

3. MİROORGANİZMALARIN TOPRAK VE YERALTI SUYUNDAKİ DAĞILIMI

Mikroorganizmalar özellikle bakteriler yeraltı suyu ve toprağın heryerinde bulunabilirler. Mikroorganizmalar yüzeyden 500-600 metre derinlikte bile belirlenmiştir (Thomas ve Word, 1992). Her grup organizma türü pH, nem miktarı, toprak strüktürü ve besin madde yarayırlılığı gibi çevresel faktörlerle değişebilirler. Sature olmamış toprakta mikroorganizmalar agregatların yüzeyinde, porların içinde veya bitki köklerine tutunmuş durumda bulunurlar. Bazı mikroorganizmalar yeraltı suyunda yüzer halde bulunabilir fakat büyük miktarı toprağa tutunmuş durumdadır. Mikroorganizmalar özellikle bakteriler besin madde birikimi olan oligotrofik çevrelerde yüzeyde adsorbe olma yeteneğindedirler. Toprak yüzeyi ve özellikle toprağın bir parçası olarak tanımlanan ve bitki köklerinin direk etkisi altında olan rizosfer (Tate, 1995) genellikle mikroorganizma yoğunluğu ve mikrobiyal aktivite bakımından en zengin olan kısımdır. Bitki kökleri mikroorganizmalara büyümeleri için yüzey alanı sağlar, fakat daha da önemlisi kökler vitamin ve büyüme faktörleri gibi inorganik ve organik besin maddeleri sağlarlar.

Sonuç olarak rizosfer yüzey toprağına kıyasla daha yüksek mikroorganizma sayısına, metabolik tür çeşitliliğine ve büyüme oranına sahiptir. Rizosfer etkisi; populasyon yoğunluğu, büyüme oranı veya metabolik yeteneklilik gibi mikroorganizmaların aktivite ölçüm değerlerinin rizosfer ve yüzey toprağında kıyaslanmasıdır. Rizosfer etkisi en az 1, en çok 20 veya 100 değerine sahiptir. 1'den az değer rizosferde bazı engelleyici veya toksik etki olduğunun belirtisidir.

Rizosfer Etkisi: R/S

R: aktivite/birim rizosfer toprak ağırlığı

S:aktivite/birim yüzey toprak ağırlığı

Rizosferdeki mikrobiyal aktivite şiddeti PAH ve klorlu çözücüler gibi parçalanmaya karşı dayanıklı (recalcitrant) maddelerin nispeten biyolojik parçalanmasında kullanılırlar. Rizosfer ile rizosfer dışı bölge kıyaslandığında, rizosferde parçalanma oranı daha yüksek iken, alışma devresi daha kısadır. Buna karşın, kirleticilere uzun süre maruz kalmada her iki toprakta mikrobiyal aktivite bakımından dikkate değer farklılık belirlenmemiştir. Rizosfer hala biyolojik iyileştirme çalışmaları devam eden yeni bir araştırma bölgesidir.

Organik besin maddelerinin çok olduğu yüzey toprağında bakteriler dominanttır. Bakteri sayısı, toprak koşullarına ve sayı tespitinde kullanılan yöntemlere de bağlı olarak 10⁷ ile 10¹⁰ cfu (colony forming unit) / gram kuru toprak arasındadır. Protozoa, alg ve mantar

sayıları bakterilerden daha azdır. Yüksek protozoa sayısı genellikle yüksek bakteri sayısı ile ilişkilidir. Alg sayısı solar enerji azalmasına bağlı olarak yüzeyden uzaklaştıkça azalır, ayrıca nispeten asidik ve kuru koşullarda büyümeye meyillidirler. Yüzeyden derine doğru gidildikçe organik besin madde miktarları azalır. Buna bağlı olarak mikroorganizma sayıları da azalma gösterir. Sinclair ve Ghiorse (1989) 200 metrenin altındaki derinlikte bile çok sayıda mantar, protozoa ve alg bulunduğunu belirtmişlerdir. 10^6 ve 10^7 gibi çok sayıda bakteri toprak profili boyunca bulunmaktadır. Farklı yüzeyaltı tabakalarında mikrobiyal populasyon yoğunluğu, türü ve aktiviteleri kil miktarı, düşük pH ve ağır metal konsantrasyonu ile negatif, kum ve nem içeriği ile de pozitif ilişki göstermektedir.

Bakteriler

Bakteriler toprakta, suda ve biyolojik iyileştirme sistemlerinde çok fazla bulunduğundan bunların özelliklerine diğer organizmalardan daha fazla önem verilmektedir. Bu bölümde bakterilerin kimyasal oluşumları ile genel hücre yapıları incelenecektir.

Bakteriler, birçok kaynaktan enerji sağlayan mikroorganizmaların farklı bir grubunu içerirler. Bazı bakteriler enerjilerinin birden fazla kaynak kullanılarak örneğin, ışık (fotoototrof ya da fotosentetik) yanında indirgenmiş organik (heterotrof) ya da indirgenmiş inorganik bileşiklerden (litotrof ya da kemoototrofik) sağlayabilirler.

Halojenli bileşikler gibi bazı organik bileşiklerin ayrışmasında, bazı enerji kombinasyonlarını kullanan çeşitli litotrofik bakteriler önemli olabilir. Organik kirliliğin biyolojik ayrışımı için esas sorumlu grup heterotrof bakterilerdir. Litotrofik ya da fotosentetik bakteriler toksik metal ya da metalimsilerin dönüşümlerinde önemli olabilirler. Tüm canlı organizmalar en sonunda, enerji ve elementlerin döngüsü için fotosentetik (ototrofik) ve litotrofik bakterilerle bağımlıdırlar.

Bütün yaşayan organizmalarda oksidasyon-redüksiyon döngü gücünü sağlamak ve enzim sistemlerinin azdan gücünü yeniden oluşturmak için enerji üretim ve solunum olaylarının karşılıklı olarak yer alması gereklidir. Bu bileşen, enerji üretimi sırasında oksitlenmiş bileşiklerden serbest bırakılan elektronların ilavesiyle oksitlenmiş bileşiklerin redüksiyonunu sağlar. Elektron alıcısı organik ya da inorganik bir bileşik olabilir. Birçok bakteri, mantarların pek çoğu ve tüm yüksek organizmalar için son elektron alıcı, aerobik solunum olarak tanımlanan işlemde oksijendir. Aerobik solunumdaki son indirgenmiş substrat sudur ve enerji üretiminden salınmış son oksitlenmiş bileşik karbondioksittir. Pek çok ara organik bileşikler, gelişme için gerekli materyallerin temini ve çabuk üreme için olduğu kadar ilave enerji sağlanması için de farklı karmaşık metabolik yollarla oksitlenir veya indirgenirler.

Oksijenin yokluğunda, belli bakteriyel populasyonlar solunumda diğer daha oksitlenmiş inorganik bileşikleri (anaerobik solunum) ya da yalnızca organik bileşikleri kullanırlar (fermantasyon). Eğer denitrifikasyon ya da nitrat redüksiyonuna izin veriyorsa anaerobik şartlar çoğunlukla anoksik olarak adlandırılır. Denitrifikasyon, aerobik ya da anaerobik şartlarda (fakültatif anaerob) gelişebilen bakteriler tarafından teşvik edilir. Moleküler oksijen yokluğunda bu organizmalar solunum için son elektron alıcı olarak nitratı kullanırlar. Oksidasyon – redüksiyon (redoks) potansiyelleri topraklarda düştüğünde, diğer oksijenli bileşikler bakterilerin belli grupları tarafından son elektron alıcısı olarak kullanılırlar. Oksijenin toksik etki yaptığı bu bakteriler zorunlu anaeroblar (obligat anaeroblar) olarak adlandırılır. Yaygın alternatif elektron alıcılar ve birleşik bakteriyel gruplar, ferrik demir (demir indirgeyiciler), sülfat (sülfat indirgeyiciler veya sulfidojenler) ve karbondioksit (metanojenler) içerir.

Kirlenmiş topraklarda tipik olarak derece derece değişen farklı mikrobiyal kominiteler bulunmaktadır. Toprak yüzeyindeki kominiteler aerobik solunum ve fotosentez işlemlerini sürdürürken toprak profillerinin derinliğindeki diğer kominiteler oksidasyon-redüksiyon potansiyelinin oldukça olumsuz olmasına bağlı olarak sıralar oluştururlar.

Bakterilerin her özel grup ya da sırası yaşamak için diğer özel grup ya da sıraya az çok bağımlıdır. Bir organizma ya da grup diğerinden yararlanıyor ve diğeri bundan etkilenmiyorsa bu ilişki **kommensalizm** veya her iki organizma ya da grup karşılıklı olarak birbirlerinin aktivitelerinden yararlanıyorlarsa **simbiyosis** olarak tanımlanır. Ortak olarak, bakteriler solunum için toksik olmayan indirgenebilir bileşikleri bir elektron alıcı olarak kullanabilir, belki de buna su da dahildir (Volgel ve Grbic-Galic, 1986).

Tüm kirleticilerin tamamen aerobik şartlar altında ve çok hızlı biyolojik ayrışımaya uğradığı şeklinde genel bir yanlışlık vardır. Bu durum çoğunlukla doğru olsa da, anaerobik şartlar bazı önemli ayrıştırıcı işlemleri teşvik eder. Örneğin, yüksek oranda klorlanmış organik bileşiklerin indirgeyici klor giderimi esas olarak, anaerobik bakteriler tarafından teşvik edilir (Mikesell ve Boyd, 1986; Kuhn ve Sufilita, 1989; Distefano ve ark., 1991; Chavudhry ve Chapalamadugu, 1991).

Bazı bakteriler çok dayanıklı içsel sporlar üretir (örneğin, Bacillus ve Clostridium spp.) veya daha gelişmiş aktinomisetler pek çok hava sporları üretirler. Bu sporlar elverişsiz gelişme şartları altında oluşmaktadırlar ve yüzyıllarca canlı kaldıkları bilinmektedir. Bazı toprak aktinomisetleri dirençli ve yabancı organik bileşiklerin ayrışmasında önemlidirler.

Alternatif Oksijen Taşıyıcılar Olarak Nitrat ve Sülfat

Topraklarda oksijen tüketildiği zaman pek çok aerobik bakteri solunum için nitratı bir oksijen kaynağı olarak kullanır (Keeney, 1972; Painter, 1970). Denitrifikasyon olarak tanımlanan bu süreç, yakıtlarda bulunan pek çok aromatik bileşenlerin ayrıştırılmasını desteklemek için kullanılmıştır (Battermann,1986; Berry-Spark ve arkadaşları,1986;Hutchins ve Wilson, 1991). Denitrifikasyonu uyarmak için yeterli nitratın yokluğunda belirli anaerobik bakterinin solunumu için sülfatı oksijen kaynağı olarak kullanabilir. Petrol ürünlerinin anaerobik çalışmasında sülfatın kullanılması için arazi çalışmaları yapılmıştır (Reinhard ve arkadaşları, 1984). Arazi çalışmaları ve kirlenen topraklardan alınan örneklerin laboratuvar çalışmaları sülfatı indirgeyen bakterilerin monoaromatik hidrokarbonların biyolojik ayrışmasında etkili olabileceğini göstermektedir (Edwards ve arkadaşları,1991). Son bilgilerde uzun zincirli alkan hidrokarbonların sülfat indirgeyen bakteriler tarafından ayrıştırılabileceği gösterilmektedir (ASM, News ,1990).

Biyolojik iyileşmeler için getirilen moleküller oksijen yerine sülfat ya da nitratın kullanılması potansiyel avantajdır. Bu anyonların çoğu oksijenden daha fazla çözünürdür. Bu nedenle kütleli aktarım sağlanacak aküfere yeterli konsantrasyonda ilave edilebilir. Yüksek birçok klorlanmış aromatik ve alifatik hidrokarbonlarda anaerobik koşullar altında arıtılabilmektedir.

Çok sayıda laboratuvar ve biyoreaktör çalışmaları klor ve halitlerle yüksek düzeyde yer değiştirmiş organik bileşiklerin anaerobik ayrışmasının olası olduğunu göstermektedir. Fakat yerinde yapılan bu işlemler hakkında çok az bilgi vardır. Yeraltı suyunda halojenlenmiş alifatik bileşiklerin indirgenerek taşınmaları Bouwer ve arkadaşları tarafından denenmiştir.

Semprini ve arkadaşları 1991 'de Kaliforniya 'da küçük bir alvea kontrollü bir çalışma yöntemini bu çalışmada doğal bakteriler kullanarak karbon tetra klorür, 1,1,1 tri klor etan, ferro 113, ferro 11 bileşiklerinin düşük düzeylerini anaerob koşullar altında ayrıştırdığını belirtmişlerdir. Bu reaksiyonlarda son elektron alıcı olarak moleküller oksijenin yokluğunda nitrat ve sülfat ortamda yeteri kadar bulunmakta ve ayrıca asetatta birincil karbon kaynağı olarak görev yapmaktadır.

Çok daha yoğun subsitive (başkası yerine geçen) olmuş karbon tetra klorürün denitrifikasyon koşulları altında ayrıştığı gözlenmiştir. Ancak, bütün kirleticiler için yüksek düzeyde ayrışma oranları yüzey altında nitrat tüketildikten sonra anaerobik solunum için sülfatın tek primer elektron alıcı olduğu ortamlarda yüksek ayrışma oranları saptanmıştır. Denitrifikasyon bakterilerinin karbon tetra klorür, 1,1,1 tri klor etan ve diğer klorlanmış hidro karbonların ayrışmasında düşük yetenekte olduğu ; bu maddelerin ayrışması sülfatı indirgeyen bakteri geliştirici önlemleri laboratuvar ve kolon çalışmalarıyla gösterilmiştir.

Hücrelerin Kimyasal Oluşumları

Esheria Coli gibi özel koşullar altında yetişen türler dışında çoğu bakterinin yapısı aynıdır. Karbonun hücre yapımında temel element olduğu hatırlanırsa Bratback (1985) basit bakteri hücrelerinin C içeriğinin 1×10^{-13} gram olarak belirlemiştir. Bakteri hücrelerinin hacmi toplam ağırlığın %90'ı oranında su içermektedir. Proteinler temel makromoleküller ile bakteri hücrelerini oluşturur. Yaşayan bütün hücreleri oluşturan temel elementler; karbon, azot, hidrojen, fosfor ve kükürttür. Özel enzim katalizör reaksiyonlarında elektron taşıyıcı olarak (kofaktör) görev yaptıklarından ötürü çinko, bakır, kalsiyum, kobalt, potasyum, mangan ve demir gibi metaller yaşam için gereklidir. Bu iz elementlere çok düşük miktarlarda gerek duyulmasına rağmen bunlar genellikle toprakta ve suda fazla miktarda bulunmaktadır. Tablo 2.3'de tipik bakteri hücre oluşumları verilmiştir.

Tablo 2.3. Kuru ağırlık üzerinden bakteri hücrelerinin elementel oluşumları *Yaşayan hücrelerin %90'ı sudan oluşmuştur.

Element	Kuru ağırlık cinsinden %	Genel fizyolojik fonksiyon
Karbon	50	Organik hücre materyal unsuru
Oksijen	20	Hücre sel su ve organik hücre materyal unsuru
Azot	14	Protein, nükleik asit, koenzim unsuru
Hidrojen	8	Hücre sel su ve organik hücre materyal unsuru
Fosfor	3	Nükleik asit, fosfolipid, koenzim unsuru
Kükürt	1	Protein ve koenzim unsuru
Potasyum	1	Hücre işlemlerinde temel katyon
Sodyum	1	Hücre işlemlerinde temel katyon
Kalsiyum	0.5	Hücre işlemlerinde temel katyon, enzim kofaktörü
Magnezyum	0.5	Hücre işlemlerinde temel katyon ve ATP reaksiyonlarında kofaktör
Klor	0.5	Hücre işlemlerinde temel anyon
Demir	0.2	Diğer protein, enzim ve stokrom unsuru
İz Element	0.3	Özel enzimlerin inorganik unsurları

Mikrobiyal hücrelerin kimyasal unsurlarının elementel oranları veya ampirik hücre formülleri hücre dokularının oksijen ihtiyacı ile büyüme için gerekli besin element miktarının tahmininde

kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan ampirik hücre formülü $C_5H_7NO_2$ (Porges et al., 1953). fosfor elementini dışarıda bırakmaktadır. Ampirik hücre formülü özel çevre koşulları altında büyümeyi temsil eder, aynı zamanda da aşağıdaki örnekte de gösterildiği gibi genellikle ilave ilişkilerinde kullanılmaktadır.

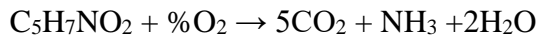
Örnek:

Teorik olarak bakteri hücresinin oksijen ihtiyacının hesaplanması:

Aşağıda verilen ampirik hücre formüllerini kullanarak 1 gram mikrobiyal hücrenin teorik oksijen ihtiyacını (THOD) bulunuz?

Çözüm:

1. $C_5H_7NO_2$ 'nin oksidasyon denklemini yazınız?



2. 1 gram $C_5H_7NO_2$ 'nin THOD miktarını belirleyiniz?

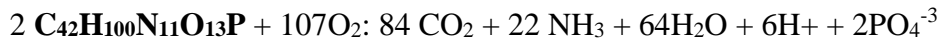
Ampirik moleküler ağırlık: 113

1 g: 0.00885 mol

Bir ampirik hücre molekülü için 5 mol O_2 gerekmektedir.

(0.00885 mol hücre) (5 mol O_2 /mol hücre)(32 g O_2 /mol O_2): 1.42 g.

3. $C_{42}H_{100}N_{11}O_{13}P$ oksidasyon denklemini yazınız?



Ampirik moleküler ağırlık: 997

1 g: 0.00100 mol

Bir ampirik hücre molekülü için 53.5 mol O_2 gerekmektedir.

(0.001 mol hücre)(53.5 mol O_2 /mol hücre)(32 g O_2 /mol O_2): 1.71 g.

Yorum:

2 farklı ampirik formül uygulandığında aynı hücre için tahmin edilen oksijen ihtiyaçları arasındaki büyük farka dikkat ediniz. Yaygın olarak kullanılan ampirik formül $C_5H_7NO_2$ 'dir . Buna rağmen bu formülün geçerliliği çok iyi tespit edilememiştir.

Hücre Yapısı

Bakteri hücreninin fiziksel yapısı şekil olarak (küresel, çubuk, spiral) ve kimyasal yapısını, boyutunu ve büyüme şeklini (tek hücre, koloni, ipliksi) içeren özelliklerine göre sınıflandırılırlar. Şekil ve büyüklük büyüme safhalarıyla değişir. Çubuk bakteri olarak sınıflandırılanlar bazı büyüme koşulları altında küresel olarak belirebilirler ve hücre büyüklüğü büyüme aşamasıyla birlikte değişir. Flamentli gibi normalde bir grup altında bulunan bakteriler de bazı çevre koşulları altında tek hücre olarak büyüyebilir. Tespit etmede kullanılan pekçok metot bakteriyal metabolizmaya, antibiyotiklere karşı dayanıklılığa ve hücre duvarlarının morfolojisinden çok kimyasal karakteristiklerine bağlıdır. Hücrenin strüktürel parçalarının doğası biyolojik uygulamalarla çok fazla ilgilidir. Kirleticilerin uzaklaştırılmasıyla yakından ilişkili olan ve Tablo 4.2.' de verilen en önemli unsurları genetik unsurlar, stoplazmik (hücre) membran, hücre duvarı ve alg veya bakteri tabakası olarak sıralayabiliriz.

Nukleoid ve Plazma:

Bakteriyal hücrenin genetik unsuru basit DNA nuklear strand (daha kompleks olan ökaryotik hücreler çift strand içerir) hücrenin ortasında yer alır, nispeten daha küçük olan ve plazma olarak adlandırılan çevre stoplazmada yer almaktadır. Nuclear strand 1.000 µm uzunluğunda ve 10^9 moleküler ağırlığına sahiptir. Bakteri hücresi 2 µm uzunluğunda veya çapında olduğundan ve nukleer bölge hücrenin küçük parçası olduğundan nuklear strand sıkıca sarılmış olmalıdır. DNA'nın nuclear strandı hücrenin yaşaması için gereklidir. Nuklear DNA'sız enzim üretimi için gerekli olan bilgilerle büyüme için gerekli olan diğer yapılar oluşamaz. DNA'nın zarar görmesi gerekli aktivite kaybına ve ölüme yol açar. Plazma hücre unsurları için genellikle gerekli olmamakla birlikte, verilen çevrede az yada çok rekabet edebilme kabiliyeti sağlar. Bunlar özel antibiyotiklere karşı dayanıklılık, toksin üretimi, olağan dışı unsur ve iyonların metabolizma yeteneği ve bakteriyofaj saldırılara karşı dayanıklılık.

Bakteriyal Büyüme

Büyüme basit olarak mikroorganizma sayısının birim zamanda artışı olarak tanımlanmaktadır. Bakteriler enine esit bölünme ile eş karakterli iki hücreye ayrılarak ürerler. Tek bir hücrenin bölünerek eş hücreler oluşturması koloni olarak bilinir. Belirli türler kendilerine ait koloni şekli oluştururlar ve bu türler için ayırıcı bir karakteristiktir. Bir kolonide bulunan bakteri hücreleri substrat için rekabet halindedirler.

Çoğu bakteri aynı hücreden iki ayrı hücrenin ikili bölünmesiyle çoğalırlar. Örneğin çubuk şeklindeki bakteriler ata hücre kendi ölçülerinde büyür ve orjinal boyutunun iki katında uzar ve iki hücreye ayrılır ve septum olarak adlandırılır. Tek hücreden iki hücrenin oluşması için geçen

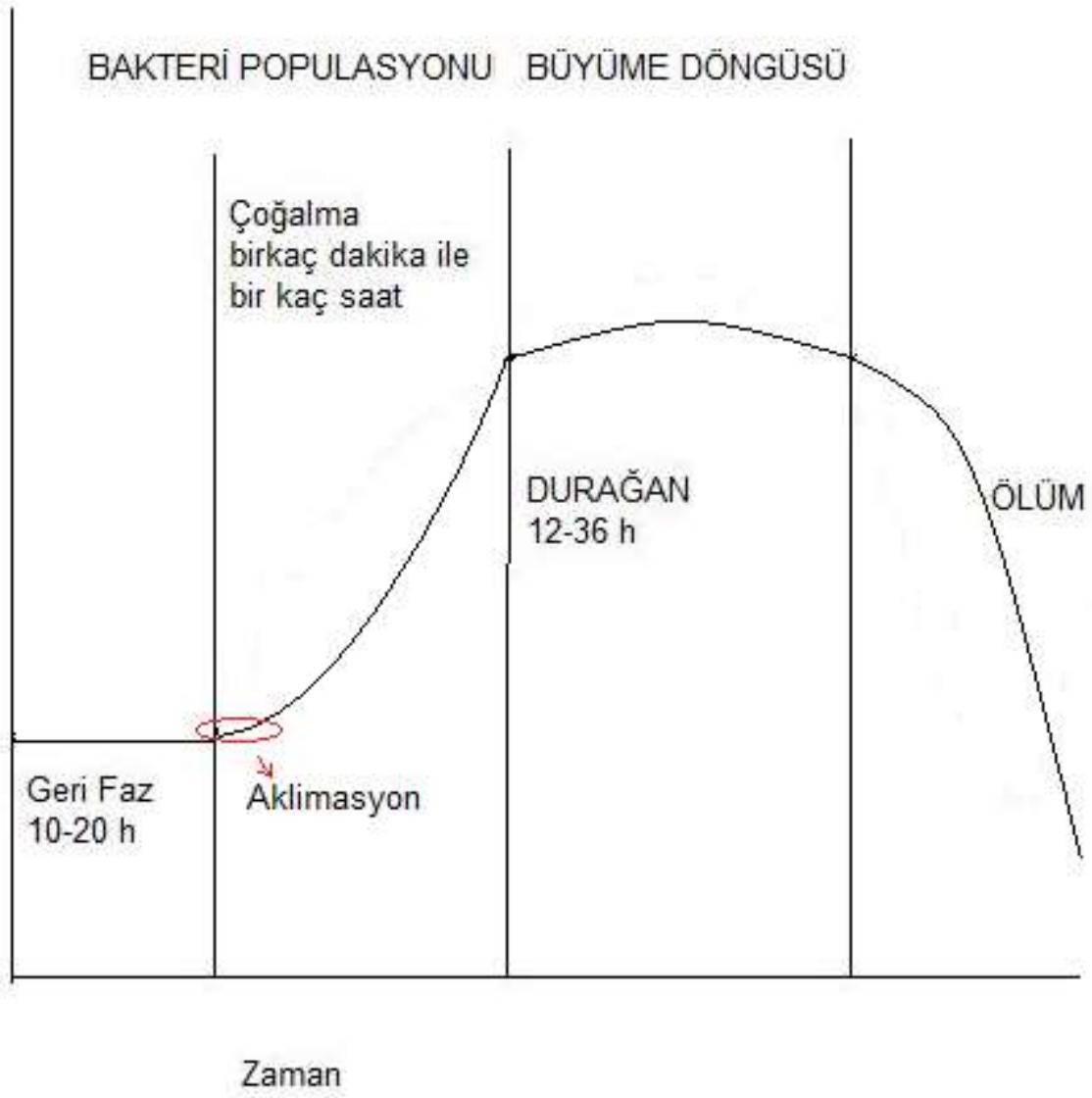
zaman generasyon zamanı olarak adlandırılır. Generasyon zamanı boyunca iki hücreye ihtiyaç olduğundan bu süre çifte zaman olarak da adlandırılır. Generasyon zamanı türe ve büyüme koşullarına bağlıdır. Generasyon zamanı bir kaç dakika ile birkaç saat olabilir. (Tablo 2.4.).

Tablo 2.4. Optimal sıcaklıkta bazı bakterilere ait maksimum kaydedilen büyüme oranları

Organizma	Sıcaklık (C)	Çoğalma zamanı (saat)
<i>Vibrio natrigens</i>	37	0,16
Bacillus stearothermophilus	60	0,14
Esherichia coli	40	0,38
Bacilus subtilis	40	0,43
Pseudomonas putida	30	0,75*
Vibrio marinus	15	1,35
Rhodobacter sphaeroides	30	2,20
Mycobacterium tuberculosis	37	6
Nitrobacter agilis	27	20*

Kaynak: Stainer ve ark., 1986.

* Sentetik ortamda büyüyenler



Geri fazı (Lag phase):

Geri fazı büyüme başlamadan önce bakterinin yeni çevreye alışma zamanını içeren devredir. Geri fazı süresince büyüme oranı neredeyse sıfırdır. Durağan faz süresinde hücrenin steril ortamda aşılması (inokülasyonu) veya farklı besin maddesi içeren ortamda aşılması lag faz içinde 10 ve 20 saat zaman alabilir. Bu fazda geçen zaman süresinde bakteri yeni besin maddelerinin metabolizması için gerekli olan enzimleri sentezlemektedir. Bu sıklıkla özel kirleticilerin parçalama yeteneğindeki kültürü isole etmeye çalışma durumudur. Özel kirleticilerin parçalanması için gerekli olan ve bileşiklerin metabolizmasıyla başlayan zamana acclimation (yeni bir iklime alışma) periyodu denilir. Bu periyot hedef alınan kimyasalın biyolojik parçalanabilirliğine, karbon kaynağına ve mevcut parçalanmış kültüre bağlı olarak yüzlerce gün sürebilmektedir. Bazı durumlarda kimyasalla uzun süre maruz kaldıktan sonra

mikrobiyal enzimler neden olabilir. Yerli populasyonla genetik mutasyon veya değişim enzim sistemi ile birlikte parçalama kültürünün gelişmesi için gerekli olabilir. Aclimation periyodu kelimesi kullanıldığında özel bileşiklerin biyolojik parçalanmasının kastedildiği ve parçalama kültürlerinin kastedilmediğine dikkat ediniz.

Mikrobiyal uyum ve gelişme

Tüm besinler fazla miktarda bulunuyorsa ve gelişme parametreleri optimal düzeyde olduğunda mikroorganizmaların çoğu üst düzeyde gelişme gösterirler. Bununla birlikte bundan önce gelişmenin bir “ geri kalma evresi” olmaktadır, bu arada hücreler yeni çevreye uyum sağlamaktadır. Geri kalma evresinin uzunluğu için nedenler her zaman açık değildir.

Uyum kelimesi genelde biyolojik ayrışmadan önce bir zaman aralığı mevcut olduğunda kullanılır (Wiggins ve Alexander, 1988). Uyum periyodu ayrıştırılacak madde ile farklılık gösterir; genelde anaerobik sistemler aerobik sistemlere göre çok daha uzun zaman aralığı gerektirir (Suflita ve ark. , 1982). Enzim sentezleri çoğunlukla substrat veya benzer molekül mevcut olmadan teşvik edilmez, bu durum uyum periyodu sırasında da meydana gelebilir. Substrat veya gelişme şartlarına önceden adapte edilen hücreler genelde çok kısa bir geri kalma evresi ve uyum dönemine maruz kalırlar. Yüksek kimyasal konsantrasyonlar biyolojik ayrışmadan önceki sürede artış gösterir (Rossin ve ark., 1982). Uyum ayrıca diğer engelleyici (inhibitör) bileşenleri uzaklaştırmak için gerekli zamanı temsil eder ya da onların etkilerine karşı enzim sistemlerini geliştirme süresini de belirtebilir (Atlas ve Bartha, 1972; Wiggins ve ark., 1987).

Biosurfaktanların üretimi için gerekli periyot az çözülebilir materyallerin ayrıştırılması için önemli olabilir ve başlangıçta besin kaynakları rekabetinin ortadan kaldırılması topraklarda önemli olabilir. Gelişmedeki ani azalma genelde besin tükenmesi veya toksik metabolik ürün üretimi sonucu üst düzey büyümeyi takip eder (Hoeppe, 1989). Tabii ki geri kalma ve uyum döneminin nedenlerinde olduğu gibi en yüksek gelişmenin azalması karmaşıktır ve mikrobiyal populasyonlar arasında farklılık gösterir. Yerinde uygulamaların çoğunda uyum dönemi gözlenmemiştir (örneğin Dupont ve ark. 1991 ve Miller ve ark. 1991’e bkz) Belki de bu , arıttımdan önce kirliğe adapte edilmiş olan yeril mikroorganizmaların uyarılması sonucu olabilir.

Mantarlar

Mikroorganizmaların bir diğer farklı grubunu kapsayan mantarlar, organik kirleticilerin biyolojik ayrıştırılmasında aktif rol oynarlar. Bu ökaryotların hepsi heterotroftur, fotosentetik

içsel organelleri yoktur (genelde alglerle simbiyotik ilişkileri bilinirse de) ve çoğunluğu aerobiktir ve yaşam devrelerinin en azından bir bölümünde filamentli bir yapıya sahiptirler. Mayalar da mantarlar içerisinde yer alır, genelde bağımsız hücreler halinde bulunurlar ve eşeysiz bölünme yoluyla çoğalırlar.

Pek çoğu düşük oksijen konsantrasyonu gerektirirse de, mayalar genellikle fakültatif anaeroblar ve fermentetik organizmalar olarak nitelendirilir (Visser ve ark., 1990). Bazı toprak mayaları biyolojik ayrışımı teşvik eder. Bazı mantarlardaki benzersiz enzimler ve ayrıştırma yolları (bakterilerde nadiren bulunur), yabancı bileşiklerin parçalanması için mantarlara faydalı bir potansiyel kazandırır. Basidiomycetes ve deuteromycetes gibi daha gelişmiş mantarlar dirençli bileşiklerin ayrışabilmesinde yegane enzim sistemlerine sahip gibi görünmektedirler. Bazı mantarların sürekli salgıladıkları hücre dışı (ekstraselüler) enzimler, bu organizmalara pek çok bakteri tarafından kolayca etki edilemeyen büyük organik moleküllerin ayrıştırılması imkanını verir.

Bazı koşullarla birlikte doğru olmak kaydıyla, bakterilerin gelişmediği asidik şartlar altında mantarların en iyi işlev gösterdiklerine inanılmaktadır. Bazı mantarlar, özellikle küfler, çok elverişsiz şartlarda bile üreme ve yaşama yeteneği geliştirmişlerdir (Kirk ve ark., 1978). Tersine olarak, sülfat oksitleyen thiobacilli gibi bazı bakteriler, mantarların pek çoğunu engelleyen fazla asit çevreleri tercih etmektedir. Mantarların yüksek çeşitliliği nedeniyle, farklı tipleri gelişme için farklı optimal koşulları uygun görürler. Çok elverişsiz şartlar altında, mantarların pek çoğu çok sayıda oldukça dayanıklı eşeysiz sporlar üretirler ve bunlar uzun süre canlı kalabilir. Kompost oluşum sıcaklığı 45 °C' nin üzerine çıktığında mantarların pek çoğunun gelişimi engellenmektedir.

Fotosentetik mikroorganizmalar

Yüzey toprakları genellikle, fotosentetik prokaryotların (fotosentetik bakteriler ve mavi-yeşil algler) ve ökaryotik alglerin geniş popülasyonlarının varlığını destekler. Işık, toprağın içinde birkaç santimetreden öteye ulaşmaz, böylece onların biyolojik iyileştirimdeki rollerini kısıtlar. Bununla birlikte, özellikle ışığın yokluğunda fotosentetik prokaryotların pek çoğu beslenme için organik substratları kullanır ve böylece bazı organik kirleticiler ayrıştırır.

Gerçek (ökaryotik) alglerin çoğunluğu, organik bileşikleri besin kaynağı olarak kullanmadıkları için biyolojik iyileştirmede çoğunlukla ikincil bir rol oynarlar. Tüm fotosentetik organizmalar alternatif besin kaynakları üretirler ve bu besin kaynakları da yarayışlı besin kaynaklarının kullanan mikroorganizmaların sayısını artırır. Bu organizmalarının varlığı, kolay ayrışabilir kirleticilerin ayrışmasını hızlandırır, fakat daha dirençli kirleticilerin parçalanmasına engel

olabilir. Bazı dirençli bileşiklerin yüzey toprakları ve suda alglerin varlığı yoluyla kısmi fotolitik ayrışması (ön ayrışma) da olasıdır. Algler, besinlerin toprak profillerinin derinliklerine ulaşmasını ve dengelenmesini kontrol ederler, böylece yeraltı sularına aşırı besin akışı önlenmiş olur.

Mikrofauna

Toprak mikrofaunasın da yer alan protozoalar, solucanlar ve böcekler organiklerin ayrıştırılmasında esas olarak dolaylı bir rol oynarlar. Bu organizmalar toprağın biyolojik olarak karışması (bioturbasyon) olayları yoluyla toprak çevresini değiştirebilirler. Bu çeşitli organizmaların aktiviteleri yüzey toprağının havalanmasına, karıştırma yoluyla kirletici konsantrasyonlarının seyrelmesine ve diğer çevresel değişkenlerin farklılaşmasına etken olabilir.

Yakın çevrelerindeki mikroorganizmaların bazı popülasyonlarını teşvik etmelerinden başka, mikrofaunanın pek çoğu predasyonla diğer mikroorganizma popülasyonlarını kontrol edebilir (Wiggins ve ark., 1987). Kirpikli (ciliate) protozoalar önemli mikrobiyal predatörlerdir, fakat diğer mikrofauna üyeleri mikrobiyal beslenme için de önemlidir. Hızlı üreyen mikroorganizmaların bu şekildeki kontrolü birçok biyolojik ayrışma olayında etkisi olan ve yavaş gelişen mikroorganizmaların etken olmasında yardımcı bir faktördür. Ancak protozoaların aşırı beslenme eğilimi özellikle iyileştirici fonksiyonları olan organizmaları da kapsıyorsa kirleticilerin ayrışma oranlarını azaltabilir. Lağım atıklarındaki organik bileşiklerin ayrışması için gerekli olan adaptasyon periyodundan çoğunlukla protozoaların beslenme olayı sorumludur. Lağımdaki protozoa sayıları *cycloheximide* ve *nystatin* gibi protozoa seçici antibiotikler ile kolayca kontrol edilebilir (Wiggins ve Alexander, 1986), fakat bu kontrol topraklarda daha zordur. Ayrıca, kirlenmiş sulara ilave edilen ökaryotik engelleyiciler, bazı bakterilerin gelişmelerinin engellenmesi yoluyla biyolojik ayrışım oranlarını baskı altına alır (Zaidi ve ark. 1989).

Topraktaki Mikroorganizmaların Sayı ve Aktiviteleri

Doğrudan ve dolaylı sayım yöntemleri

Topraktaki mikroorganizmaların esas sayısı, özel bir katı gelişme ortamında gelişen bakteriyel kolonilerin sayıları gibi, çoğunlukla dolaylı bilgilere dayanır ve burada her koloni [koloni meydana getiren birim (CFU)] tek bir hücreyi temsil etme anlamında kullanılır. Ne yazık ki, tüm mikroorganizmaları ve hatta bakterilerin hepsini destekleyen tek bir gelişme ortamı yoktur. Dirençli organiklerin biyolojik ayrışmasında önemli olan bakterilerin pek çoğu oldukça seçici

ve çoğunlukla yapay gelişme ortamında hızlı gelişmeyen organizmalardır. Ayrıca gelişme ortamı, yalnızca izole edilen aerobik heterotrofik popülasyonları toplam bakteriyel sayım için kullanmaktadır ve anaerobik mikroorganizmaların sayıları nadiren değerlendirilir. Anaerobik çevrelerden veya önemli derinliklerde topraklardan örnekleme yapıldığında bu yetersizlik daha önemlidir.

Petrolle kirlenmiş topraklarda hidrokarbon ayrıştırıcılarının mikrobiyal sayısının toplam heterotrof sayısını aşması, bu problemin bir göstergesidir (örneğin, Hinchee ve Arthur, 1991). İlk çalışmalar, toprak derinliğinin artması ile mikropların aktivite ve sayılarında şiddetli azalma olduğunu göstermektedir ve yeryüzünün birkaç metre altında aktivite bulunmamaktadır veya çok azdır (Markovetz, 1971). Ancak plak sayım metodları yerine doğrudan hücre sayımı ile uygulanan son metodlar derin, doymuş ve doymuş olmayan alt toprak katmanlarında çok sayıda aktif mikroorganizma olduğunu göstermektedir (Wilson ve ark., 1983; Balkwill ve Ghiorse, 1985; Ghiorse ve Balkwill, 1985; Bone ve Balkwill, 1988). Hatta 300 m derinliğe kadar aseptik sonda örnekleri yaygın ve çeşitli mikrobiyal popülasyonları göstermiştir (Fredrickson ve ark., 1991a). Yüzeysel mikroorganizmalarının çoğu düşük organik maddeli çevrelerde var olduklarından organiklerce zengin ortamlarda çok iyi gelişmeyebilirler (Wilson ve ark., 1986a). Bu nedenle toprakaltı için yapılacak sayımlarda çok seyreltik gelişme ortamı veya “toprak ekstraktı” plak sayımları için uygun olmaktadır (Ghiorse ve Balkwill 1985).

Floresans yapan florokrom boyalarının doğrudan mikrosopik sayımlarda kullanılması, alt toprak katlarındaki mikrobiyal sayıların saptanmasında oldukça uygundur. En yaygın metodlardan bir tanesi toprak seyreltmelerine, yeraltısuyuna akridinoranj boyası ilavesi yoluyla (toprağın sodyum pirofosfatla işlem görmesinden sonra) yapılan sayımlardır (Ghiorse ve Balkwill, 1983). Bu boya, mikroorganizmaların genetik materyaliyle birleştiği için canlı ve cansız organizmalar birbirinden ayrılabilir. Diğer bir florokrom boya ise DAPI (4', 6'-diamidino-2 – phenylindole) olup bu boya organik madde ile hemen bir kompleks oluşturmayıp sadece canlı hücrelerle bir ışıldam verme eğilimindedir (Porter ve Feig, 1980).

Metabolik aktif ve aktif olmayan hücreleri ayırmaya yönelik bir teknikte, aktif solunum enzimlerine duyarlı olan boya grupları kullanılmaktadır. Örneğin, akridinoranj INT tetrazolium boyası bu amaçla kullanılmaktadır (Zimmerman ve ark, 1978). Örneğin dehidrogenaz enzimi suda çözünür INT'yi hücre içindeki granüllerde çözünmez formazan gruplarına çevirmektedir. Akridinoranjin mavi rengine kontrast olarak kırmızı floresans meydana gelmektedir. Zimmerman ve arkadaşlarının (1978) metodu geliştirilmiş ve yeraltısuyu örnekleme için en iyisi olan bu yöntem King ve Parker(1988) tarafından özetlenmiştir.

Mikrobiyal biyokütlenin dolaylı ölçümleri

Toprak mikroorganizmalarının hücresel bileşenleri için mikrobiyal biyokütle tayinleri de kullanılmaktadır. Fosfolipidler yalnızca hücre membranında bulunan maddelerdir (White ve ark., 1979) ve doğrudan sayım işlemlerinde kullanılabilirler (Balkwill ve ark., 1988). Mikrobiyal biyokütle için diğer bir test yöntemi ise, Adenozin 5¹ -trifosfat (ATP) ölçüleridir (Webster ve ark., 1985).

Bozulmamış Toprak Örneklerindeki Mikrobiyal Sayılar ve Aktiviteleri

Organizmaların canlı olan ve olmayan hücrelerini ayırmak önemli olduğu kadar metabolik olarak aktif olanları da belirlemek önemlidir. Metabolik aktif organizmalar kolay ayrışabilir besin kaynaklarının yüksek konsantrasyonlarını tercih edenler ve etmeyenler olarak gruplandırılabilir. Simojen (Zymogenous) toprak mikroorganizmaları besin maddelerinin varlığına hızlı reaksiyon gösteren organizmalardır ve buna bağlı olarak hızlı bir gelişme gösterirler ve üst toprak profilinde yaygın bir şekilde bulunurlar. Buna karşılık yavaş gelişen mikroorganizmalar, düşük besin konsantrasyonlarında gelişirler ve derin toprak profillerinde daha büyük bir öneme sahiptirler. Yavaş gelişen bu mikroorganizmalara oligotrofik organizmalar denmektedir. Bunlar, besin kaynaklarınca yoksun çevrelerde bulunan tipik organizmalardır. Bu tür mikroorganizmalar belirli bir taksonomik grup oluşturmamaktadırlar. Bu oligotrofik nitelikli mikroorganizmaların çoğu yetersiz besin kaynakları varlığında bile uzun yıllar canlı kalabilirler (Lewis ve Gattie, 1991). Oligotroflar özel kirleticilerin çok düşük konsantrasyonlarını metabolize etmektedirler ve günde 1 mg/L'den daha küçük karbon varlığında bile dayanıklıdırlar. Çünkü oligotroflar toprakların derinliklerinde bulunun baskın gruplardır. Bu organizmalar yerinde biyolojik iyileştirim işlemlerinin teşvik edilmesinde ve çok düşük konsantrasyonlardaki kirleticilerin yeraltı suyundan uzaklaştırılmasında çok önemlidirler. Birçok oligotrof yüksek besin konsantrasyonlarına maruz kaldığında, normal metabolizmasına geri döner (Poindexter, 1981).

Son çalışmalar mikroorganizmaların, özellikle bakterilerin yüzey katmanlarından toprağın çok derinlerine ve ana kayaya kadar büyük rakamlarda yaşamlarını sürdürdüklerini göstermektedirler (Beloin ve ark., 1988; Bone ve Balkwill, 1988; Chapelle ve Lovley, 1990; Hirsch ve Rades-Rohkohl, 1988; Fredrickson ve ark., 1991a, b). Bone ve Balkwill (1988) tarafından özetlendiği gibi sığ aküfer sedimentleri genelde bir gramında 1 milyondan fazla aerobik bakteriyel hücre içerir. Doğrudan ve canlı hücre sayım metodları aerobik bakterileri ortaya çıkarmaya uyarlandığından yüzeyaltı kil tabakalarında en düşük sayıların bulunması şaşırtıcı değildir. Killer üzerindeki sorpsiyondan dolayı hücre izolasyon problemleri de bulunabilir (Beloin ve ark., 1988). Kaba taneli sedimentler, özellikle aküfer bölgesinde yüksek

bakteriyel sayılar gösterme eğilimindedir (Beloin ve ark, 1988), fakat aküfer içerisinde de çeşitlilik düşük olmamaktadır (Bone ve Balkwill, 1988). Oklahoma'da eski bir aküferdeki yüzeyaltı toprakları bir gramında 10^6 ile 10^7 arasında bakteriyel hücre içermektedir. Bu değer bir gramında 10^9 hücre içeren yüzey topraklarından daha düşüktür (Bone ve Balkwill, 1988). Kuzey Almanya'da bir bölgedeki toplam sayımlar karşılaştırıldığında canlı sayısı öncekine göre daha düşük olmak üzere (10^6 'ya karşı) 10^3 ile 10^4 arasında aerobik hücre bulunmuştur.

Yeni açılan kuyularda sediment karışıklığından dolayı sayımlar yüksek çıktığından mikrobiyal örneklemeden önce aynı hizada yeni bir kuyu açılmasına ihti

yaç vardır. Güney Carolina'da 80 milyon yaşındaki bir katmanda, 400 m derinliğindeki sondaj deliğinden yapılan örnekleme mikrobiyolojik değerlendirmeleri, buna benzer çevrelerde büyük mikrobiyal çeşitliliğin varlığını göstermektedir. Bu değerlendirmelerde, bakterilerin 21 farklı fizyolojik grubu izole edilmiştir (Fredrickson ve ark., 1991a). Yerinde "in situ" metabolik oranlar toplam anaerobik profil derinliğinde düşük olmasına rağmen (Chapelle ve Lovley, 1990), bu popülasyonlar organik asitlerin çeşitli gruplarını olduğu kadar tek ya da çift halkalı aromatik bileşiklerin de bir çeşidini ayırtmaya yeteneklidirler (Fredrickson ve ark., 1991a, b).

Kirlenmiş toprakların mikrobiyal sayı ve aktiviteleri

Topraklardaki kirleticiler mikroorganizmaların çeşitliliği ve sayıları üzerine olumlu ya da olumsuz bir etkide bulunabilir. Toprağa petrol ve benzer kirleticili yağlı çamur ve gübre uygulaması, bakteriyel kolonilerde (CFU'lar) önemli bir artış ile sonuçlanmıştır fakat doğrudan sayıdaki rakamla karşılaştırılabilir bir artış değildir (Johnston ve Robinson, 1982). Bu çelişki, birçok bakterinin toprakta hareketsiz durumda bulunduğu ve uygun besin kaynakları yoluyla uyarıldığı şeklinde açıklanmaktadır. Jet yakıtıyla kirlenmiş topraklardaki bakteriyel sayılar, yakındaki kirlenmemiş topraklardakinden 100 ile 1000 kat daha fazladır (Ehrlich ve ark., 1985). Bununla birlikte özellikle kirletici, doğal materyallerle yakından ilişkili olmadığında ya da suda çözünürlüğü yüksek olduğunda şiddetli toksisite bir problem yaratabilir. Bir çok çalışma, sulu ortamda yapılan laboratuvar testlerinde yüksek organizmalarda olduğu gibi mikroorganizmalar üzerinde özel kirleticilerin şiddetli toksisitesinin belirlendiğini göstermektedir (Blum ve Speece, 1991; Donnelly ve ark, 1991; King, 1984; Walker, 1988).

Radioetiketleme ve respirometrik (solunuma dayanan) laboratuvar yöntemleri kullanılarak topraklarda bazı bileşikler için değişim oranları hesaplanmıştır (Sims ve Overcash, 1983) ancak topraklarda kirleticilerin şiddetli ya da kronik toksisitesi üzerine bilgiler yetersizdir.

Toprak organik maddesi ve killer üzerinde sorpsiyon yoluyla kirleticilerin toksik etkilerinde önemli azalma olabilir. Birçok hidrofobik kirleticinin yüksek konsantrasyonları topraklarda biyolojik ayrışım oranlarını engeller gibi görünmektedir. Çünkü mikroorganizmalar organik bileşiklerle etkileşim yeteneğinde değildirler (Miller ve Bartha, 1989) ya da mikroorganizmalara yarayışlı kirleticinin yüzey alanı küçüktür (Fogel ve ark. 1985; Nakahora ve ark., 1977). Üzerinde durulan bir gerçek de, hidrofobik bileşiklerle ağır şekilde kirlenen topraklara suyun kolayca sızması ve mikroorganizmaların çoğunlukla kirletici ile su ara yüzeyinde kolay üremesidir (Efroymson ve Alexander, 1991).

Topraklardaki çözünürlüğü düşük hidrokarbonlu kirleticilerin pek çoğunun yüksek konsantrasyonları biyolojik ayrışım oranlarını düşürmekte ancak ayrıştırıcı mikroorganizmaların metabolik aktivite ya da sayılarını etkilememektedir (Watts ve ark., 1989). Bununla birlikte, su fazında çözülebilir konsantrasyonları yüksek olduğunda ya da çok düşük konsantrasyonlarda hidrofobik bileşiklerin hücre fonksiyonlarına etkisi için aynı durum kabul edilemez. Bir ayrışma ürünü ana bileşikten daha toksik veya daha çözünür ise gizli akut toksisite oluşabilir (Alvarez-Cohen ve McCarty, 1991). Mikroorganizmalara akut toksik potansiyele sahip bir bileşik olan pentaklorofenol, toprağa asetat veya glikoz gibi ilave besin kaynakları eklendiğinde mikroorganizma sayıları üzerine daha az etkilidir. Bununla birlikte, alternatif karbon kaynakları fazla ilave edildiğinde hızlı gelişen bakteriler stimule edilirken, kirleticinin ayrışmasından esas sorumlu olan yavaş gelişen bakterilerin sayıları azalmaktadır. Çevresel şartlar bu türlü değişirken kirletici bileşiklerin biyolojik ayrışımı eşzamanlı olarak engellenebilir. Oligotrafik mikroorganizmaların en yaygın bulunduğu yüzeyaltı toprakları ve aküferlerde ayrışma oranları üzerine en büyük engelleyici etki, besin kaynağı ilavesi olabilmektedir.

Komünite yapısının tayinine yönelik yöntemler

Mikrobiyal komünite yapısı, belirli kültür şartları ile birlikte spesifik antibiotikler ve üreme ortamı kullanılarak tayin edilebilir. Örneğin, bakteriyel kültürlerde mantar üremesini önlemek amacı ile ortama fungizan ilave edilir, mantar oluşumu ve mayaları izole etmek amacı ile streptomisin ve tetrasiklin ilave edilir (Walker ve Colwell, 1976).

Bakteriyel hücre çeperi bileşenleri – muramik asit ve glukozamin- eşit mol miktarlarında fosfolipid denemesi ile ekstrakte edilir (Findlay ve ark., 1983). Çünkü muramik asit sadece bakteriyel hücrelerde bulunduğu ve glukozamin hem bakterilerde hem de mikroökaryotlarda mevcut olduğundan, iki kimyasalın oranı prokaryotun mikröökaryota oranının kaba bir tespitini verir (Balkwill ve ark., 1988). Çevresel örneklerde bakterini spesifik yoğunluk azalımının sayımında genelde seçici zenginleştirme teknikleri kullanılır (Join ve

Sayler, 1987). Bu teknikte, mineral tuzları içeren ve tek bir organik besin kaynağının ilave edildiği katı agar plakları kullanılmaktadır. Bu besi ortamında ilave bir karbon kaynağı olmaksızın mevcut karbon kaynağı kullanılması yoluyla mikroorganizmaların gelişmesi beklenir. Agarın dışında sıvı ortamlar da kullanılabilir ancak mikrobiyal koloniler teker teker izole edilmelidirler.

Mikrobiyal kolonilerin geliştikleri besi ortamından karbon kaynağınca sınırlandırılmış ortama aktarılmasında özel teknikler kullanılır. Şayet bu aktarma sırasında çok sayıda hücre transfer edilecek olursa yanlış değerlendirme yapılabilecek koloniler oluşabilir. Çünkü bu hücreler alternatif bir karbon kaynağı olarak kullanılırlar. Bunun yanısıra yakıtlar gibi karmaşık organik karışımlar kullanıldığında mikrobiyal gelişme spesifik bileşenlerin birkaçına veya sadece birine bağlı olabilir. Ayrıca tek bir karbon kaynağında yapılan üreme sadece kısmi ayrışmadan kaynaklanabilir. Bu nedenle bu teknik, zenginleştirilmiş organiklerin toplam biyolojik ayrışımını saptamak için kullanılamaz. Spesifik alanlarda etiketli $^{14}\text{C}_2$ içeren substrat kullanıldığında tam mineralizasyon $^{14}\text{CO}_2$ ölçümü ile yapılabilir. Etiketleme tekniği sadece mineralizasyon oranının ölçümü için geliştirilmemiştir, aynı zamanda “ kütle dengesi” sağlayabilecek metabolitler ve hücre biyokütlesinin (biomass) içindeki hedef organik bileşen alımı tespitine de yöneliktir (Dobbins ve Pfaender, 1988).

Farklı mikroorganizmaların veya genetik olarak yönetilen bakterinin tespitine yönelik üç değişik çok duyarlı ve çok spesifik teknikler kullanılmaktadır: İmmunofloresansmikroskopisi (Schieman, 1981), DNA deney teknikleri ile nükleik asit melezlemesi (Holben ve ark, 1988), ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) DNA amplifikasyon yöntemi (Saiki ve ark, 1988). İmmunofloresans tekniği rutin bir biçimde membran filtrelerinde yerleşen özel mikroorganizmaların tespitinde kullanılır. İzole edilen mikroorganizmalar fluorescein renklendirmesine tabi tutulur, bunlar sadece spesifik hücre yüzeyinde antijen oluşturucu olarak bağlanan spesifik antikorlara (monoklonal veya polyclona) tutunmuşlardır (Galfre ve Milstein, 1981). Bu mikroorganizmalar gösterdikleri floresans özelliğinden dolayı ayrılabilirler. Etiketli DNA kullanılan DNA örnekleri ile toprak mikro-ortamında (Holben ve ark., 1988), taban suyunda (Join ve ark., 1987) ve PCB ile kirlenen toprak çevrelerinde (Walia ve ark., 1990) belirli ayrışım yoğunluklarının tespitinde kullanılır. Bu teknikler topraklar ve diğer matrislerde de iyi bir biçimde kullanılsa da biyolojik ayrışım deneyleri ile DNA örneklerinin kombine edilmesi önerilir (Walra ve ark., 1990).