
Lise	Bilişim Teknolojileri	İzmir Göztepe Anadolu Lisesi	1993

YAYINLAR

Makale

Kocaman A.T., Cemek M., Edwards K.J. 2016. "Kinetics of Pyrite, Pyrrhotite and Chalcopyrite Dissolution by *Acidithiobacillus ferrooxidans*", Canadian Journal of Microbiology, DOI: 10.1139/cjm-2016-0102

Bildiri

Kocaman A.T. Bioleaching of Pyrite, Pyrrhotite and Chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. GrandEng 2014, Workshop on Grand Challenges in Engineering and Applied Sciences, May 16-18, 2014, Princeton University, PRINCETON, NJ.

Kocaman A.T., Cemek M., Işıldak İ., Demircan A. 2012. "Çevreci küçük devler: Mikroorganizmalar". Yıldız Teknik Üniversitesi, Fikirler Pazarı, 29-30 Mayıs 2012.

