

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ORGANİK VE İNORGANİK KİRLETİCİLERİN BİYOLOJİK GİDERİMİNDE  
KARIŞIK MİKROBİYAL KÜLTÜR KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

Ayşe İrem GÜNDÜZ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA  
2024

Her hakkı saklıdır

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### ORGANİK VE İNORGANİK KİRLETİCİLERİN BİYOLOJİK GİDERİMİNDE KARIŞIK MİKROBİYAL KÜLTÜR KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

Ayşe İrem GÜNDÜZ

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nur KOÇBERBER KILIÇ

Ankara'daki Çubuk Çayı Gümüşdere Mahallesi noktasından alınan su örnekleri, organik kirleticisi Setazol Navy Blue SBG (SNB) ve inorganik kirleticisi Cr(VI) veya Ni(II)'e dirençli karışık bir mikrobiyal kültür elde edilmek üzere kullanılmıştır. Bu kültür daha sonra SNB ve Cr(VI) veya Ni(II)'in biyogiderimini amaçlayan deneylerde kullanılmıştır. Karışık kültürün boya içeren ortamda, Cr(VI) giderimi yaptığı, bununla birlikte Ni(II)'i uzaklaştıramadığı görülmüştür. En yüksek kirleticisi giderim etkinliği için optimum koşullar araştırılmıştır. Sonuçlar, Cr(VI) için %96.3 ve SNB boyası için %78.5 giderim oranlarıyla en etkili biyogiderimin pH 8'de gerçekleştiğini göstermiştir. Yedi günlük inkübasyon süresinin ardından, 50.4 mg/L SNB ve 9.7 mg/L Cr(VI) içeren ortamda, giderim verimleri, SNB boyası için %87.3 ve Cr(VI) için %96.6 olmuştur. En yüksek biyolojik giderim kapasitesi, 50 mg/L SNB boya ve 25 mg/L Cr(VI) içeren ortamda %8'lik (v/v) karışık kültür biyokütle konsantrasyonunda gözlenmiş ve her iki kirleticisi için %100'lük bir giderim verimi elde edilmiştir. En yüksek biyoremediasyon kapasitesine sahip bakteriler, 16S rDNA gen dizisi analizi yoluyla *Microbacterium oxydans* ve *Leucobacter aridicollis* olarak tanımlanmıştır. Potansiyel biyoremediasyon mekanizmaları, mikroorganizmaların FTIR spektrumları analiz edilerek, çeşitli fonksiyonel gruplara ve ilgili yapılara odaklanılarak araştırılmıştır. Bu çalışma ile elde edilen mikroorganizmaların, atıksuların biyoremediasyonunda, çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda ve biyolojik arıtım sistemlerinde kullanım potansiyeline sahip, ülkemizde bulunan akarsulardan izole edilmiş yerli, güvenli, ucuz ve etkin biyosorbentler olarak kullanılabilecekleri ortaya konulmuştur.

Mayıs 2024, 64 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Boyar madde, ağır metal, biyolojik arıtım, karışık kültür, saf kültür

## ABSTRACT

Master's Thesis

### INVESTIGATION OF MIXED MICROBIAL CULTURE USAGE IN BIOLOGICAL TREATMENT OF ORGANIC AND INORGANIC POLLUTANTS

Ayşe İrem GÜNDÜZ

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nur KOÇBERBER KILIÇ

Water samples collected from the Çubuk Çayı Gümüşdere neighborhood in Ankara were used to obtain a mixed microbial culture resistant to both the organic pollutant Setazol® Navy Blue SBG (SNB) and inorganic pollutant Cr(VI) or Ni(II). This culture was subsequently used in experiments aimed at bioremoval of SNB and Cr(VI) or Ni(II). It was observed that the mixed culture removed Cr(VI) but could not remove Ni(II) in the dye-containing medium. The optimal conditions for achieving the highest pollutant removal efficiency were investigated. The results showed that the most effective bioremoval occurred at pH 8, with removal rates of 96.3% for Cr(VI) and 78.5% for SNB dye. In medium containing 50.4 mg/L SNB and 9.7 mg/L Cr(VI), removal efficiencies after a 7-day incubation period were 87.3% for SNB dye and 96.6% for Cr(VI). The highest bioremoval capacity was observed at a mixed culture biomass concentration of 8% (v/v) in the medium containing 50 mg/L SNB dye and 25 mg/L Cr(VI), giving a removal efficiency of 100% for both pollutants. Through 16S rDNA gene sequence analysis, the bacteria with the highest bioremediation capacity were identified as *Microbacterium oxydans* and *Leucobacter aridicollis*. Potential bioremediation mechanisms were investigated by analyzing FTIR spectra of microorganisms, focusing on various functional groups and related structures. It has been revealed that the microorganisms obtained from this study can be used as local, safe, cheap, and effective biosorbents isolated from the streams in our country, which have the potential to be used in the bioremediation of wastewater, various biotechnological applications, and biological treatment systems.

**May 2024, 64 pages**

**Key Words:** Dye, heavy metal, biological treatment, mixed culture, pure culture

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince eşsiz bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, fikirleri ve ışığı ile yolumu aydınlatan, yardım ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve çalışmalarına katkı sağlayan, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım kıymetli danışman hocam Sayın **Prof. Dr. Nur Koçberber KILIÇ**'a (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı),

Tez çalışmam için bilimsel desteğini esirgemeyen, göstermiş olduğu anlayış ve yardımlarından dolayı saygıdeğer hocam Sayın **Prof. Dr. Filiz KORKMAZ**'a (Atılım Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Fizik Anabilim Dalı),

Laboratuvar çalışmalarım sırasında destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli laboratuvar arkadaşlarım **Esra ERKOÇ** ve **Seda ŞEN**'e,

Tüm eğitim hayatım boyunca her zaman bana destek olan ve her koşulda yanımda olan değerli ailem; annem **Mehtap NURCAN**'a, babam **Murat NURCAN**'a, kız kardeşim **Elif Sercen NURCAN**'a ve hayat arkadaşım, değerli eşim **Özgür GÜNDÜZ**'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, “Organik ve İnorganik Kirleticilerin Biyolojik Gideriminde Karışık Mikrobiyal Kültür Kullanımının Araştırılması” konulu proje olarak Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (Proje No: FYL-2023-2873) tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden ötürü Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Ayşe İrem GÜNDÜZ  
Ankara, Mayıs 2024

## İÇİNDEKİLER

### TEZ ONAY SAYFASI

|                                                                                       |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ETİK.....                                                                             | i    |
| ÖZET.....                                                                             | ii   |
| ABSTRACT .....                                                                        | iii  |
| TEŞEKKÜR .....                                                                        | iv   |
| SİMGELER DİZİNİ .....                                                                 | vii  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                                 | viii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                               | ix   |
| 1. GİRİŞ .....                                                                        | 1    |
| 2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ .....                                         | 2    |
| 2.1 Atıksular.....                                                                    | 2    |
| 2.2 Tekstil Boyarmaddeleri.....                                                       | 2    |
| 2.2.1 Tekstil boyarmaddelerinin çevre ve insan sağlığına etkileri .....               | 6    |
| 2.3 Ağır Metaller.....                                                                | 8    |
| 2.3.1 Ağır metallerin çevre ve insan sağlığına etkileri .....                         | 8    |
| 2.4 Atıksulardan Ağır Metal ve Boyarmaddelerin Arıtımı.....                           | 10   |
| 2.4.1 Biyolojik yöntemler .....                                                       | 15   |
| 2.4.2 Mikroorganizmalar ile yapılan biyoremediasyon çalışmaları .....                 | 17   |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM .....                                                           | 20   |
| 3.1 Materyal.....                                                                     | 20   |
| 3.1.1 Mikroorganizma ve gelişme koşulları .....                                       | 20   |
| 3.1.2 Setazol® Navy Blue SBG (SNB) boya stok solüsyonunun hazırlanması .....          | 20   |
| 3.1.3 Metal stok solüsyonlarının hazırlanması .....                                   | 21   |
| 3.2 Yöntem .....                                                                      | 21   |
| 3.2.1 Karışık bakteriyel kültür üretimi .....                                         | 21   |
| 3.2.2 Başlangıç pH değerinin SNB ve ağır metal biyogiderimine etkisi.....             | 22   |
| 3.2.3 Başlangıç SNB konsantrasyonunun Cr(VI) biyogiderimine etkisi.....               | 22   |
| 3.2.4 Başlangıç Cr(VI) konsantrasyonunun SNB biyogiderimine etkisi.....               | 23   |
| 3.2.5 Başlangıç biyokütle konsantrasyonunun SNB ve Cr(VI) biyogiderimine etkisi ..... | 23   |

|                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.6 SNB ve ağır metal biyogiderimi yapan karışık bakteriyel kültürden saf bakteriyel kültürlerin izolasyonu .....        | 23 |
| 3.2.7 Saf kültürlerin SNB ve ağır metal biyogiderim kapasitelerinin belirlenmesi                                           | 24 |
| 3.2.8 Saf bakteriyel kültürlerin tanılanması .....                                                                         | 24 |
| 3.2.9 Saf bakteriyel kültürlerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi.....                                           | 25 |
| 3.2.10 FTIR analizi (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) .....                                                    | 25 |
| 3.3 Analiz Yöntemleri.....                                                                                                 | 27 |
| 3.3.1 Optik yoğunluğun (OD) belirlenmesi .....                                                                             | 27 |
| 3.3.2 Cr(VI) analizi.....                                                                                                  | 27 |
| 3.3.3 Nikel(II) analizi .....                                                                                              | 28 |
| 3.3.4 SNB analizi.....                                                                                                     | 28 |
| 3.3.5 Biyogiderim veriminin hesaplanması ve kullanılan kısaltmalar .....                                                   | 29 |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....                                                                                               | 30 |
| 4.1 Karışık Bakteriyel Kültürün Ağır Metal ve SNB Biyogiderimi.....                                                        | 30 |
| 4.2 Başlangıç pH Değerinin Karışık Bakteriyel Kültürün İkili Kirletici Biyogiderim Kapasitesine Etkisi .....               | 31 |
| 4.3 Artan SNB Konsantrasyonunun Karışık Bakteriyel Kültürün İkili Kirletici Biyogiderim Kapasitesine Etkisi .....          | 32 |
| 4.4 Artan Cr(VI) Konsantrasyonunun Karışık Bakteriyel Kültürün İkili Kirletici Biyogiderim Kapasitesine Etkisi .....       | 33 |
| 4.5 Artan Biyokütle Konsantrasyonlarının Karışık Bakteriyel Kültürün İkili Kirletici Biyogiderim Kapasitesine Etkisi ..... | 34 |
| 4.6 Karışık Bakteriyel Kültürden İzole Edilen Saf Kültürler ile Yapılan İkili Kirletici Biyogiderim Çalışmaları.....       | 37 |
| 4.7 <i>M. oxydans</i> ve <i>L. aridicollis</i> Suşlarının FTIR Analizi.....                                                | 41 |
| 4.8 <i>M. oxydans</i> ve <i>L. aridicollis</i> SEM Analizi .....                                                           | 47 |
| 5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....                                                                                                 | 49 |
| KAYNAKLAR.....                                                                                                             | 55 |
| ÖZGEÇMİŞ.....                                                                                                              | 64 |

## SİMGELER DİZİNİ

|                                               |                                               |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| %                                             | Yüzde                                         |
| %B                                            | Yüzde biyogiderim                             |
| °C                                            | Santigrat derece                              |
| C <sub>0</sub>                                | Başlangıç kirletici konsantrasyonu (mg/L)     |
| C <sub>f</sub>                                | Ortamda kalan kirletici konsantrasyonu (mg/L) |
| Cr(VI)                                        | Hekzavalent krom                              |
| EtOH                                          | Etanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O)      |
| g                                             | Gram                                          |
| HCl                                           | Hidroklorik asit                              |
| K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> | Potasyum Dikromat                             |
| L                                             | Litre                                         |
| mg                                            | Miligram                                      |
| ml                                            | Mililitre                                     |
| NaOH                                          | Sodyum hidroksit                              |
| Ni(II)                                        | Nikel katyonu                                 |
| NiSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O          | Nikel(II) sülfat                              |
| q <sub>m</sub>                                | Maksimum spesifik kirletici giderimi (mg/g)   |
| rpm                                           | Dakikada devir sayısı                         |
| X <sub>m</sub>                                | Mikroorganizmaların kuru ağırlığı (g/L)       |

## Kısaltmalar

|      |                                               |
|------|-----------------------------------------------|
| FTIR | Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre |
| OD   | Optik yoğunluk                                |
| SNB  | Setazol® Navy Blue SBG boya                   |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1 Azo boya grubundan 4-Hidroksiazobenzen (Solvent Yellow-7)'in yapısal bileşenleri (Gürses vd. 2016) .....                                                                              | 3  |
| Şekil 2.2 Kirletici giderim yöntemlerinin sınıflandırılması ve ilgili tekniklere ait örnekler (Crini ve Lichtfouse 2019).....                                                                   | 11 |
| Şekil 2.3 Biyoremediasyon teknikleri (Vidali 2001) .....                                                                                                                                        | 16 |
| Şekil 2.4 Biyosorpsiyon mekanizmaları (Jena vd. 2022).....                                                                                                                                      | 17 |
| Şekil 3.1 Fourier transform spektrofotometre cihazı şeması (Beşergil 2015) .....                                                                                                                | 27 |
| Şekil 4.1 Artan boya konsantrasyonunun karışık mikrobiyal kültürün Cr(VI) ve SNB biyogiderim kapasitesine etkisi.....                                                                           | 32 |
| Şekil 4.2 Artan Cr(VI) konsantrasyonunun karışık mikrobiyal kültürün Cr(VI) ve SNB biyogiderim kapasitesine etkisi .....                                                                        | 34 |
| Şekil 4.3 Artan biyokütle konsantrasyonunun 50 mg/L SNB ve 25 mg/L Cr(VI) içeren ortamda karışık mikrobiyal kültürün biyogiderim kapasitesine etkisi.....                                       | 36 |
| Şekil 4.4 Karışık mikrobiyal kültürden elde edilen saf kültürlerin Cr(VI) ve SNB içeren besiyerlerindeki biyogiderim kapasiteleri .....                                                         | 37 |
| Şekil 4.5 <i>M. oxydans</i> OR127276 ve <i>L. aridicollis</i> OR127277 filogenetik ağacı.....                                                                                                   | 38 |
| Şekil 4.6 Sabit Cr(VI) başlangıç konsantrasyonuna sahip ve artan konsantrasyonlarda SNB içeren besiyerlerinde <i>M. oxydans</i> ve <i>L. aridicollis</i> suşlarının biyogiderim kapasitesi..... | 40 |
| Şekil 4.7 14.4 mg/L Cr(VI) ve 26.1 mg/L SNB içeren ve kirletici içermeyen besiyerinde geliştirilen <i>M. oxydans</i> 'ın FTIR spektrumları .....                                                | 42 |
| Şekil 4.8 14.4 mg/L Cr(VI) ve 26.1 mg/L SNB içeren ve kirletici içermeyen besiyerinde geliştirilen <i>L. aridicollis</i> 'in FTIR spektrumları.....                                             | 43 |
| Şekil 4.9 <i>M. oxydans</i> 'ın kirletici içermeyen ve içeren ortamdaki hücre boyutu ve SEM görüntüsü.....                                                                                      | 47 |
| Şekil 4.10 <i>L. aridicollis</i> 'in kirletici içermeyen ve içeren ortamdaki hücre boyutu ve SEM görüntüsü .....                                                                                | 48 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 2.1 Kimyasal yapılarına göre başlıca boya türleri .....                                                                             | 4  |
| Çizelge 2.2 Tekstil boyarmaddelerinin insan, bitki ve hayvanlardaki toksik etkileri.....                                                    | 7  |
| Çizelge 2.3 Ağır metallerin insan, bitki ve hayvanlardaki toksik etkileri .....                                                             | 9  |
| Çizelge 2.4 Önemli atıksu arıtım yöntemlerinin sahip olduğu avantajlar ve dezavantajlar.....                                                | 12 |
| Çizelge 3.1 Nutrient Broth (NB) ve Nutrient Agar (NA) besiyeri bileşimi .....                                                               | 20 |
| Çizelge 4.1 Karışık mikrobiyal kültürün ağır metal (Cr(VI) ve Ni(II)) ve SNB biyogiderim değerleri .....                                    | 31 |
| Çizelge 4.2 Başlangıç pH değerlerinin karışık mikrobiyal kültürün Cr(VI) ve SNB boya biyogiderim verimi üzerindeki etkisi.....              | 30 |
| Çizelge 4.3 Artan boya konsantrasyonlarında <i>M. oxydans</i> ve <i>L. aridicollis</i> 'in maksimum spesifik SNB ve Cr(VI) giderimleri..... | 39 |
| Çizelge 4.4 Pik alanı hesaplama sonuçları.....                                                                                              | 42 |

## 1. GİRİŞ

Günümüzde artan küresel nüfus, devam eden endüstriyel gelişme ve değişen iklim koşulları, dünyadaki ekosistemlerin bozulmasına, çevresel kirliliğe ve su kaynaklarının tahribatına sebep olmaktadır. Ticari ve endüstriyel süreçlerden kaynaklanan boya ve ağır metal içeren atıksuların verimli bir şekilde arıtılması gerekmektedir. Bu kirleticiler kimyasal, fiziksel ve biyolojik yöntemlerle giderilebilmektedir. Geleneksel olarak fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılsa da biyolojik arıtım son zamanlarda çok daha düşük maliyetli ve etkili bir çözüm olarak ilgi görmektedir (Singh vd. 2022). Biyolojik arıtım, kirletici gideriminde toksik maddelere dirençli ve farklı mikroorganizmaların kullanıldığı biyoremediasyonu temel almaktadır. Farklı kirleticiler içeren atıksuların arıtımında ucuz, çevre dostu ve ekonomik bir çözüm olan biyoremediasyon, en etkin yol olarak karşımıza çıkmaktadır. (Kant 2012, Pande vd. 2020).

Gerçekleştirilen tez çalışmasında, Çubuk Çayı (Keçiören, Ankara) Gümüşdere Mahallesi noktasından alınan su örnekleri kullanılarak elde edilen karışık bakteriyel kültürün, Setazol® Navy Blue SBG (SNB) boya ve Cr(VI) ağır metal biyoremediasyonu araştırılmıştır. Karışık kültürün en yüksek kapasite ile giderim yaptığı optimum koşullar belirlenmiştir. Karışık kültürden saf kültürler de izole edilerek, biyolojik arıtım kapasiteleri karşılaştırılmış, en yüksek biyoremediasyon kapasitesine sahip bakteriler tanımlanmış ve bu mikroorganizmaların kirletici gideriminde rol alan fonksiyonel grupları FTIR analizi ile belirlenmiştir. Bu tez çalışmasıyla, boyar madde ve ağır metali birlikte içeren ortamlarda kirletici gideriminde etkin verime sahip karışık bakteriyel kültür elde edilmiş ve bu kültürden izole edilen saf bakterilerden en etkin biyoremediasyon kabiliyetine sahip olanlar 16S rDNA analizine göre *M. oxydans* ve *L. aridicollis* olarak tanımlanmıştır. FTIR analizlerine göre, bakterilerin kirletici içeren ve içermeyen ortamlardaki toksik maddelere karşı mikrobiyal direnç mekanizmalarının farklı yollarla olduğu görülmüştür. Bu yüksek lisans tezi ile, ülkemizde bulunan akarsulardan elde edilmiş karışık bakteriyel kültürün ve bu karışık kültürden izole edilen saf bakterilerin biyolojik arıtım sistemlerine entegre edilebilir, güvenli, uygun maliyetli ve etkin biyosorbentler olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.

## **2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ**

### **2.1 Atıksular**

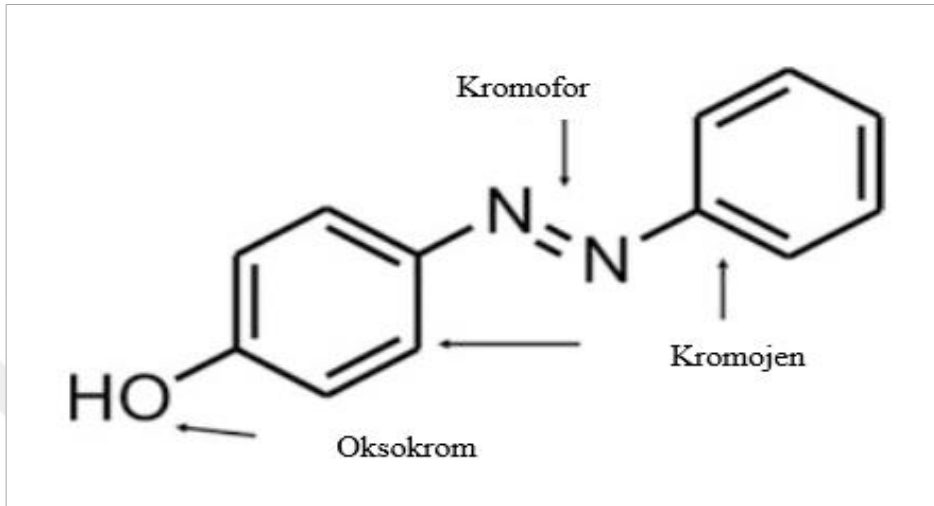
Endüstriyel, tarımsal, evsel ve ticari süreçler dahil olmak üzere çeşitli insan faaliyetleri neticesinde ortaya çıkan ağır metaller, patojenler, sentetik kimyasallar ve farmasötik maddeler gibi birçok çeşitli kirleticileri içeren atıksular, gün geçtikçe ekosistemlere daha çok zarar vermekte ve insan sağlığı için ciddi bir risk oluşturmaktadır (Haripriyan vd. 2022, Dutta vd. 2024). Endüstriler genişlemeye ve gelişmeye devam ettikçe, oluşan atıksularda bulunan kirleticilerin hacmi ve karmaşıklığı artmakta ve bu durum bunların çevre üzerindeki olumsuz etkilerini azaltma zorluğunu daha da artırmaktadır. Genellikle nehirler, göller, denizler ve okyanuslar gibi doğal su kütlelerine deşarj edilen atıksular, temiz su kaynaklarının kullanılabilirliğini tehlikeye atmakta, biyolojik çeşitliliği bozmakta ve toksikolojik etkileri sebebi ile önemli bir çevre ve sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir (Kishor vd. 2021, Dutta vd. 2021).

Gıda, enerji, kimya, ilaç, elektronik, madencilik endüstrileri başta olmak üzere birçok farklı endüstri, faaliyetleri ve süreçlerinin doğası gereği ciddi miktarlarda atıksu üretmektedir (Birleşmiş Milletler Su Raporu 2017). Bununla birlikte, tekstil endüstrisi önemli miktarlarda su tüketimi ve yoğunluklu olarak ağır metaller, toksik boyalar ve kimyasal maddeler gibi çeşitli kirleticiler içeren atıksular oluşturmaları nedeniyle küresel olarak su kirliliğine en büyük katkıda bulunan sektörlerden biri olarak öne çıkmaktadır (Kishor vd. 2021).

### **2.2 Tekstil Boyarmaddeleri**

Boyalar genellikle uygulandıkları substrat üzerinde fiziksel ve/veya kimyasal bağlanma yoluyla renk verebilen maddelerdir. Boya moleküllerinin iki temel bileşeni kromofor ve oksokromdur (Şekil 2.1). Atomik gruptan oluşan ve renk üretmekle sorumlu olan kromoforlar, oksokromun taşıdığı farklı fonksiyonel gruplar sayesinde (karboksilik asit (-COOH), sülfonik asit (-SO<sub>3</sub>H), amino (-NH<sub>2</sub>) ve hidroksil (-OH) grupları gibi) suda

çözünürlük ve afinite güçlenmesi kazanabilirler (Hunger 2007, Pereira ve Alves 2012). Oksokrom ve kromoforlar arasındaki sinerjik etkileşim sayesinde, renk yoğunluğu ve tonunda ince değişimler elde edilebilir ve bir malzemenin nihai renklendirmesi üzerinde hassas kontrol sağlanabilir (Gürses vd. 2016).

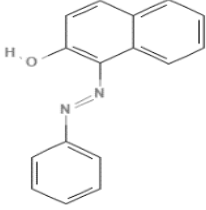
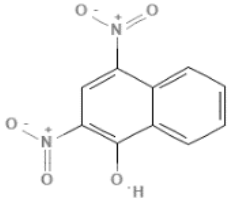
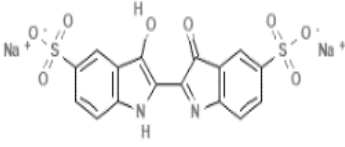
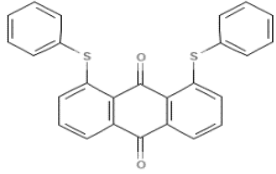
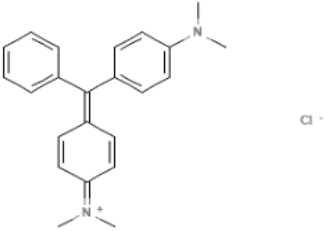
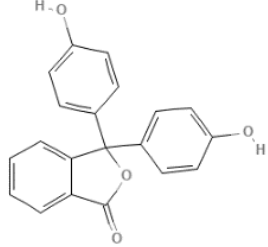
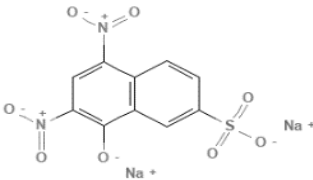
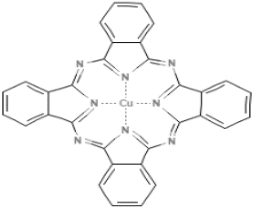


Şekil 2.1 Azo boya grubundan 4-Hidroksiazobenzen (Solvent Yellow-7)'in yapısal bileşenleri (Gürses vd. 2016)

Çok çeşitli organik bileşiklerden oluşan tekstil boyarmaddeleri, iplik, lif ve kumaş gibi tekstil malzemelerini renklendirmek ve parlatmak için kullanılmaktadır. Bu boyarmaddeler sahip oldukları kimyasal yapılarına, uygulama yöntemine ve çözünürlüklerine göre sınıflandırılır (Gregory 1990).

Boyarmaddeler kimyasal yapılarına göre sınıflandırıldığında; azo, nitro ve nitrozo, indigo, antrakinin, trifenilmetan, fitaleyn, ftalosiyenin ve boyama özelliklerine göre sınıflandırıldığında; reaktif, dispers, direkt, mordan, pigment, vat, metal-kompleks, asit (anyonik), bazik (katyonik) olarak tanımlanmaktadır (Gürses vd. 2016, Kumar 2021). Önemli başlıca boya türlerine ait örnekler ve kimyasal yapıları çizelge 1.1'de yer almaktadır.

Çizelge 2.1 Kimyasal yapılarına göre başlıca boya türleri (PubChem 2024)

| Kimyasal Yapısına Göre Boya Türleri |                                                                                                                                  |              |                                                                                                                                       |
|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Azo                                 |  <p>Solvent Yellow 14<br/>(Sudan I)</p>         | Nitro        |  <p>Acid Yellow 24<br/>(Martius Yellow)</p>        |
| İndigo                              |  <p>Acid Blue 74<br/>(Indigo carmine)</p>       | Antrakinon   |  <p>Solvent Yellow 163</p>                        |
| Trifenilmetan                       |  <p>Malachite Green<br/>(Basic Green 4)</p>   | Fitaleyn     |  <p>Phenolphthalein</p>                          |
| Nitrozo                             |  <p>Naphthol Yellow S<br/>(Acid Yellow 1)</p> | Ftalosiyanin |  <p>Bermuda Blue<br/>(Copper phthalocyanine)</p> |

Sınıflandırma açısından tekstil boya maddeleri, her biri benzersiz özelliklere ve uygulamalara sahip olan çok çeşitli bileşiklerden oluşur. Bu bileşiklerin kimyasal yapıları genellikle aromatik halkalar, konjuge sistemler ve spesifik renk özellikleri veren fonksiyonel gruplar içermektedir (Benkhaya vd. 2022).

Azo boyaların yapısı bir veya daha fazla aromatik halkaya bağlı bir veya daha fazla azo bağından ( $-N=N-$ ) oluşur. Tekstil endüstrisi tarafından kullanılan tüm reaktif boyaların yaklaşık %60'ı azo boyalardır (Gürses vd. 2016, Benkhaya vd. 2020). Ağırlıklı olarak tekstil liflerinin, özellikle pamuk, aynı zamanda ipek, yün, viskon ve deri, plastik ve kağıt gibi sentetik liflerin boyanmasında kullanılırlar. Genel olarak azo boyalar oldukça dayanıklıdır ve sağlam kimyasal yapıları nedeniyle hızla bozunmazlar (Benkhaya vd. 2020).

Reaktif boyalar, tekstil endüstrisinde pamuk, yün, ipek, viskon gibi doğal elyafların boyanmasında yaygın olarak kullanılan bir sentetik boya sınıfıdır. Parlak ve canlı renkler sağlayan bu boyalar, sahip oldukları reaktif grup sayesinde liflerin yüzeyindeki hidroksil ( $-OH$ ) grupları ile reaksiyona girerek güçlü bir kovalent bağ oluştururlar (Clark 2011, Lewis 2014). Optimal renk fiksasyonu için yüksek sıcaklık, alkali ve tuz içeren uzun süreli banyo ve yıkama işlemi gerektirdikleri için, reaktif boya ve diğer yardımcı kimyasalları içeren atıksuların verimli bir şekilde arıtımı hem çevre hem de insan sağlığı için önemlidir (Clark 2011, Benkhaya vd. 2020).

Direkt boyalar, doğrudan tekstile uygulanabilen bir sentetik boya grubudur. Genellikle yapısında aromatik bir kromofor ve kromofora bağlı sülfonik asit grup bulunmaktadır. Direkt boyalardaki kromoforlar azo, stilben, oksazin ve ftalosiyanın türevlerini içerir. Suda çözünabilen yapıları ve geniş renk yelpazesi sayesinde uygulama kolaylığı sağlarlar (Clark 2011).

Tekstil endüstrisinde birçok farklı boyama ve yıkama işleminde, boyarmaddelerin yanı sıra sıklıkla asetik asit, sodyum hidroksit, sülfürik asit, hidrojen peroksit gibi yardımcı kimyasallar da kullanılmaktadır (Gürses vd. 2016, Benkhaya vd. 2022). Bununla birlikte tekstil boya maddeleri, kompleks kimyasal bileşimleri ve potansiyel toksisiteleri

nedeniyle alıcı ortama direkt deşarj edildiğinde su, toprak ve hava dahil olmak üzere çeşitli çevresel bileşenlerde kirlilik yaratmaktadır (Lellis vd. 2019, Al-Tohamy vd. 2022).

### **2.2.1 Tekstil boyarmaddelerinin çevre ve insan sağlığına etkileri**

Tekstil endüstrisinde kullanılan boyarmaddelerin ve diğer çeşitli kimyasalların ksenobiyotik doğası, kimyasal yapısı, yüksek termal direnci ve fotostabilitesi nedeniyle biyolojik olarak parçalanması zordur (Lellis vd. 2019). Yüzey suları, yer altı suları, hava ve toprağa karışan bu kirleticiler, doğrudan ve dolaylı olarak flora ve faunada ekolojik dengenin bozulmasına sebep olmaktadır (Akhtar vd. 2021, Islam vd. 2023).

Boyama ve terbiye işlemleri esnasında kumaş veya liflere tutunamayan boyaları da içeren atıksular, yüksek pH seviyesine sahip bir şekilde deşarj edildiğinde, atıksularda yer alan boyarmaddeler, suyun rengini ve şeffaflığını değiştirmekte, güneş ışığını keserek su kaynaklarının kalitesini düşürerek biyolojik aktivitesini bozmaktadırlar. Bu nedenle, arıtılmamış veya tam olarak arıtılmamış tekstil atıksuları, doğal ekosistemi olumsuz etkileyerek hem sudaki hem de karadaki yaşam için sorunlara sebep olmaktadır (Khan vd. 2014, Al-Tohamy vd. 2022).

Birçok azo boyarmaddesinin ve ara ürünlerinin (aromatik aminler) toksik etkiye sahip olduğu, bu boyarmaddeleri içeren atıksulara maruz kalma ve boya konsantrasyonuna bağlı olarak insanlar üzerinde akut ve kronik mutajenik etkiler gösterdiği kanıtlanmıştır (Chung, 2016, Islam vd. 2023).

Tekstil endüstrisi atıklarında bulunan ağır metaller biyolojik olarak parçalanamaz; dolayısıyla vücudun ana organlarında birikirler ve zamanla iltihaplanarak çeşitli hastalık belirtilerine yol açarlar ve bu durum insan sağlığı açısından önemli riskler oluşturur (Solayman vd. 2023, Dutta vd. 2024). Yapılan çalışmalarda, birçok farklı boyarmadde çeşidinin insanlarda, bitki ve hayvanlarda genotoksik, kanserojen ve nörotoksik etkiler gösterdiği ortaya konmuştur (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2 Tekstil boyarmaddelerinin insan, bitki ve hayvanlardaki toksik etkileri (Saxena ve Gupta 2020)

| <u>Boya Türü</u>                                                | <u>Uygulama Türü</u>                                           | <u>Canlı Türü</u>     | <u>Etki Türü</u>                                                                                                                                                                                                 | <u>Kaynakça</u>                       |
|-----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Kongo Kırmızısı                                                 | Pamuk boyama                                                   | Bitkiler              | Bitki büyümesinin engellenmesi, klorofil a içeriğinin azalması, karotenoid içeriğinin artması, boya birikimi ve nekroz oluşumu, PS II verimliliği azalması; kromozomal anormallikler ve çimlenme oranında azalma | Lobiuc vd. (2018)<br>Asses vd. (2018) |
| Metil Kırmızı                                                   | Tekstil boyama                                                 | Bitkiler ve hayvanlar | Çimlenme oranının engellenmesi, Tuzlu su hayvanları için ölümcül etki                                                                                                                                            | Ayed vd. (2011)                       |
| Direkt Kırmızı 2B                                               | Pamuk, suni ipek, jüt, hindistan cevizi, keten boyama          | Bitkiler              | Çimlenme, sürgün ve kök uzunluğu üzerinde olumsuz etki                                                                                                                                                           | Desai (2017)                          |
| Mavi GL, Mavi 2RNL, Direkt Kırmızı 5B, Altın Sarısı, Kırmızı RR | Tekstil boyama                                                 | Bitkiler              | Sürgün ve kök uzunluğu üzerinde olumsuz etki, tohum çimlenmesinin ve $\alpha$ -amilaz aktivitesinin inhibisyonu                                                                                                  | Jadhav vd. (2016)                     |
| Reaktif Mavi 172                                                | Tekstil boyama ve baskı                                        | Bitkiler ve hayvanlar | Tüy ve kök uzunluğunda azalma, Tatlı su hayvanları, memeliler ve insanlar için toksik etki                                                                                                                       | Lade vd. (2015)                       |
| Kırmızı, sarı, mavi, turuncu boya                               | Tekstil boyama ve baskı endüstrisinde boyama ve yeniden boyama | Bitkiler ve hayvanlar | İnsanlar, bitkiler ve diğer organizmalar için toksik etki                                                                                                                                                        | Sani vd. (2018)                       |
| Dispers Turuncu 1                                               | Polyester elyaf, iplik, naylon, akrilik ve kumaş boyama        | Hayvanlar             | Genotoksik ve sitotoksik                                                                                                                                                                                         | Ferraz vd. (2011)                     |
| Metil Kırmızı                                                   | Tekstil boyama                                                 | Bitkiler ve hayvanlar | Hayvan fizyolojisi üzerinde toksik                                                                                                                                                                               | Sharma vd. (2009)                     |
| Endüstriyel atık                                                | —                                                              | Bitkiler ve hayvanlar | Mutajenik ve kanserojen                                                                                                                                                                                          | de Lima vd. (2007)                    |
| Endüstriyel atıksu                                              | —                                                              | Bitkiler ve hayvanlar | Arıtılmamış tekstil boyası atık suyunun erkek albino sıçanların hematopoetik sistemine toksisitesi                                                                                                               | Sharma vd. (2007)                     |

## 2.3 Ağır Metaller

Ağır metaller, yüksek yoğunluğa sahip, farklı konsantrasyonlarda biyolojik sistemler için toksik veya zehirli olan metalik elementlerdir. Bu metallerin yoğunluğu 5 g/cm<sup>3</sup>'ten fazladır ve kurşun (Pb), cıva (Hg), kadmiyum (Cd), arsenik (As), krom (Cr), nikel (Ni), bakır (Cu), çinko (Zn) gibi elementleri içerir (Morris, 1992). Demir (Fe), bakır (Cu) ve çinko (Zn) gibi bazı ağır metallerin eser miktarları fizyolojik ve biyokimyasal işlevlere sahip olmakla beraber, eksikliği veya fazlalığı durumunda mikroorganizmalarda, bitki, hayvan ve insanlarda toksik etki yaratabilmektedir (Tchounwou vd. 2012).

### 2.3.1 Ağır metallerin çevre ve insan sağlığına etkileri

Başta metalürji ve madencilik olmak üzere, birçok farklı endüstrinin çeşitli kimyasal ve fiziksel proseslerinde kullanılan ağır metaller, pek çok organik kirletici gibi biyolojik olarak parçalanamadıkları için hem çevre hem de insan sağlığı için tehdit edici bir unsurdur. İnsan kaynaklı faaliyetlere ek olarak hava, rüzgâr ve su etkisiyle de ağır metallerin çevreye yayılması ile hem yüzey hem de yer altı sularında birikerek tüm ekosistem için risk oluşturmaktadırlar (Ali vd. 2019). Farklı biyolojik sistemlerde gerçekleşen ağır metal maruziyetinin neden olduğu toksisite araştırmacılar tarafından insan, bitki ve hayvanlarda incelenmiş ve çizelge 2.3'te özetlenmiştir.

Ağır metaller diğer metal veya organik kirleticiler ile birlikte su, hava ve kara ekosistemlerinde birikerek besin zinciri ile her bir canlıya taşınmaktadır. Ağır metal toksisitesinin genel mekanizması, reaktif oksijen türlerinin üretilmesi, oksidatif hasarın ortaya çıkması ve bunun ardından sağlık üzerinde olumsuz etkiler oluşmasıdır (Zamora-Ledezma vd. 2021). Yutma, soluma ve deri teması gibi farklı maruz kalma yolları ile insanlarda karaciğer, böbrek, kalp ve beyin gibi hayati organlarda birikerek fizyolojik süreçleri etkilemektedirler (Mudgal vd. 2010). Bu nedenle, ağır metallerle kirlenmiş sular dünya çapında yüksek morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır. İnsanlarda çeşitli akut ve kronik toksik etkiler yaratan krom, kurşun ve cıva gibi ağır metaller gen ifadesini etkileyerek epigenetik değişiklikler de oluşturabilmektedir (Mishra vd. 2010, Wang vd. 2018).

Çizelge 2.3 Ağır metallerin insan, bitki ve hayvanlardaki toksik etkileri (Hossini vd. 2022, Tchounwou vd. 2012)

| <u>Ağır Metal Türü</u> | <u>Maruz Kalma Türü</u>                                                                | <u>Canlı Türü</u> | <u>Etki Türü</u>                                                  | <u>Kaynakça</u>                                         |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Kadmiyum [Cd (II)]     | İçme suyu, deniz ürünleri tüketimi                                                     | İnsan             | Nörodejeneratif bozukluklar, meme kanseri, prostat kanseri        | Jiang vd. (2007); Nagata vd. (2005); Waalkes vd. (1997) |
| Kurşun [Pb (II)]       | İçme suyu, boya, toprak                                                                | İnsan             | Nörotoksik etki, hemolitik anemi, akciğer kanseri, mesane kanseri | Khalil vd. (2009); Vij ve Dhundasi (2009); IARC (2004)  |
| Krom [Cr(VI)]          | İçme suyu, toprak, mesleki maruz kalma (deri, ahşap, tekstil vb. endüstriyel faaliyet) | İnsan             | Akciğer kanseri, burun ve paranasal sinüs kanseri                 | Cogliano vd. (2011); Loomis vd. (2018)                  |
| Krom [Cr(VI)]          | İçme suyu                                                                              | İnsan             | Karaciğer, akciğer, böbrek ve ürogenital organ kanserleri         | Linov vd. (2011)                                        |
| Krom [Cr(VI)]          | Ağır metal içeren su ve gıda tüketimi                                                  | Hayvan (Fare)     | Antioksidan aktivitenin inhibisyonu ve karaciğer fibrozisi        | Yang vd. (2020)                                         |
| Cıva [Hg(II)]          | Madencilik faaliyetleri                                                                | İnsan             | İmmunotoksik etki, nörotoksik etki, böbrek yetmezliği             | Gibb ve O’Leary (2014)                                  |
| Bakır [Cu(I)]          | Toprak, su                                                                             | Bitki (Pirinç)    | Çimlenme, büyüme ve gelişim üzerinde toksik etki                  | Xu vd. (2006)                                           |

## 2.4 Atıksulardan Ağır Metal ve Boyarmaddelerin Arıtımı

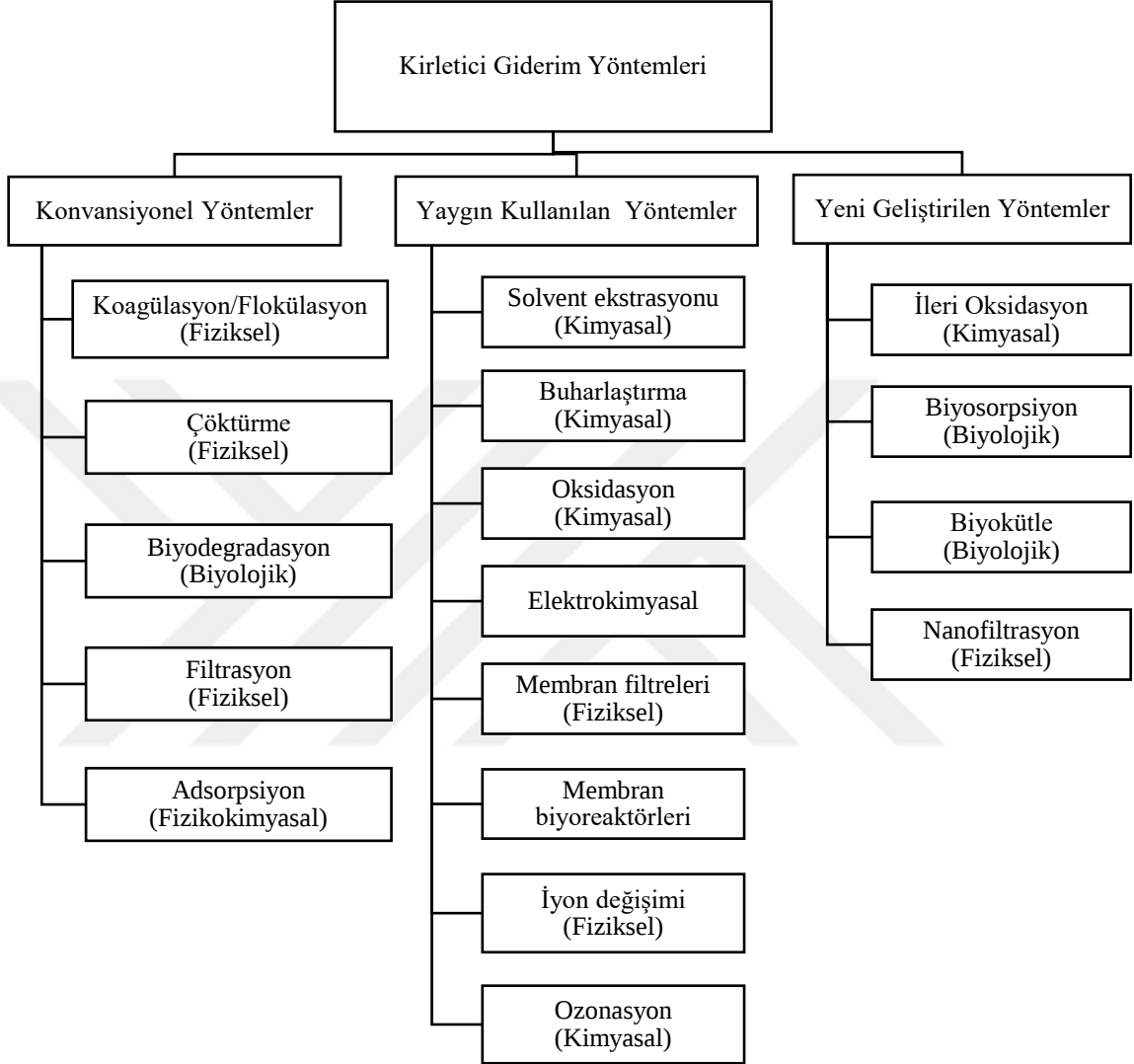
Dünyadaki erişebilir tatlı su kaynakları, nüfus artışı, kuraklık ve kirlilik gibi pek çok tehditle karşı karşıyadır. Teknolojik ve ekonomik gelişmeler, kentleşme ve sanayileşme gibi etkenlere bağlı olarak, su ihtiyacı ve su kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Su tüketiminin yoğun ve su kirliliğinin oldukça yüksek olduğu endüstriyel faaliyetlerin başında tekstil, gıda, kimya, madencilik ve makine sektörleri gelmektedir (Pande vd. 2020, Haripriyan vd. 2022).

Mevcut sınırlı su kaynaklarının korunması, kullanılabilir ve temiz suya erişimin verimliliği için sürdürülebilir su arıtım, yeniden kullanım ve deşarj yöntemlerinin geliştirilmesi ve etkin şekilde uygulanması gerekmektedir (Englande vd. 2015). Ağır metal ve boyarmaddeleri ayrı ayrı veya birlikte içeren endüstriyel atıksuların bir dizi arıtım işlemlerinden geçerek doğal su kaynaklarına deşarj edilmesi hem insan hem de çevre sağlığı açısından önem teşkil etmektedir.

Ağır metallerin gideriminde, iyon değişimi, adsorpsiyon, koagülasyon, kimyasal çöktürme, ters osmoz, flotasyon ve membran filtrasyon yöntemleri gibi fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılmakta; boyarmaddelerin arıtımında ise oksidasyon, flokülasyon, elektrokimyasal yöntemler de kullanılmaktadır (Anderson vd. 2022). Kirletici giderim yöntemlerinin sınıflandırılması ve ilgili tekniklere ait örnekler şekil 2.2’de gösterilmiştir. Genel olarak tercih edilen fizikokimyasal ve biyolojik yöntemlerin hem maliyet açısından hem de uygulanabilirlik ve verimlilik açısından değerlendirilerek, arıtımı yapılacak olan atıksuyun özelliklerine bağlı olarak ayrı ayrı veya birlikte kullanılması mümkündür (Crini ve Lichtfouse 2019). Çizelge 2.4’te önemli atıksu arıtım yöntemlerinin sahip olduğu avantajlar ve dezavantajlar belirtilmiştir.

Yüksek hacimli ve bileşimi farklılıklar gösterebilen atıksuların verimli bir şekilde arıtımının sağlanabilmesi için fiziksel ve kimyasal yöntemlerin bir arada kullanılması gerekebilmektedir (Sathya vd. 2022). Yüksek işletme maliyetleri, çamur oluşumu, yüksek değişkenlikte kimyasal özelliklere sahip boyarmaddelerin kullanımı ve zararlı ara reaksiyon ürünü oluşumu gibi farklı faktörler göz önünde bulundurulduğunda, mevcut

yöntemlere verimlilik katabilecek alternatif yöntemler geliştirilmesi önem kazanmaktadır (Saravanan vd. 2023).



Şekil 2.2 Kirletici giderim yöntemlerinin sınıflandırılması ve ilgili tekniklere ait örnekler (Crini ve Lichtfouse 2019)

Çizelge 2.4 Önemli atıksu arıtım yöntemlerinin sahip olduğu avantajlar ve dezavantajlar (Crini ve Lichtfouse 2019)

| <u>Arıtım Türü</u>         | <u>Temel Özellikler</u>                                | <u>Avantajlar</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <u>Dezavantajlar</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|----------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kimyasal çöktürme          | Kirleticilerin tutulması ve oluşan ürünlerin ayrılması | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Teknolojik olarak basit (basit ekipman)</li> <li>• Ekonomik açıdan avantajlı ve verimli</li> <li>• Yüksek kirletici yüklerine uygulanabilir</li> <li>• Metaller ve florür eliminasyonunda verimli</li> <li>• Metal seçici değil</li> <li>• Kimyasal oksijen ihtiyacında önemli azalma</li> </ul>                                                                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kimyasal tüketimi (kireç, oksidanlar vb.)</li> <li>• Atıksuyun fizikokimyasal takibi (pH)</li> <li>• Düşük konsantrasyonlarda metal uzaklaştırmada etkisiz</li> <li>• Kompleks metaller için oksidasyon adımı ihtiyacı</li> <li>• Yüksek çamur üretimi, bertaraf ve taşıma sorunları (yönetim, arıtma, maliyet)</li> </ul> |
| Koagülasyon<br>Flokülasyon | Kirleticilerin tutulması ve oluşan ürünlerin ayrılması | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Basit süreçli</li> <li>• Ticari olarak çok çeşitli kimyasallar mevcut</li> <li>• Ucuz sermaye maliyeti</li> <li>• İyi çamur çöktürme ve susuzlaştırma özellikleri</li> <li>• Kimyasal oksijen ihtiyacında ve biyokimyasal oksijen ihtiyacında önemli azalma</li> <li>• Çözünmeyen kirletici maddelerin (pigmentler vb.) giderilmesi için hızlı ve etkili</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tek kullanımlık kimyasalların eklenmesi (koagülant, flokülant, yardımcı kimyasallar)</li> <li>• Atık suyun fizikokimyasal izlenmesi (pH)</li> <li>• Yüksek çamur hacmi üretimi (yönetim, arıtma, maliyet)</li> <li>• Düşük arsenik giderimi</li> </ul>                                                                     |

Çizelge 2.4 Önemli atıksu arıtım yöntemlerinin sahip olduğu avantajlar ve dezavantajlar (Crini ve Lichtfouse 2019) (devam)

|                                                                                                     |                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kimyasal oksidasyon<br>Basit oksidasyon<br>Ozon<br>Hipoklorit tedavisi<br>Hidrojen peroksit         | Oksidan kullanımı<br>(O <sub>3</sub> , Cl <sub>2</sub> , ClO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , KMnO <sub>4</sub> gibi) | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Basit, hızlı ve verimli süreç</li> <li>• Çıktının kalitesi</li> <li>• Renk ve kokunun iyi bir şekilde giderilmesi (ozon)</li> <li>• Siyanür ve sülfürün giderilmesi için etkili arıtma</li> <li>• Azo bağ bölünmesini başlatır ve hızlandırır (hipoklorit uygulaması)</li> <li>• Ürünün biyolojik olarak parçalanabilirliğini artırır</li> <li>• Yüksek verim</li> <li>• Çamur üretimi yok</li> <li>• Suyun geri dönüşüm imkânı</li> <li>• Dezenfeksiyon (bakteri ve virüsler)</li> </ul>                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kimyasal ve ön işlem gereksinimi</li> <li>• Oksitleyicilerin üretimi, taşınması ve yönetimi</li> <li>• Arıtıma dirençli boyalarda yüksek ozon ihtiyacı</li> <li>• Kimyasal oksijen ihtiyacı değerlerinde azalma yok veya etkisi sınırlı (ozon)</li> <li>• Tuzluluk üzerinde etkisi yok (ozon)</li> <li>• Uçucu bileşiklerin ve aromatik aminlerin salınımı (hipoklorit tedavisi)</li> </ul>                                          |
| Adsorpsiyon/filtrasyon<br>Aktif karbon<br>Aktif alümina<br>Kum<br>Karışık malzemeler<br>Silika jeli | Tahribatsız süreç<br>Katı malzeme kullanımı                                                                                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Teknolojik olarak basit (basit ekipman) ve birçok arıtım formatına uyarlanabilme</li> <li>• Geniş ticari ürün yelpazesi</li> <li>• Çok çeşitli hedef kirleticiler (adsorpsiyon)</li> <li>• Hızlı kinetiğe sahip son derece etkili proses (adsorpsiyon)</li> <li>• Arıtılmış atık suyun yüksek kalitesi</li> <li>• Küresel eliminasyon, adsorbana bağlı olarak seçici</li> <li>• Askıdaki katı maddeleri, kimyasal oksijen ihtiyacını ve rengi azaltmak için pıhtılaşmayla birleştirildiğinde yüksek verimli arıtma</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tahribatsız süreçler</li> <li>• Seçici olmayan yöntemler</li> <li>• Performans malzemenin türüne bağlıdır</li> <li>• Farklı adsorban türleri için farklı gereklilikler ve malzeme maliyeti</li> <li>• Reaktörlerin hızla satüre olması ve tıkanması</li> <li>• Bazı boya türleri ve metallerde etkili değil</li> <li>• Adsorbanın ortadan kaldırılması</li> <li>• Belirli endüstriler için ekonomik olarak uygun değildir</li> </ul> |

Çizelge 2.4 Önemli atıksu arıtım yöntemlerinin sahip olduğu avantajlar ve dezavantajlar (Crini ve Lichtfouse 2019) (devam)

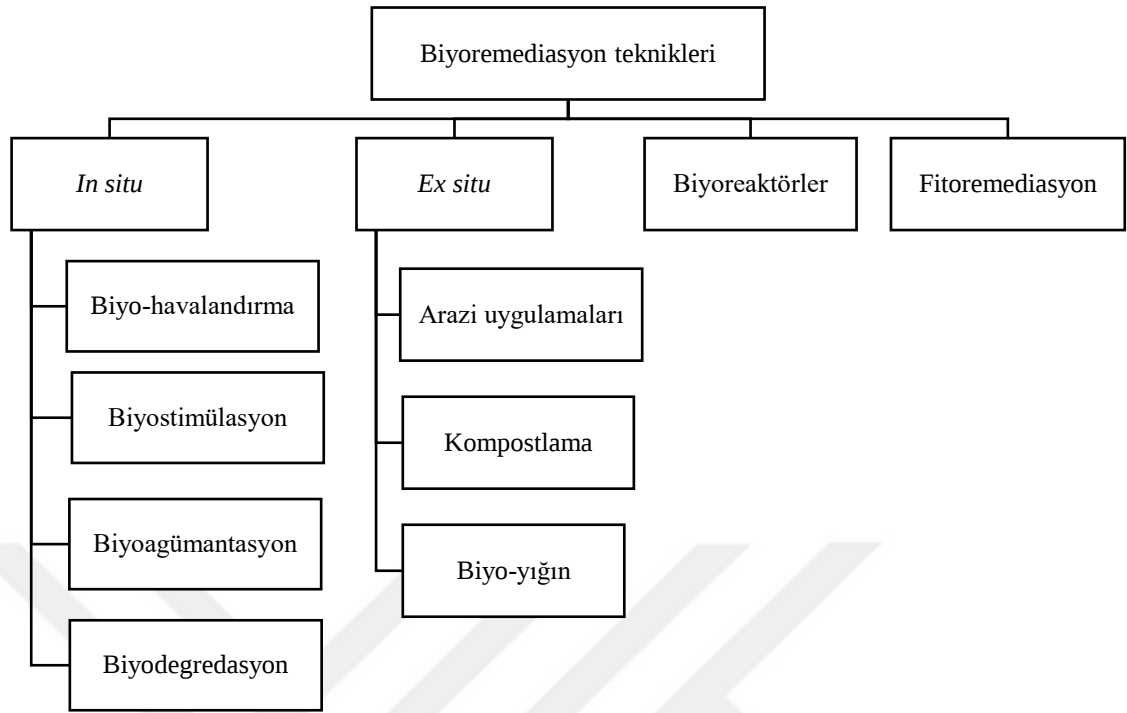
|                                                                                                                         |                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Biyolojik yöntemler<br/>Biyoreaktörler<br/>Biyolojik aktif çamur<br/>Mikrobiyolojik arıtım<br/>Enzimatik ayrışma</p> | <p>Biyolojik (saf veya karışık) kültürlerin kullanımı</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Organik kirleticilerin biyolojik olarak parçalanması için mikroorganizmaların uygulanması basit, ekonomik açıdan cazip ve genel olarak kabul gören bir uygulamadır</li> <li>• Karışık kültürlerde (konsorsiyumlar) veya saf kültürlerde kullanılan çok sayıda tür</li> <li>• Biyolojik olarak parçalanabilen organik maddeleri, <math>\text{NH}_3</math>, <math>\text{NH}_4^+</math> ve demiri verimli bir şekilde ortadan kaldırır</li> <li>• Rengi iyi giderir</li> <li>• Biyokimyasal oksijen ihtiyacının ve askıda katı maddelerin yüksek oranda giderilmesi</li> <li>• Sudaki kirleticilerin uzaklaştırılmasında kullanılan gelecek teknolojilerde mikrobiyolojik süreçlerin belirleyici rolü</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Optimum düzeyde elverişli bir ortam yaratmak için gerekli</li> <li>• Mikroorganizma yönetimi ve bakımı ve/veya fizikokimyasal ön arıtmayı gerektirir (bozunamayan bileşikler üzerinde veya toksik bileşikler mevcut olduğunda verimsizdir)</li> <li>• Yavaş süreç (kinetik sorunları)</li> <li>• Bazı moleküllerin düşük biyobozunurluğu</li> <li>• Zayıf renk giderme</li> <li>• Biyolojik çamur oluşumu ve kontrolsüz bozunma ürünleri</li> <li>• Karışık kültürlerin bileşimi süreç sırasında değişebilir</li> <li>• Mikrobiyolojik mekanizmaların karmaşıklığı</li> <li>• Enzimatik süreçler hakkında iyi bilgiye sahip olma gerekliliği</li> </ul> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

### 2.4.1 Biyolojik yöntemler

Biyolojik arıtma yöntemleri, kimyasal ve fiziksel arıtma yöntemleriyle karşılaştırıldığında çamur oluşumunun azalması, toplam maliyetlerin düşürülmesi ve çevre için potansiyel olarak risk oluşturabilecek tehlikeli yan ürünlerin bulunmaması gibi dikkate değer faydalar sunmaktadır. Bu kapsamda, çevresel açıdan sürdürülebilir iyileştirme teknolojileri arasında oldukça tercih edilen bir kategoriye temsil etmektedir (Kapahi ve Sachdeva 2019). Biyoremediasyon, biyodegradasyon ve biyosorpsiyon olmak üzere ana başlıklarda toplanan bu yöntemler, renk kirliliği ile karakterize edilen atıksuyun arıtılmasında geniş uygulama alanı bulur ve diğer kirleticileri içeren ortamlarda da tercih edilen bir arıtma yöntemi oluşturlar (Sathya vd. 2022).

Biyolojik yolla boya ve ağır metal giderim işlemleri, biyotransformasyonun temel prensibine göre çalışır; kirleticiler mikrobiyal aracılı biyolojik süreçler yoluyla alternatif ürünlere dönüştürülür. Bu süreçlerde mikroorganizmalar önemli bir rol üstlenmektedir. Biyolojik arıtmada kullanılan organizmalar, bakterileri (aerobik/anaerobik), mantarları ve algleri kapsamaktadır (Pande vd. 2020).

Uygulama alanı olarak biyoremediasyon, farklı mikroorganizmaların yardımıyla su, toprak veya havadaki organik ve inorganik kirleticileri parçalamak, dönüştürmek, uzaklaştırmak veya indirmek olarak tanımlanmaktadır. Biyolojik bir süreç olan biyoremediasyon, kirleticileri kısmen veya tamamen zararsız ürünlere dönüştürerek çevre dostu bir arıtım yöntemi olarak kullanılmaktadır (Vidali 2001). Biyoremediasyonun etkinliği kirleticinin (çözünürlük, toksisite vb.) ve çevrenin özellikleri (sıcaklık, pH, oksijen ve besin varlığı vb.), kirleticinin konsantrasyonu ve mikroorganizmanın uygulanabilirliği gibi önemli faktörlere bağlıdır (Pande vd. 2020). Uygulanma şekillerine göre farklı gruplara ayrılan biyoremediasyon teknikleri şekil 2.3’de belirtilmiştir.

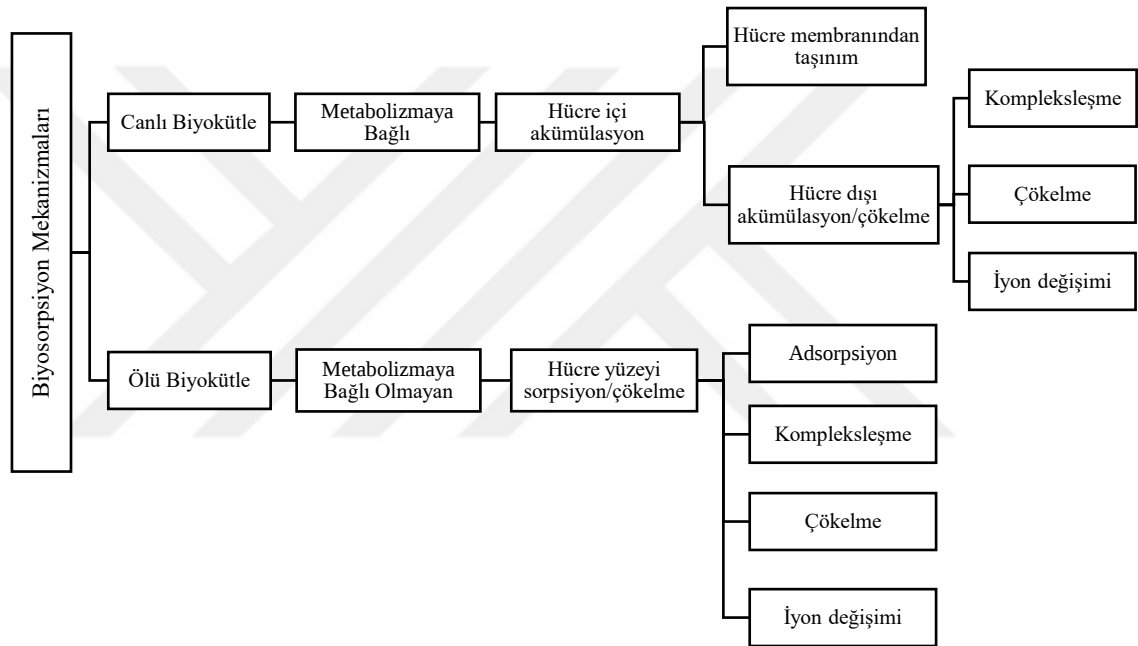


Şekil 2.3 Biyoremediasyon teknikleri (Vidali 2001)

Biyodegradasyon, suda ve/veya toprakta bulunan organik kirleticilerin veya substratların canlı mikroorganizmalar tarafından biyolojik yollarla aerobik veya anaerobik koşullar altında daha basit ve daha az zararlı bileşiklere parçalandığı doğal süreci ifade etmektedir. Ortamda bulunan organik kirleticiler, ilgili mikroorganizmalar için bir besin kaynağı veya substrat olarak bir dizi enzimatik bozunma (biyotransformasyon) süreçlerine uğrar. Kirleticinin türü ve fizikokimyasal yapısı, ortamın sıcaklığı, pH'ı, oksijen ve besin içeriği gibi faktörler mikrobiyal metabolik aktiviteleri ve bozunma süreçlerini etkileyebilmektedir (Bharathi vd. 2022).

Biyosorpsiyon, tipik olarak renklendiriciler ve ağır metalleri kapsayan çeşitli kirletici maddelerin, yaşayan veya ölmüş biyolojik materyaller kullanılarak sulu çözeltilerden uzaklaştırılması için kullanılan bir metodolojiyi temsil eder (Jena vd. 2022). Biyosorpsiyon süreci boyunca kirleticiler canlı veya cansız hücrelerin yüzeyine yapışır ve daha sonra hücre içinde birikir veya akümüledir. Bakteri, alg ve mantar gibi canlıların hücre duvarında yer alan çeşitli fonksiyonel gruplar sayesinde farklı

biyosorpsiyon mekanizmaları (Şekil 2.4) ile kirleticilerin uzaklaştırılması sağlanır. Toksik özellik gösteren atıksularda canlı hücreler ile arıtım uygulaması zor veya limitli olduğunda, biyosorpsiyon yöntemi avantajlı ve verimli bir alternatif olarak değerlendirilmektedir. Biyoadsorbantların yeniden kullanılabilirliği, büyük hacimli atıksulara uygulanabilmesi ve düşük maliyet sunması bu biyolojik yöntemin tercih edilmesini sağlamaktadır (Vijayaraghavan ve Yun 2008).



Şekil 2.4 Biyosorpsiyon mekanizmaları (Jena vd. 2022)

#### 2.4.2 Mikroorganizmalar ile yapılan biyoremediasyon çalışmaları

Endüstriyel atıksuların arıtımında kullanılan biyolojik yöntemler genetik çeşitlilikleri ve çok yönlülükleri nedeniyle, sudaki kirleticilerin parçalanması ve mineralizasyonu için etkili alternatiflerdir (Saravanan vd. 2023). Biyolojik arıtma işlemi, çeşitli mikroorganizma türleri veya bunların enzimatik mekanizmalarını kullanarak aerobik, anaerobik veya fakültatif koşullar altında gerçekleştirilebilmektedir. Bu

mikroorganizmalar, çeşitli metabolik yollar ve biyosorpsiyon mekanizmaları aracılığıyla kirleticilerin rengini gidermek, parçalamak, detoksifiye etmek ve mineralize etmek için kullanılmaktadırlar (Singh vd. 2022).

Mikrobiyal biyoremediasyon yöntemlerinde kullanılan bakteriler, sahip oldukları çeşitlilik, çevresel koşullara hızlı uyum sağlama yeteneği, minimal yan etki oluşturma gibi avantajlar ile farklı kirlilik türleri ve ortamları hedefleyen, çevre dostu ve düşük maliyetli biyoremediasyon stratejileri geliştirmek için kullanılmaktadır (Bharathi vd. 2022).

Cheng vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada, tekstil atıksuyunda yaygın olarak bulunan Reaktif Siyah 5 (RB5) boyası ve Cr(VI) ağır metalinin, izole edilen *Ochrobactrum anthropi* bakterisi tarafından giderim potansiyeli araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan bakteri türü tarafından 3 gün içerisinde boyanın tamamının (400 mg/L) ve ağır metalin de (20 mg/L) %80'inin giderildiği ortaya konmuştur.

Tan vd. (2020) çalışmasında, izole etmiş olduğu *Bacillus* sp. CRB-B1 bakterisinin Cr(VI) biyoredüksiyon ve biyosorpsiyon kapasitesini gözlemlemiştir. Yapılan çalışmada, pH, sıcaklık ve başlangıçtaki Cr(VI) konsantrasyonu gibi çeşitli çevresel faktörlerin giderim süreci üzerindeki etkisi ve hücresel adsorpsiyon mekanizmaları incelenmiş, elde edilen izolatin biyoremediasyon çalışmaları için umut verici bir aday olduğunu ortaya koymuştur.

Kullanılan kimyasallara bağlı olarak yüksek tuzluluk özelliği taşıyan tekstil atıksuları ile yapılan bir çalışmada, Liu vd. (2017), izole etmiş oldukları tuza toleranslı *Bacillus circulans* BWL106 suşunun, yüksek tuz konsantrasyonuna (60 g/L NaCl) sahip anaerobik koşullar altında Metil Turuncu (50 mg/L) ve Cr(VI) (50 mg/L) kirleticilerini eş zamanlı olarak etkili bir şekilde giderebildiğini göstermiştir. Ek olarak, yapılan fitotoksisite deneyleri ile kullanılan suşun Metil Turuncu azo boyasını daha az toksik yan ürünlere dönüştürdüğü de ortaya konmuştur.

Saf kültürlere ek olarak, bakteriyel konsorsiyumlar ile yapılan çalışmalarda da ağır metal ve boya gideriminde yüksek verimlilik elde edilmiştir. Zab ocka-Godlewska ve Przysaş'ın (2020) yaptığı bir çalışmada, farklı büyüme koşulları altında yetiştirilen bakteri kültürleri kullanılarak Evans Mavisi ve Parlak Yeşil boya karışımının renk giderim etkinliğini test edilmiştir. Ortamdaki besinin artışı ve pH düzenlenmesi ile *Citrobacter* sp. ve *Pseudomonas putida* içeren konsorsiyumun saf suşlara kıyasla üstün renk giderim verimliliği sağladığı ortaya konmuştur.

Benzer şekilde, Plestenjak vd. (2022)'nin yapmış oldukları çalışmada, zenginleştirilmiş mikrobiyal konsorsiyumun saf bakteri kültürlere kıyasla, endüstriyel atıksudan Cr(VI)'un giderilmesinde üstün bir etkinlik sergilediğini ortaya koymuştur. Bu konsorsiyumun, yüksek Cr(VI) konsantrasyonlarına karşı gelişmiş tolerans gösterdiği de bildirilmiştir.

Biyolojik yöntemler, endüstriyel atıksuların arıtımında etkili ve sürdürülebilir     mler sunmaktadır. Laboratuvar koşullarında elde edilen verimliliğin endüstriyel ölçekte tekrarlanması her zaman mümkün olmayabilir. Ayrıca, karmaşık endüstriyel atıksu matrislerinde, birden fazla kirleticinin birlikte bulunması, mikrobiyal etkinliği olumsuz etkileyebilir. Bu nedenle, mikrobiyal biyoremediasyon yöntemlerinin saha uygulamaları öncesinde kapsamlı pilot çalışmalar ile test edilmesi önem arz etmektedir.

### 3. MATERİYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Mikroorganizma ve gelişme koşulları

Çalışmada Çubuk (Keçiören, Ankara) Çayı Gümüşdere Mahallesi noktasından (39°57'54"K-32°51'27"D) alınan su örneklerinden elde edilen karışık bakteriyel kültür ile bu karışık kültürden izole edilen bakteriler kullanılmıştır. Bakteriler, Nutrient Broth besiyerlerinde, 7 gün boyunca, çalkalamalı inkübatörde, 30 °C’de geliştirilmiştir. Saf bakteriyel kültürler ise yatık Nutrient Agar besiyerinde, 4 °C’de muhafaza edilmiş ve her 3 ayda bir düzenli olarak yenilenmiştir. Aşağıda Nutrient Broth ve Nutrient Agar besiyeri içeriği verilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Nutrient Broth (NB) ve Nutrient Agar (NA) besiyeri bileşimi

|            | Nutrient broth (NB) | Nutrient agar (NA) |
|------------|---------------------|--------------------|
| Bileşen    | Miktar (g/L)        | Miktar (g/L)       |
| Pepton     | 5.0                 | 5.0                |
| Maya özütü | 3.0                 | 3.0                |
| Agar       | -                   | 15.0               |

##### 3.1.2 Setazol® Navy Blue SBG (SNB) boya stok solüsyonunun hazırlanması

Setazol® Navy Blue SBG (SNB), Setaş Kimya (Tekirdağ, Türkiye) firmasından saf ve toz halde alınmıştır. Stok solüsyon, konsantrasyon %2 (w/v) olacak şekilde, boyanın distile su içerisinde çözülmesi ile elde edilmiştir. Çözünen boya stok solüsyonu otoklavlandıktan sonra, gerekli seyreltmeler yapılarak kullanılmıştır.

### 3.1.3 Metal stok solüsyonlarının hazırlanması

Deneylerde kullanılan olan ağır metal stok solüsyonları,  $K_2Cr_2O_7$  (Merck) ve  $NiSO_4.6H_2O$  (Merck) kimyasallarından 1 g/L olacak şekilde hazırlanan çözeltiden gerekli seyreltmelerle elde edilmiştir.

## 3.2 Yöntem

Deneylerde, Çubuk (Keçiören, Ankara) Çayı Gümüşdere Mahallesi noktasından alınan su örneklerinden elde edilen karışık bakteriyel kültürün SNB ve ağır metal biyoremediasyonunu en yüksek kapasite ile yaptığı optimum ortamın belirlenebilmesi için farklı pH, başlangıç kirletici konsantrasyonu ve başlangıç biyokütle konsantrasyonunun etkisi araştırılmıştır. Bununla birlikte, karışık kültürden saf bakteriler de izole edilmiş ve en yüksek biyoremediasyon kapasitesine sahip türler tanımlanmıştır. ATR-FTIR analizleri ile kirleticinin biyogideriminden sorumlu bakteri yüzeyindeki fonksiyonel gruplar tespit edilmiştir. SEM analizleriyle de bakterilerin kirletici içeren ortamdaki morfolojik değişimleri incelenmiştir.

### 3.2.1 Karışık bakteriyel kültür üretimi

Alınan su örnekleri (1 mL), SNB (50 mg/L) ve Cr(VI) veya Ni(II) (10 mg/L) ağır metallerini ayrı ayrı içeren 50 mL'lik erlenlerde 20 mL olarak hazırlanan Nutrient Broth besiyerlerine aşılanmıştır. Daha sonra, elde edilen karışık bakteriyel kültürden alınan 1 mL, aynı tip besiyerine ekilmiştir. Karışık kültür, 30 °C'de çalkalamalı inkübatörde 5 günlük inkübasyon süresi boyunca geliştirilmiştir. Bu şekilde karışık bakteriyel kültür, zenginleştirme yolu ile elde edilmiş ve kirleticilere adaptasyonu sağlanmıştır.

İnkübasyon süresi sonunda, ortamda kalan boyar madde ve ağır metal konsantrasyonu bulunmuştur. Çalışmanın bu aşamasında, hangi ağır metal varlığında en etkin şekilde boya giderimi yapıldığı bulunmuş, denemelere o ağır metali içeren ortamlarda devam edilmiştir.

Denemelerde, mikroorganizma bulundurmayan, besiyeri ve kirletici içeren ortamlar, kirleticiler ve besiyeri içeriğinin etkileşime girmesinin kontrol edilmesi amacıyla hazırlanmıştır.

### **3.2.2 Başlangıç pH değerinin SNB ve ağır metal biyogiderimine etkisi**

Karışık kültürün farklı pH değerlerindeki biyogiderim kapasitesinin belirlenebilmesi için, 25 mg/L Cr(VI) ve 50 mg/L SNB içeren besiyeri pH değerleri, 0.1 M NaOH ve 0.1 M HCl çözeltileri kullanılarak 6, 7, 8 ve 9'a ayarlanmıştır.

Denemelerde pH'ı 6, 7, 8, 9 olarak ayarlanan Cr(VI) ve SNB içeren ortamların başlangıç Cr(VI) konsantrasyonları sırasıyla 23.3 mg/L, 24.3 mg/L, 29.1 mg/L, 25.1 mg/L ve başlangıç SNB konsantrasyonları sırasıyla 52.0 mg/L, 50.5 mg/L, 55.8 mg/L ve 50.6 mg/L'dir.

Deneyler 250 mL'lik erlenlerde 100 mL besiyerlerine %1 (v/v) ekim ile gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresi boyunca örnekler alınmış ve karışık kültürün kirleticileri maksimum verimle giderdiği ortamın pH değeri kaydedilmiştir.

### **3.2.3 Başlangıç SNB konsantrasyonunun Cr(VI) biyogiderimine etkisi**

Artan SNB boya konsantrasyonunun ağır metal biyogiderimine olan etkisini belirlemek için 10 mg/L sabit Cr(VI) konsantrasyonuna sahip, başlangıç boya ve Cr(VI) konsantrasyonları sırası ile 24.7 mg/L SNB + 10.1 mg/L Cr(VI), 43.7 mg/L SNB + 10.4 mg/L Cr(VI) ve 84.5 mg/L SNB + 12.1 mg/L Cr(VI) olacak şekilde ayarlanmış, optimum pH değerinde (pH 8) hazırlanan sıvı NB besiyerleri kullanılmıştır. Aynı ortamda aktifleştirilen kültürden %1 (v/v) inokülasyon yapılmıştır ve 7 günlük inkübasyon süresi boyunca kirleticilerin giderimi belirlenmiştir.

### **3.2.4 Başlangıç Cr(VI) konsantrasyonunun SNB biyogiderimine etkisi**

Artan Cr(VI) konsantrasyonunun SNB biyogiderimine olan etkisini belirlemek amacıyla, optimum pH değerine ayarlanmış, 50.4 mg/L sabit boya konsantrasyonuna sahip, başlangıç Cr(VI) konsantrasyonları 9.7 mg/L, 23.8 mg/L ve 55 mg/L olan sıvı NB besiyerleri kullanılmıştır. Aynı ortamda aktiveleştirilen kültürden %1 (v/v) inokülasyon yapılmıştır ve 7 günlük inkübasyon süresi boyunca ortamda kalan SNB ve Cr(VI) miktarı belirlenmiştir.

### **3.2.5 Başlangıç biyokütle konsantrasyonunun SNB ve Cr(VI) biyogiderimine etkisi**

Farklı biyokütle konsantrasyonunun biyogiderime olan etkisini tespit etmek için, 25 mg/L Cr(VI) ve 50 mg/L SNB konsantrasyonuna sahip, optimum pH değerinde hazırlanan sıvı besiyerlerine %1, %4 ve %8 (v/v) olacak şekilde karışık bakteriyel kültürden ekim yapılmıştır.

Biyogiderim çalışmaları, 250 mL' lik erlenlerdeki 100 mL' lik sıvı besiyerlerinde 30 °C'de ve 100 rpm karıştırma hızındaki çalkalayıcıda 7 gün boyunca gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda ortamda kalan SNB ve Cr(VI) miktarı belirlenmiştir.

Denemeler üç paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Denemelerde inkübasyon süresi boyunca alınan örnekler ile biyogiderim etkinliği spektrofotometre kullanılarak ölçümlenmiştir.

### **3.2.6 SNB ve ağır metal biyogiderimi yapan karışık bakteriyel kültürden saf bakteriyel kültürlerin izolasyonu**

Çalışmada kullanılan su örneklerinden elde edilen karışık kültür, 25 mg/L Cr(VI) ve 50 mg/L SNB içeren sıvı besiyerinde geliştirilmiş ve iki kez aktiveleştirilmiştir. Geliştirilen sıvı kültürden 0.1 ml örnek alınarak aynı kirletici konsantrasyonlarına sahip %1.5 (w/v) Nutrient Agarlı (pH 8) katı besiyerine çizgi ekimler yapılarak 30 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda farklı morfolojiye sahip koloniler belirlenmiş ve izole edilerek

saflık kontrolleri aynı besiyerine ekilerek sağlanmıştır. Elde edilen saf kültürler, yatık Nutrient Agar besiyerinde, 4 °C’ de muhafaza edilmiş ve her 3 ayda bir yenilenmiştir.

### **3.2.7 Saf kültürlerin SNB ve ağır metal biyogiderim kapasitelerinin belirlenmesi**

Yapılan deneylerde, pH değeri 8 olan, 26.1 mg/L Cr(VI) ve 46.5 mg/L SNB içeren 250 mL’lik erlenlerdeki 100 mL’lik sıvı besiyerlerine, izole edilmiş olan saf bakteri kültürleri %8 (v/v) hacimde olacak şekilde inoküle edilmiştir. İnkübasyon, 30 °C’de ve 100 rpm karıştırma hızındaki çalkalayıcıda 5 günlük inkübasyon süresinde gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda her iki kirletici için en etkili biyogiderim sağlayan bakteri kültürleri seçilmiştir.

Seçilen saf kültürlerin biyogiderim verimlilikleri 14.4 mg/L Cr(VI) ve sırasıyla 26.2 mg/L, 51.8 mg/L, 99.7 mg/L SNB konsantrasyonlara sahip besiyerlerine %8 (v/v) inokülasyon yapılarak, inkübasyon süresi sonunda ortamdaki kirletici miktarı ölçülünerek değerlendirilmiştir.

### **3.2.8 Saf bakteriyel kültürlerin tanılanması**

Her iki kirletici için en yüksek biyogiderim sağlayan izolatların tanılanması için, 16S rDNA dizileme yöntemi kullanılmıştır. Nutrient agar katı besiyerinden saf olarak elde edilen kolonilerden, EurX GeneMATRIX Bacterial&Yeast DNA İzolasyon Kiti kullanılarak (EurX, Polonya) DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon sonrası elde edilen DNA’ların miktar ve saflığını kontrol etmek için spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır (Thermo-Scientific NanoDrop 2000, ABD). PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) için 35 µl hacim içinde 3 µl örnek, 0.3 µM 27F ve 1492R primerler, 2 U Taq DNA polimeraz, 0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> ve 1X PZR buffer kullanılarak hazırlanmıştır. PZR cihazında (Kyrattec Thermocycler, Avustralya) deney, 95 °C’de 5 dakika ilk denatürasyon, 30 tekrar denatürasyon 95 °C’de 45 saniye, primer bağlanması 57 °C’de 45 saniye, 72 °C’de 60 saniye uzama ve son uzama 72 °C’de 5 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. PZR işlemi sonucu elde edilen DNA ürünü BigDye Terminator v3.1 Cycle (Applied

Biosystems, ABD) dizileme kiti ve ABI 3730XL (Applied Biosystems, ABD) cihazında çalışılarak Sanger dizilemesi elde edilmiştir. Elde edilen diziler BioEdit yazılımı ile analiz edilmiş ve internet ortamında BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) programı kullanılarak karşılaştırılmıştır.

Bu saf kültürlerin moleküler düzeyde 16S rDNA'sına göre tanılanması BM Labosis BM Lab Sistemleri Limited Şirketi'nden (Ankara) hizmet alımı yapılarak gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.9 Saf bakteriyel kültürlerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi**

Bakterilerin analizi ve boyutları taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiş ve analiz edilmiştir. Bakteri örnekleri immobilizasyon için PVC yüzey üzerinde fikse edilmiştir. PVC'ler PBS tamponu ile yıkanmış ve bir gece boyunca PBS tamponunda hazırlanan %2.5 glutaraldehit çözeltisinde bırakılmıştır. Daha sonra PVC'ler PBS tamponu ile tekrar yıkanmış ve örnekler EtOH çözeltilerine (%30-%96) maruz bırakılarak dehidre edilmiştir. Son olarak, örnekler SEM görüntülemesi için 5 nm Au-Pd ile kaplanmıştır (Quanta 200 FEG SEM, ABD). Çalışmanın bu kısmı Ankara Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü'nde hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

Örneklerin uzunluğunu ölçmek için yüksek büyütmedeki SEM görüntüleri ImageJ yazılımı (<http://imagej.nih.gov/ij/>) ile analiz edilmiştir. Her bir numune üzerinde 100 ölçüm yapılmış ve ortalama bakteri boyutları ve bakteri uzunluk dağılımları hesaplanmıştır.

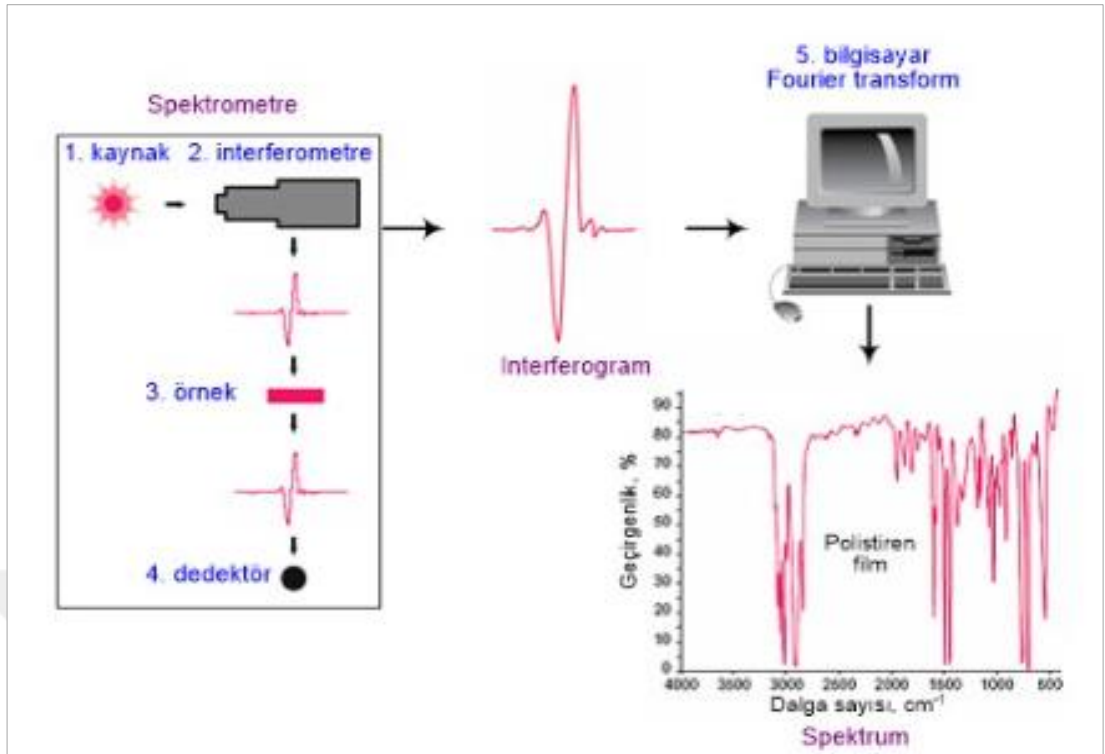
### **3.2.10 ATR-FTIR analizi (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi)**

Kızılötesi (IR) spektroskopisi, IR ışınının moleküller üzerinde oluşturduğu titreşimlerin neden olduğu karakteristik frekans değerlerinin kullanılması ile moleküler düzeyde madde analizi yapılmasını sağlar. FTIR ile direkt olarak atomik düzeyde bilgiye ulaşıldığından, moleküllerde meydana gelen çok küçük değişimler bile tespit edilebilmektedir. Belli moleküller kızılötesi ışığa maruz kaldıklarında (lipid, protein,

karbonhidrat vs.) belirli frekanslarda (1/cm) verdikleri moleküler bağ titreşimi sinyalleriyle karakterize olurlar. Böylece mikroorganizmaların belirli bileşenlerinin hakkında daha ayrıntılı bilgi edinilmesi mümkün olmaktadır.

Bu amaçla, kirletici içeren ve içermeyen ayrı iki ortamdan alınan bakteri örnekleri santrifüjlenerek toplanmış ve iki kez çift damıtılmış su ( $d^2H_2O$ ) ile yıkanmıştır. Çökelti, homojen bir çözelti elde edilene kadar 100  $\mu l$   $d^2H_2O$  ile vortekslenmiştir. Bu çözeltiden 5  $\mu l$  elmas üzerine pipetlenmiş ve fazla suyu uzaklaştırmak için 15 dakika boyunca hafif bir  $N_2$  gazı verilerek kurutulmuştur. Kızılötesi spektrumlar, elmas zayıflatılmış toplam yansıma aksesuarı (ATR, ConcentratIR2, Harrick) ile donatılmış Nicolet 6700 FTIR (Thermo-Scientific, ABD) spektrometre cihazı kullanılarak elde edilmiştir (Şekil 3.1). Arka plan interferogramı olarak temiz bir elmas yüzey kullanılmıştır. Absorbans spektrumları OMNIC (v. 8.2.388, ABD) cihaz yazılımı kullanılarak 4 1/cm çözünürlükte 128 taramanın toplanması ve ortalaması alınarak kaydedilmiştir. Bu çalışmada sunulan görseller için tekrarlanan deneylerin ortalaması kullanılmıştır. Bakteri popülasyonundaki farklılıklardan kaynaklanan konsantrasyon farklılıklarını ortadan kaldırmak için tüm spektrumlar önce alan normalizasyonuna tabi tutulmuştur. Pik alanı hesaplamaları, normalize edilmiş absorbans spektrumlarından pikin entegre edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. İkinci bir türev hesaplaması, polinom sırası 3'e ayarlanmış 15 noktalı Savitsky-Golay türevi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Aynı numunenin tekrarlanan ölçümleri arasındaki dağılımın normalliğini analiz etmek için pik alanı hesaplama sonuçlarına Shapiro-Wilk testi uygulanmıştır. Verilerin normal dağıldığı görülmüştür. Kontrol ve numune grupları arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığını belirlemek için tek yönlü ANOVA kullanılmıştır. Çalışmanın bu aşaması, Prof. Dr. Filiz Korkmaz ÖZKAN koordinatörlüğünde bulunan Biyofizik Laboratuvarı'nda (Mühendislik Fakültesi, Fizik Grubu, Atılım Üniversitesi) gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1 Fourier transform spektrofotometre cihazı şeması (Beşergil 2015)

### 3.3 Analiz Yöntemleri

#### 3.3.1 Optik yoğunluğun (OD) belirlenmesi

İnkübasyon süresince erlenlerden belirli zaman aralıklarında 3 mL hacminde örnekler alınarak 6000 rpm’de 10 dakika santrifüjlenmiştir (Hermle Z207A, Almanya). Çökelti, fizyolojik tuzlu su ile yıkanmış ve gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra optik yoğunluk 600 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (BioDrop, İngiltere).

#### 3.3.2 Cr(VI) analizi

Deneylerde kullanılan Cr(VI)’un analizi, sülfürik asit ( $H_2SO_4$ ) içeren ortamda 1,5-difenilkarbazid ( $C_{13}H_{14}N_4O$ ) ile verdiği reaksiyondan yararlanılarak spektrofotometrik ölçümleme ile yapılmıştır. Reaksiyonda kullanılan difenilkarbazid solüsyonu 0.25 g

ağırlığındaki 1,5-difenilkarbazidin 100 mL etil alkolde (%95) çözülmesi ile hazırlanmıştır.

İnkübasyon süresince erlenlerden belirli zamanlarda alınan örnekler, 6000 rpm’de 10 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant kısmı, ortamda mevcut Cr(VI)’nin analizi için kullanılmıştır. 1 mL örnek, 0.825 mL %20’lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi ve 0.25 mL difenilkarbazid solüsyonu ile karıştırılarak, yapılan karışım balon jojelerde distile su ile toplam 25 mL’ye tamamlanmıştır. Spektrofotometrik ölçümler 540 nm’de gerçekleştirilmiştir (Snell ve Snell 1959).

### **3.3.3 Ni(II) analizi**

İnkübasyon süresince erlenlerden belirli zamanlarda alınan örnekler, 6000 rpm’de 10 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant kısmı, ortamda mevcut Ni(II)’nin analizi için kullanılmıştır.

Analiz yönteminde, sodyum dietilditiyokarbamatın (NaS<sub>2</sub>CN(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>) amonyak (NH<sub>3</sub>) bileşiği ile ortamda oluşturduğu renkli karışımdan faydalanılmıştır. Tepkimede yer alan sodyum dietilditiyokarbamat çözeltisi, hassas terazide kimyasalın 0.1 g tartılarak 10 mL saf su içinde çözündürülmesiyle elde edilmiştir. 1 mL örnek, sulu amonyak çözeltisi ve dietilditiyokarbamat solüsyonu ile karıştırılarak, yapılan karışım balon jojelerde distile su ile toplam 25 mL’ye tamamlanmıştır. Spektrofotometrik ölçüm 340 nanometrede yapılmıştır (Snell ve Snell 1959).

### **3.3.4 SNB analizi**

Deney ortamında kalan SNB analizi için belirli zamanlarda alınan örnekler, 6000 rpm’de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatant ile gerekli seyreltmeler yapılmış, 602 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

### 3.3.5 Biyogiderim veriminin hesaplanması ve kullanılan kısaltmalar

Biyogiderim verimi pH, kirletici konsantrasyonu ve biyokütlenin bir fonksiyonu olarak incelenmiştir. Biyogiderim verim yüzdesi için kullanılan formül aşağıda verilmiştir:

$$\% \text{Biyogiderim} = \left( \frac{C_0 - C_f}{C_0} \right) \times 100$$

$C_0$  : Başlangıç kirletici konsantrasyonu (mg/L)

$C_f$ : Ortamda kalan kirletici konsantrasyonu (mg/L)

$q_m$ : Mikrobiyal biyokütlenin gramı başına ortamdan uzaklaştırılan kirletici konsantrasyonu (mg/g) biyogiderim kapasitesi kütle dengesi prensibine dayalı olarak şu formül ile hesaplanmıştır:

$$qm = [(C_0 - C_f)]/Xm$$

$X_m$  : Mikroorganizmaların kuru ağırlığı (g/L)

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Tez çalışmasında Çubuk (Keçiören, Ankara) Çayı Gümüşdere Mahallesi noktasından alınan su örneklerinden elde edilen karışık bakteriyel kültür ile bu kültürden izole edilen saf bakteriyel kültürler kullanılarak ağır metal ve SNB boya biyogiderim kapasiteleri araştırılmıştır. Farklı pH değerleri, başlangıç kirletici konsantrasyonu ve başlangıç biyokütle konsantrasyonunun biyogiderime olan etkisi incelenmiştir. Yapılan deneylerde etkin biyogiderim sağlayan bakteriyel kültürler izole edilerek saflaştırılmış ve tanımlanmıştır. Bu bakterilerin ağır metal ve boya giderim etkinlikleri araştırılmıştır. Bununla birlikte, ATR-FTIR analizleri ile kirleticinin biyogideriminden sorumlu bakteri yüzeyindeki fonksiyonel gruplar tespit edilmiştir. SEM analizleriyle de bakterilerin kirletici içeren ortamdaki morfolojik değişimleri incelenmiştir.

##### 4.1 Karışık Bakteriyel Kültürün Ağır Metal ve SNB Biyogiderimi

Karışık bakteriyel kültürle ait biyogiderim denemeleri için, farklı konsantrasyonlarda ağır metal ve SNB boya içeren sıvı besiyerleri 50 mL'lik erlenlerde 20'şer mL olacak şekilde hazırlanmış ve elde edilen biyogiderim değerleri çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

10.5 mg/L Cr(VI) ve 50.3 mg/L SNB içeren besiyerinde inkübasyon süresi sonunda Cr(VI) giderimi %79.8 ve SNB giderimi %66.1 olarak bulunmuştur. Diğer bir ağır metal olan Ni(II) ve SNB içeren aynı tip besiyerinde ise Ni(II) gideriminin sağlanamadığı ve SNB gideriminin %70.7 verim ile yapıldığı belirlenmiştir. Cr(VI) içeren ortamda daha yüksek giderim kapasitesi gözlemlenmiştir ve denemelere Cr(VI) içeren ortamlar ile devam edilmiştir.

Çizelge 4.1 Karışık mikrobiyal kültürün ağır metal (Cr(VI) ve Ni(II)) ve SNB biyogiderim değerleri (Sıcaklık: 30±1 °C; Çalkalama hızı: 100 rpm; İnkübasyon süresi: 5 gün)

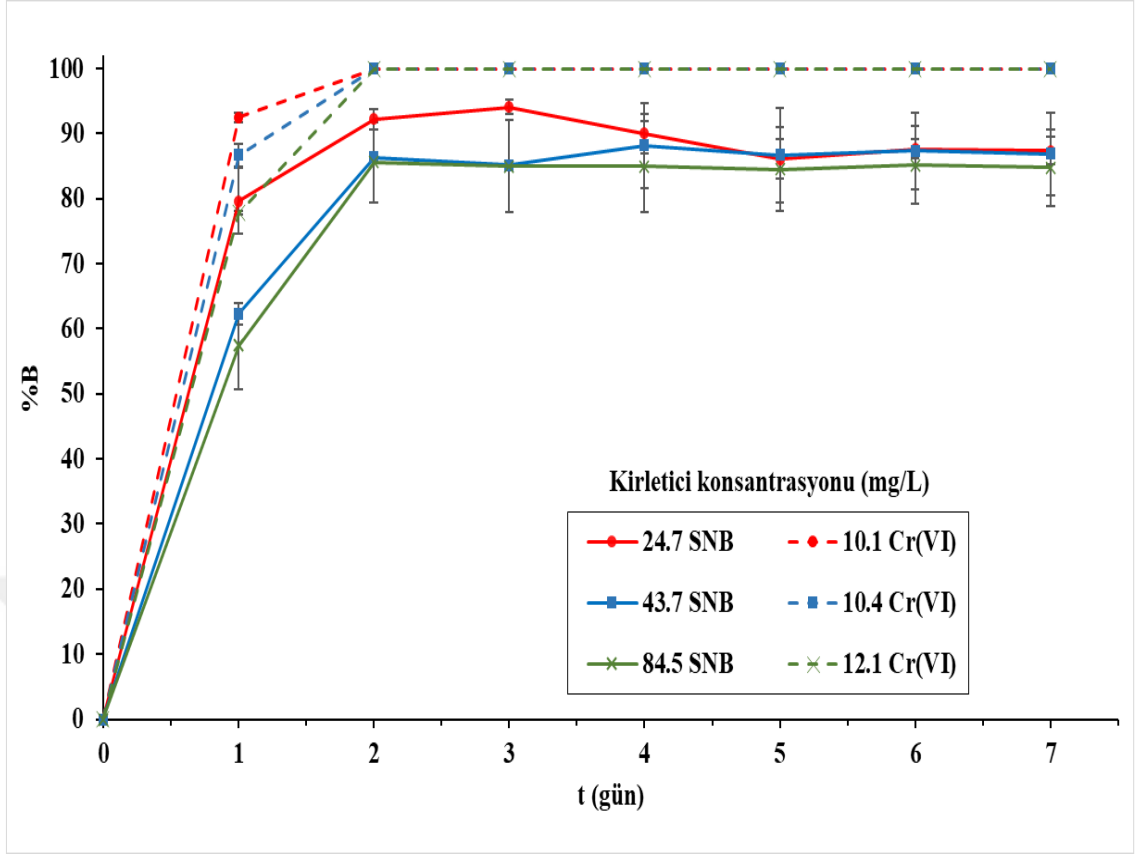
|                             | Kirletici    |      |              |      |
|-----------------------------|--------------|------|--------------|------|
|                             | Cr(VI) + SNB |      | Ni(II) + SNB |      |
| <b>C<sub>0</sub> (mg/L)</b> | 10.5         | 50.3 | 10.0         | 50.3 |
| <b>%B</b>                   | 79.8         | 66.1 | -            | 70.7 |

#### 4.2 Başlangıç pH Değerinin Karışık Bakteriyel Kültürün İkili Kirletici Biyogiderim Kapasitesine Etkisi

Cr(VI) ve SNB biyogideriminin en etkin şekilde yapıldığı optimum pH değerini araştırmak amacıyla, yaklaşık 25 mg/L Cr(VI) ve 50 mg/L SNB içeren farklı pH değerlerinde hazırlanmış besiyerlerine karışık kültürden ekim yapılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda besiyerlerindeki kirleticiler için elde edilen biyogiderim verileri çizelge 4.2’de özetlenmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, Cr(VI) test edilen tüm pH seviyelerinde %96.3 ile %97.5 arasında değişen yüksek verimlerle uzaklaştırılmıştır. Bununla birlikte, SNB giderim verimleri pH 8 (%78.5) ve pH 9’da (%76) en yüksek değere ulaşmıştır. Bu nedenle, sonraki deneylerde pH 8’de hazırlanan ortamlar kullanılmıştır.

Çizelge 4.2 Başlangıç pH değerlerinin karışık mikrobiyal kültürün Cr(VI) ve SNB boya biyogiderimleri üzerindeki etkisi (Sıcaklık (T): 30±1 °C; Çalkalama Hızı: 100 rpm; İnkübasyon süresi: 7 gün)

| pH         | Cr(VI)                |            | SNB                   |            |
|------------|-----------------------|------------|-----------------------|------------|
|            | C <sub>0</sub> (mg/L) | %B         | C <sub>0</sub> (mg/L) | %B         |
| <b>6.0</b> | 23.3                  | 96.6 ± 0.8 | 52.0                  | 66.2 ± 8.4 |
| <b>7.0</b> | 24.3                  | 97.3       | 50.5                  | 68.2 ± 1.7 |
| <b>8.0</b> | 29.1                  | 96.3       | 55.8                  | 78.5 ± 7.3 |
| <b>9.0</b> | 25.1                  | 97.5 ± 0.3 | 50.6                  | 76.0 ± 2.1 |



Şekil 4.1 Artan boya konsantrasyonunun karışık mikrobiyal kültürün Cr(VI) ve SNB biyogiderim kapasitesine etkisi (pH: 8; Sıcaklık: 30±1 °C; Çalkalama hızı: 100 rpm; Biyokütle konsantrasyonu: %1 (v/v); İnkübasyon süresi: 7 gün)

#### 4.3 Artan SNB Konsantrasyonunun Karışık Bakteriyel Kültürün İkili Kirlenici Biyogiderim Kapasitesine Etkisi

Yapılan deneylerde, başlangıç Cr(VI) konsantrasyonu yaklaşık 10 mg/L olan, pH değeri 8'e ayarlanmış besiyerlerinde 7 günlük inkübasyon süresince, farklı SNB konsantrasyonlarının (24.7 mg/L, 43.7 mg/L, 84.5 mg/L) karışık kültürün biyogiderim kapasitesine olan etkisi incelenmiş ve biyogiderim değerleri şekil 4.1'de gösterilmiştir.

İnkübasyon süresinin ikinci gününde denenen tüm SNB konsantrasyonlarında Cr(VI)'nın ortamdan tamamen giderildiği gözlemlenmiştir. Başlangıç SNB konsantrasyonu 24.7 mg/L olan ortamda inkübasyon süresinin birinci gününde %79.6 oranında boya giderimi gerçekleşmiş ve yedinci günün sonunda aynı ortamda gerçekleşen boya giderimi en yüksek verimle %87.4 olarak bulunmuştur.

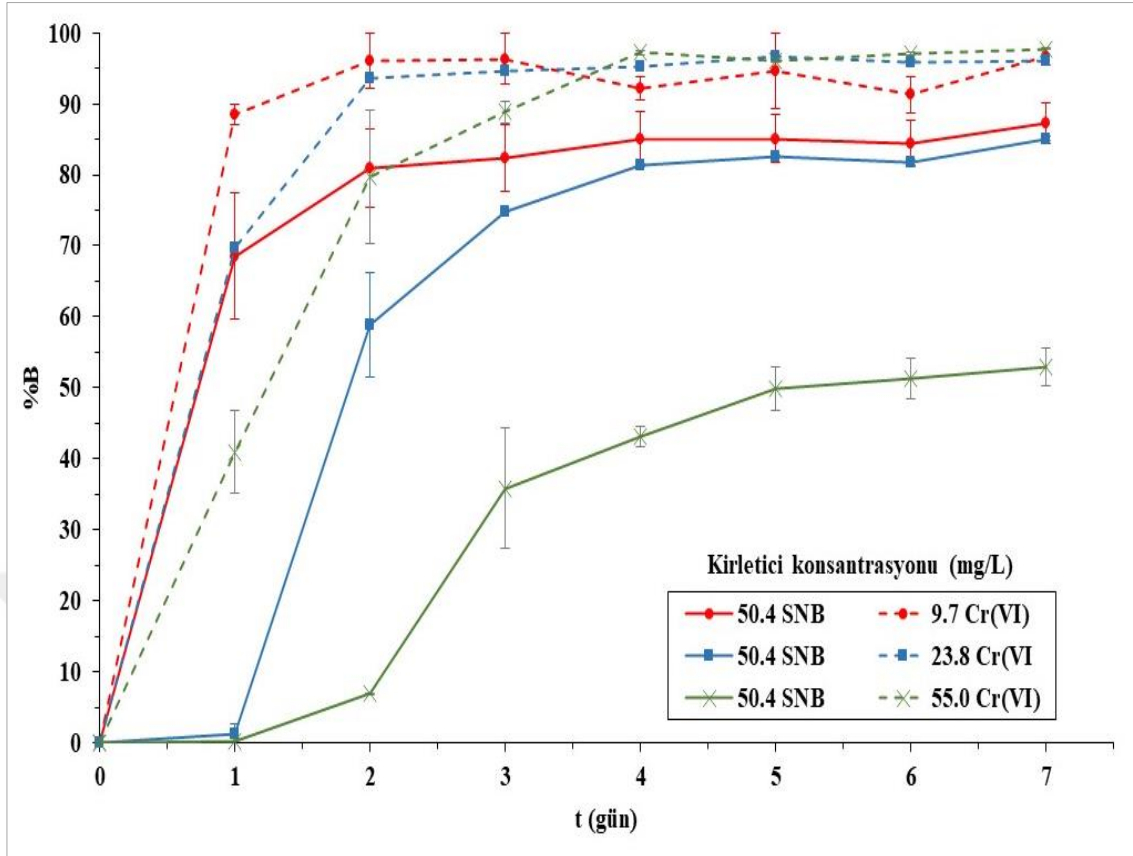
Başlangıç boya konsantrasyonu 43.7 mg/L'ye çıkarıldığında, inkübasyon süresinin birinci gününde %62.3 verimle boya giderimi sağlanmış ve yedinci günün sonunda giderimin %86.9 oranında verimle gerçekleştiği gözlemlenmiştir.

Denemelerde kullanılan en yüksek boya konsantrasyonunda (84.5 mg/L) ise, inkübasyon süresinin sonunda %84.8 verim elde edilmiştir. Sabit Cr(VI) konsantrasyonuna sahip ortamda boya konsantrasyonunun artması ile boya gideriminin hafifçe azaldığı gözlenmiştir.

#### **4.4 Artan Cr(VI) Konsantrasyonunun Karışık Bakteriyel Kültürün İkili Kirlenici Biyogiderim Kapasitesine Etkisi**

Çalışmalar için belirlenen optimum pH olan 8 değerinde gerçekleşen deneylerde, başlangıç Cr(VI) konsantrasyonu 9.7 mg/L ve SNB konsantrasyonu 50.4 mg/L olan besiyerinde inkübasyon süresinin birinci gününde Cr(VI) ve SNB biyogiderim verimleri sırasıyla %88.5 ve %68.5 olarak ölçülmüş ve inkübasyon süresinin sonunda biyogiderim verimleri %96.6 ve %87.3'e ulaşmıştır.

Artan konsantrasyonda Cr(VI) içeren ortamlarda yapılan biyogiderim çalışmalarında inkübasyon süresi sonunda gözlenen değerler şu şekildedir; 23.8 mg/L başlangıç Cr(VI) konsantrasyonunda Cr(VI) giderimi %96, SNB giderimi %85.1; 55 mg/L ağır metal konsantrasyonunda Cr(VI) giderimi %97.7, SNB giderimi %52.9'a ulaşmıştır. Çalışmanın verileri şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2 Artan Cr(VI) konsantrasyonunun karışık mikrobiyal kültürün Cr(VI) ve SNB biyogiderim kapasitesine etkisi (pH:8; Sıcaklık: 30±1 °C; Çalkalama hızı: 100 rpm; Biyokütle konsantrasyonu: %1 (v/v); İnkübasyon süresi: 7 gün)

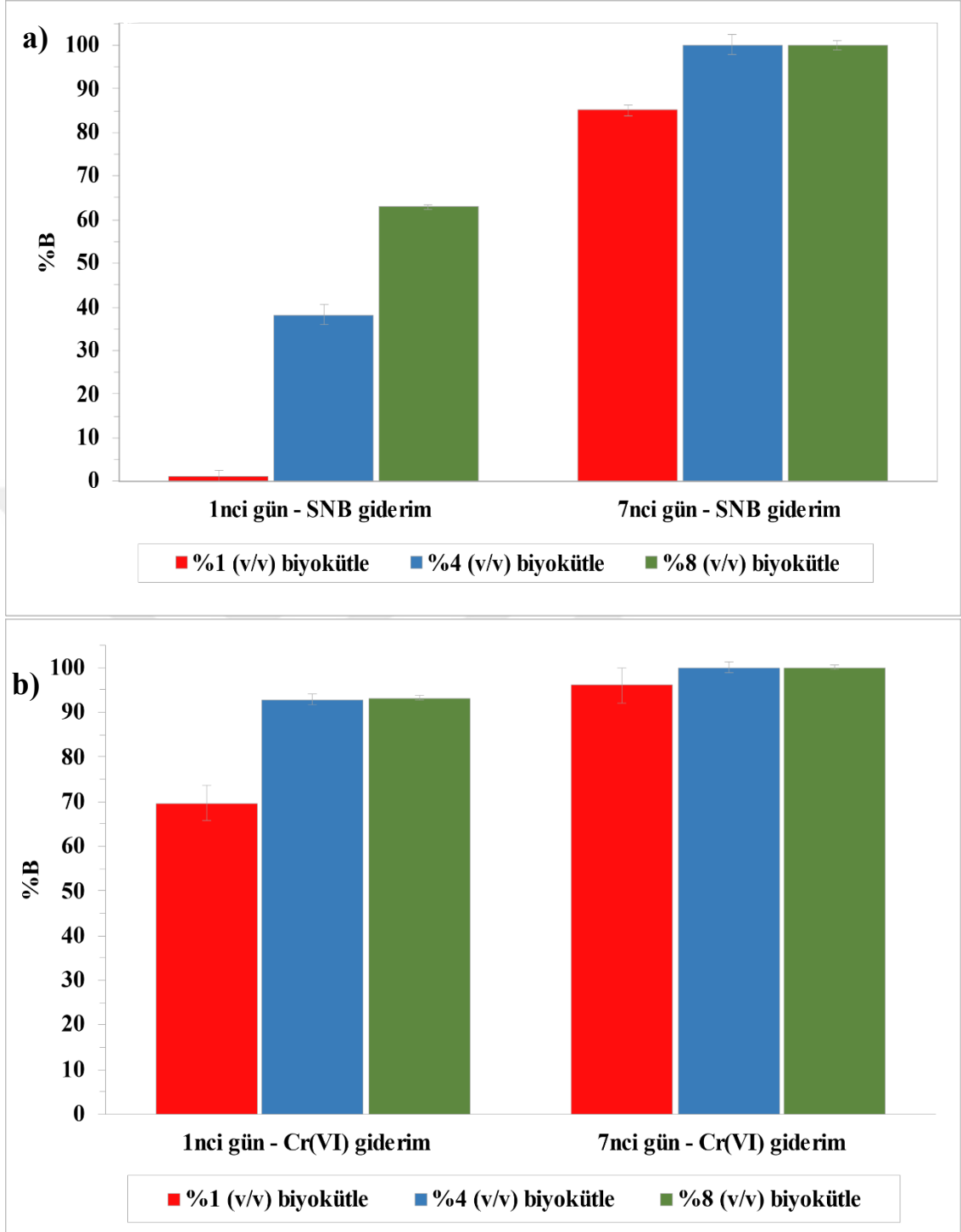
#### 4.5 Artan Biyokütle Konsantrasyonlarının Karışık Bakteriyel Kültürün İkili Kirlenici Biyogiderim Kapasitesine Etkisi

Şekil 4.3.a ve şekil 4.3.b’de özetlenen verilere göre, 25 mg/L Cr(VI) ve 50 mg/L SNB başlangıç konsantrasyonlarına sahip %1, %4 ve %8 (v/v) biyokütle konsantrasyonlarına sahip örneklerde boya giderim verimleri inkübasyon süresinin birinci gününde sırasıyla %1.3, %38.2 ve %62.9 olarak hesaplanmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda %1 (v/v) biyokütle içeren ortamda boya giderim verimi %85.1 ve diğer test edilen biyokütlelerde %100 olarak elde edilmiştir.

Cr(VI) biyogiderimi inkübasyon süresinin birinci gününde %1 (v/v) biyokütle konsantrasyonuna sahip ortamda %69.7 iken %4 ve %8 (v/v) biyokütle

konsantrasyonlarında verimin sırasıyla %92.8 ve %93.1 olduğu gözlemlenmiştir. İnkübasyon süresinin beşinci gününde %4 ve %8 (v/v) biyokütle konsantrasyonlarına sahip örneklerde Cr(VI)'nın tamamı giderilmiş ve yedinci gün yapılan ölçümlerde %1 (v/v) biyokütle konsantrasyonuna sahip ortamda Cr(VI) neredeyse tamamen (%96 verim ile) ortamdan uzaklaştırılmıştır. Biyokütle konsantrasyonu arttıkça, biyogiderim için gereken sürenin 7 günden 5 güne kısaldığı ve test edilen karışık kültür tarafından her iki kirletici için biyogiderim veriminin arttığı açıkça görülmektedir.



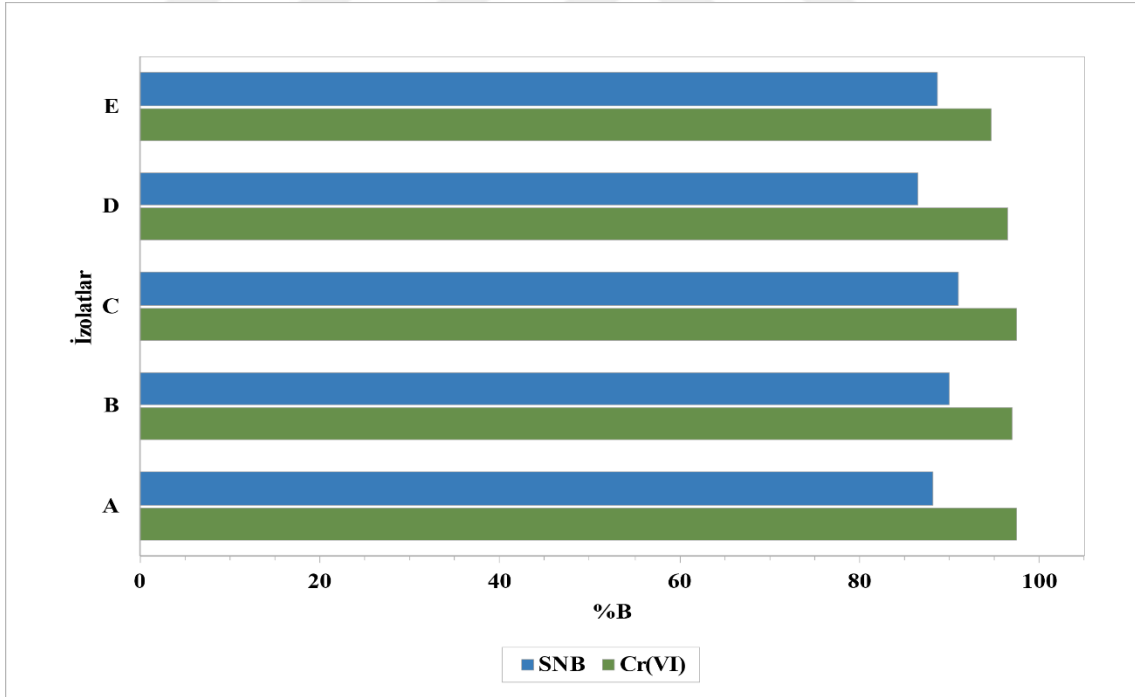


Şekil 4.3 Artan biyokütle konsantrasyonunun 50 mg/L SNB (a) ve 25 mg/L Cr(VI) (b) içeren ortamda karışık mikrobiyal kültürün biyogiderim kapasitesine etkisi (pH:8; Sıcaklık: 30±1 °C; Çalkalama hızı: 100 rpm; Biyokütle konsantrasyonu: %1 (v/v), %4 (v/v), %8 (v/v); İnkübasyon süresi: 7 gün)

#### 4.6 Karışık Bakteriyel Kültürden İzole Edilen Saf Kültürler ile Yapılan İkili Kirlетici Biyogiderim Çalışmaları

Deneylerde kullanılmak üzere saf kültür çalışmaları için Nutrient Agar besiyerinde gelişen izolatlar arasında morfolojik olarak farklılık gösteren beş koloni saflaştırılmış (izolat A, B, C, D ve E) ve Gram boyama tekniğı kullanılarak mikroskop altında analiz edilmiştir. Bu örneklerin arasından üçünün Gram pozitif-çubuk (İzolat B, C ve E), birinin Gram pozitif-kok (İzolat D) ve diğerinin de Gram negatif-çubuk (İzolat A) yapıda olduğu gözlemlenmiştir.

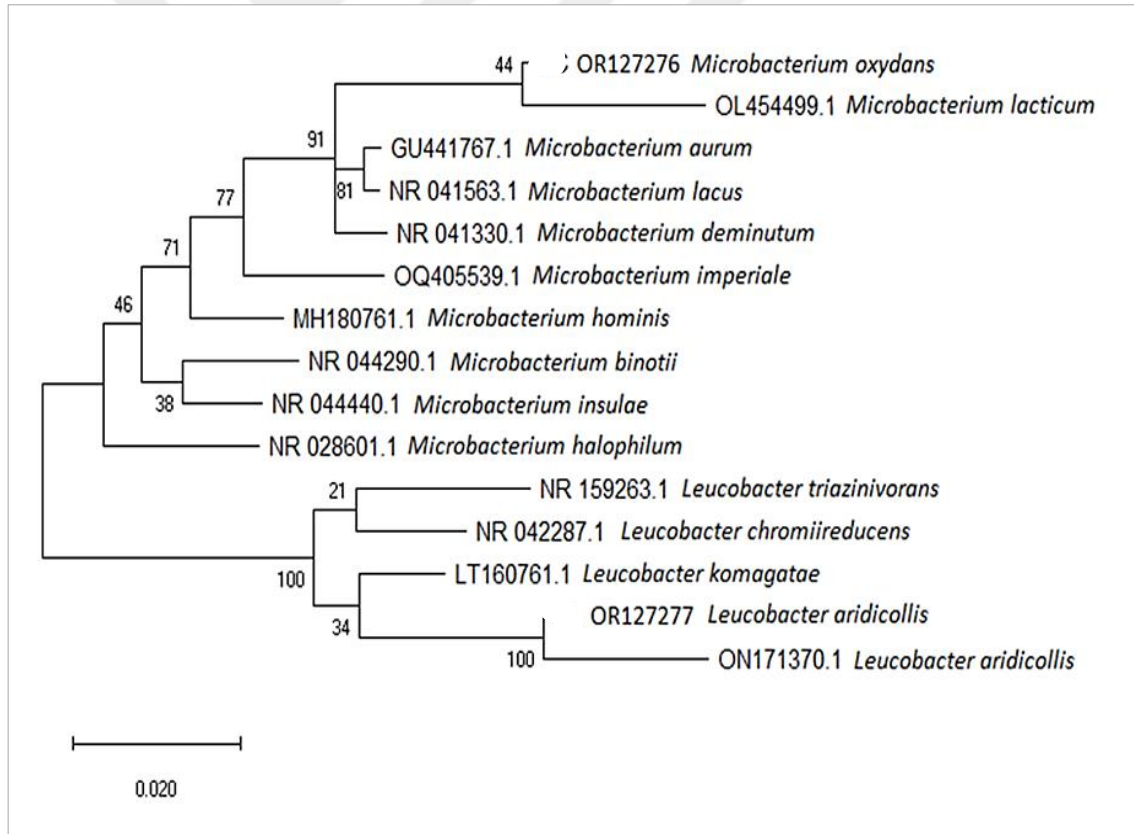
Saf kültürlerin 26.1 mg/L Cr(VI) ve 46.5 mg/L SNB konsantrasyonuna sahip ortamdaki biyogiderim verimleri şekil 4.4'te gösterilmiştir. Tüm izolatlar yüksek verim ile (%91-97.5) ortamdaki kirlетicileri gidermiştir. Saf kültürlerin inkübasyon süresince biyogiderim verimleri karşılaştırıldığında, bu kültürlerin arasında ikili kirlетici giderimi için en yüksek biyogiderim verimi sağlayanların B ve C izolatları olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.4 Karışık mikrobiyal kültürden elde edilen saf kültürlerin Cr(VI) ve SNB içeren besiyerlerindeki biyogiderim kapasiteleri (C<sub>0</sub>-Cr(VI): 26.1 mg/L; C<sub>0</sub>-SNB: 46.5 mg/L; pH: 8; Sıcaklık: 30±1 °C; Çalkalama hızı: 100 rpm; Biyokütle konsantrasyonu: %8 (v/v); İnkübasyon süresi: 5 gün)

Beş günlük inkübasyon süresinin sonunda izolat B için giderim yüzdeleri %96.9 (Cr(VI)) ve %89.9 (SNB), izolat C için ise %97.5 (Cr(VI)) ve %91.0 (SNB) olmuştur.

Seçilen iki izolatın tür tayini için 16S rDNA dizileme yapılmış ve elde edilen diziler filogenetik analiz için BLAST programında aratılmıştır. Yapılan analizler neticesinde B izolatının *Microbacterium oxydans* ile %100 ve C izolatının *Leucobacter aridicollis* ile %100 benzerlik gösterdiği ortaya konulmuştur. Bakterilerin NCBI GenBank veri tabanına *Microbacterium oxydans* için OR127276 ve *Leucobacter aridicollis* için OR127277 erişim numaraları ile kayıtları sağlanmıştır. Bakterilerin filogenetik ağacı şekil 4.5'te verilmiştir.

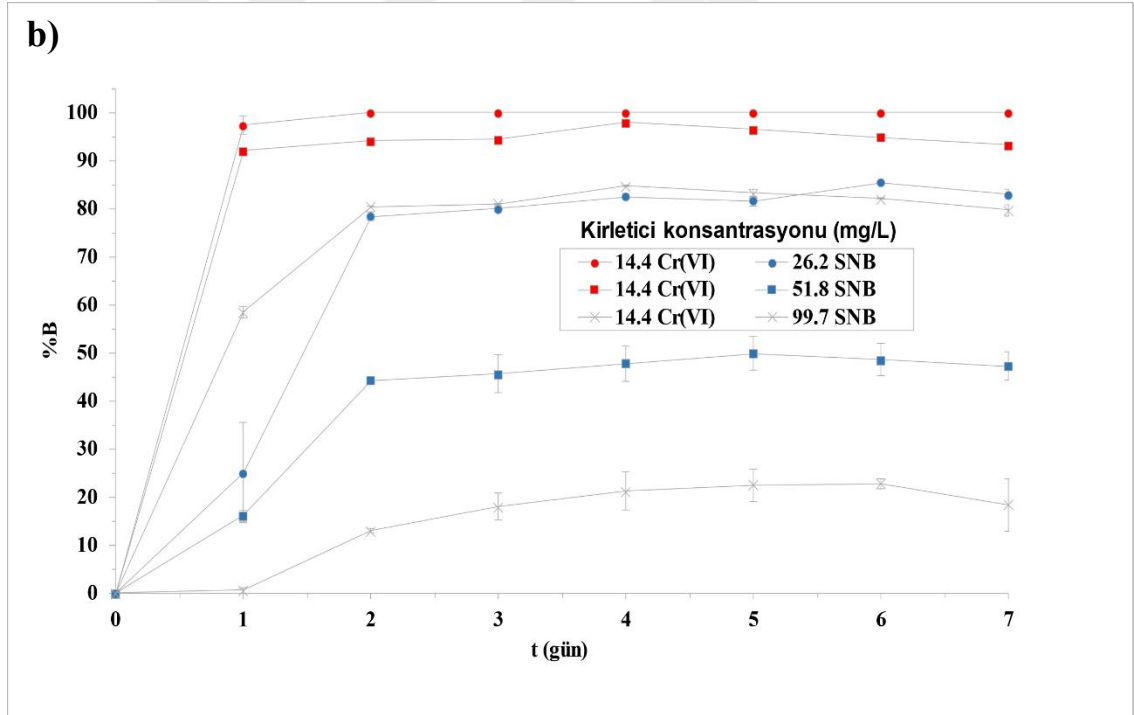
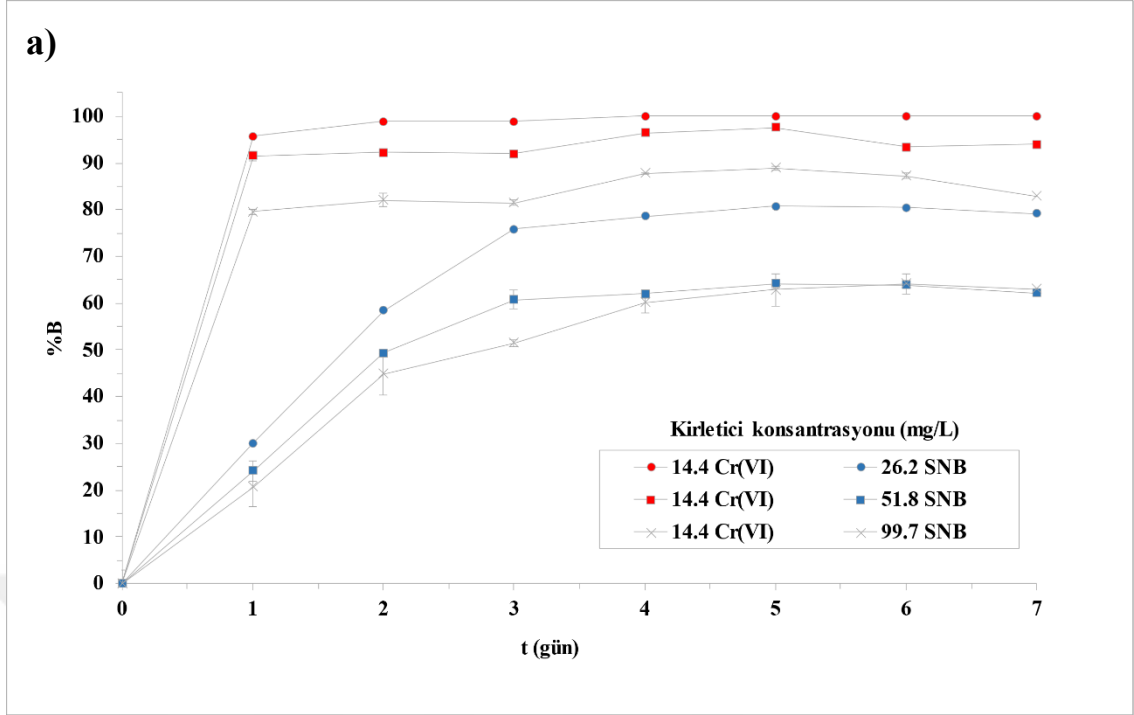


Şekil 4.5 *M. oxydans* (OR127276) ve *L. aridicollis* (OR127277) filogenetik ağacı

En yüksek kapasite ile biyogiderim yapan *M. oxydans* ve *L. aridicollis* suşlarının sabit başlangıç konsantrasyonu 14.4 mg/L olan Cr(VI) ve artan konsantrasyonlarda (26.2, 51.8 ve 99.7 mg/L) SNB içeren besiyerlerinde biyogiderim kapasiteleri incelenmiştir.

*M. oxydans* suşu 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, 14.4 mg/L Cr(VI) ve 26.2 mg/L SNB içeren ortamdaki Cr(VI)'u %95.7'lik bir verim ile giderirken SNB giderim verimi %30 olarak gözlemlenmiştir. Aynı ortamda, 7 günlük inkübasyon süresi sonunda, Cr(VI) tamamen ortamdaki uzaklaştırılırken, boya giderim verimi %79.2'ye ulaşmıştır. Sabit Cr(VI) konsantrasyonunu içeren besiyerinde, SNB konsantrasyonlarının artırılması ile boya giderim verimi inkübasyon süresi sonunda %62.1 ve %63 olarak bulunmuştur. Boya konsantrasyonunun en yüksek olduğu ortamda (99.7 mg/L) Cr(VI) giderim veriminin %82.8'e ulaştığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.6a).

*L. aridicollis* suşu yine aynı kirletici konsantrasyonlarına sahip ortamlarda düşük boya konsantrasyonunda (26.2 mg/L) 7 günlük inkübasyon süresi sonunda %83 verim ile giderim yapmış, ilk 24 saat içerisinde ortamdaki Cr(VI)'u ise tamamen gidermiştir. Boya konsantrasyonlarının artması ile, inkübasyon süresi sonunda, 51.8 mg/L SNB konsantrasyonunda %47.2 verim gösterirken, 99.7 mg/L SNB konsantrasyonunda %18.3 verim ile giderim sağlamıştır. Ortamdaki Cr(VI) giderim verimi de %93.2 ve %79.6 olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmanın sonuçları şekil 4.6.b'de gösterilmiştir.



Şekil 4.6 Sabit Cr(VI) başlangıç konsantrasyonuna (14.4 mg/L) sahip ve artan konsantrasyonlarda SNB içeren besiyerlerinde (a) *M. oxydans* ve (b) *L. aridicollis* suşlarının biyogiderim kapasitesi (pH: 8; Sıcaklık: 30±1 °C; Çalkalama hızı: 100 rpm; Biyokütle konsantrasyonu: %8 (v/v); İnkübasyon süresi: 7 gün)

Artan boya konsantrasyonlarında her iki suşa ait 1 gram biyokütle başına ortamda giderilen Cr(VI) ve SNB miktarları çizelge 4.3'te gösterilmiştir. Boya konsantrasyonu 26.2 mg/L olduğu ortamda boya  $q_m$  değeri *M. oxydans* için 3.7 mg/g iken, *L. aridicollis* için 3.09 mg/g olarak bulunmuştur. Ortamdaki boya konsantrasyonu yaklaşık iki katına çıkartıldığında (51.8 mg/L)  $q_m$  değerleri sırasıyla 6.2 mg/g ve 4.7 mg/g, boya konsantrasyonu 99.7 mg/L iken  $q_m$  değerleri 13.4 mg/g ve 3.85 mg/g olarak bulunmuştur. Her iki suş ortamda bulunan Cr(VI) biyogiderimini yakın verim ile sağlarken, *L. aridicollis* suşu artan SNB konsantrasyonlarında *M. oxydans*'a kıyasla olumsuz etkilenerek daha düşük bir verim ile SNB biyogiderimi sağlamıştır.

Çizelge 4.3 Artan boya konsantrasyonlarında *M. oxydans* ve *L. aridicollis*'in maksimum spesifik SNB ve Cr(VI) giderimleri (pH: 8; Sıcaklık: 30±1 °C; Çalkalama hızı: 100 rpm; Biyokütle konsantrasyonu: %8 (v/v); İnkübasyon süresi: 7 gün)

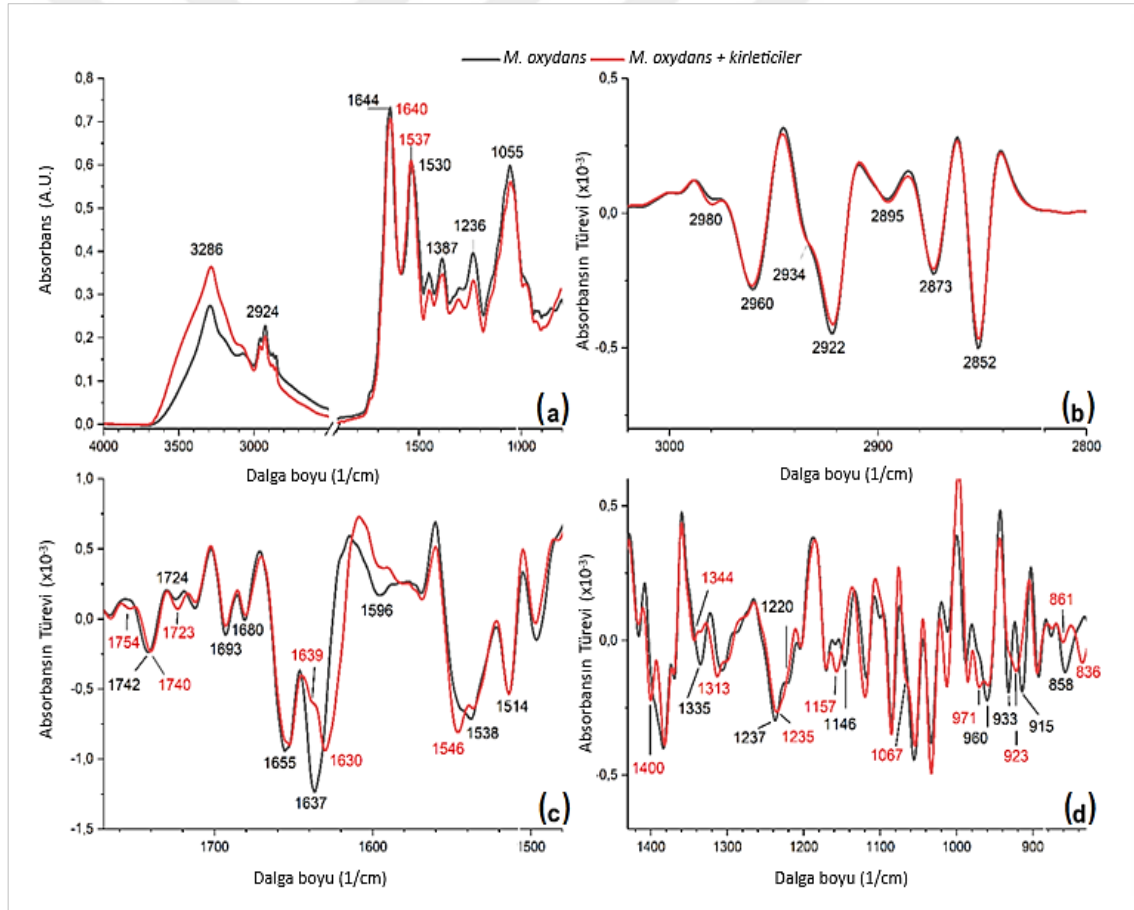
| C <sub>0</sub> (mg/L) |        | <i>M. oxydans</i> |             | <i>L. aridicollis</i> |              |
|-----------------------|--------|-------------------|-------------|-----------------------|--------------|
|                       |        | $q_m$ (mg/g)      |             | $q_m$ (mg/g)          |              |
| SNB                   | Cr(VI) | SNB               | Cr(VI)      | SNB                   | Cr(VI)       |
| 26.2                  | 14.4   | 3.70 ± 0.10       | 2.60        | 3.09 ± 0.02           | 2.05         |
| 51.8                  | 14.4   | 6.20 ± 0.05       | 2.60 ± 0.01 | 4.70 ± 0.30           | 2.60 ± 0.005 |
| 99.7                  | 14.4   | 13.4 ± 0.45       | 2.55 ± 0.05 | 3.85 ± 1.20           | 2.40 ± 0.035 |

#### 4.7 *M. oxydans* ve *L. aridicollis* Suşlarının FTIR Analizi

Bir bakterinin FTIR spektrumu, altta yatan moleküler yapısına göre bölgelere ayrılabilir. 3300/1 cm'de merkezlenen geniş bant O-H ve N-H germe titreşimlerine karşılık gelir. 3000-2800 1/cm bölgesi, yağ asitlerindeki C-H germe titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. Çeşitli proteinler, peptitler ve enzimler 1700-1500 1/cm bölgesinde amid I ve II bantlarını üretir. 1500-1200 1/cm bölgesi, protein amid III bandı, yağ asitleri ve fosfat grupları gibi çeşitli katkıda bulunanlar nedeniyle daha karmaşıktır. RNA/DNA

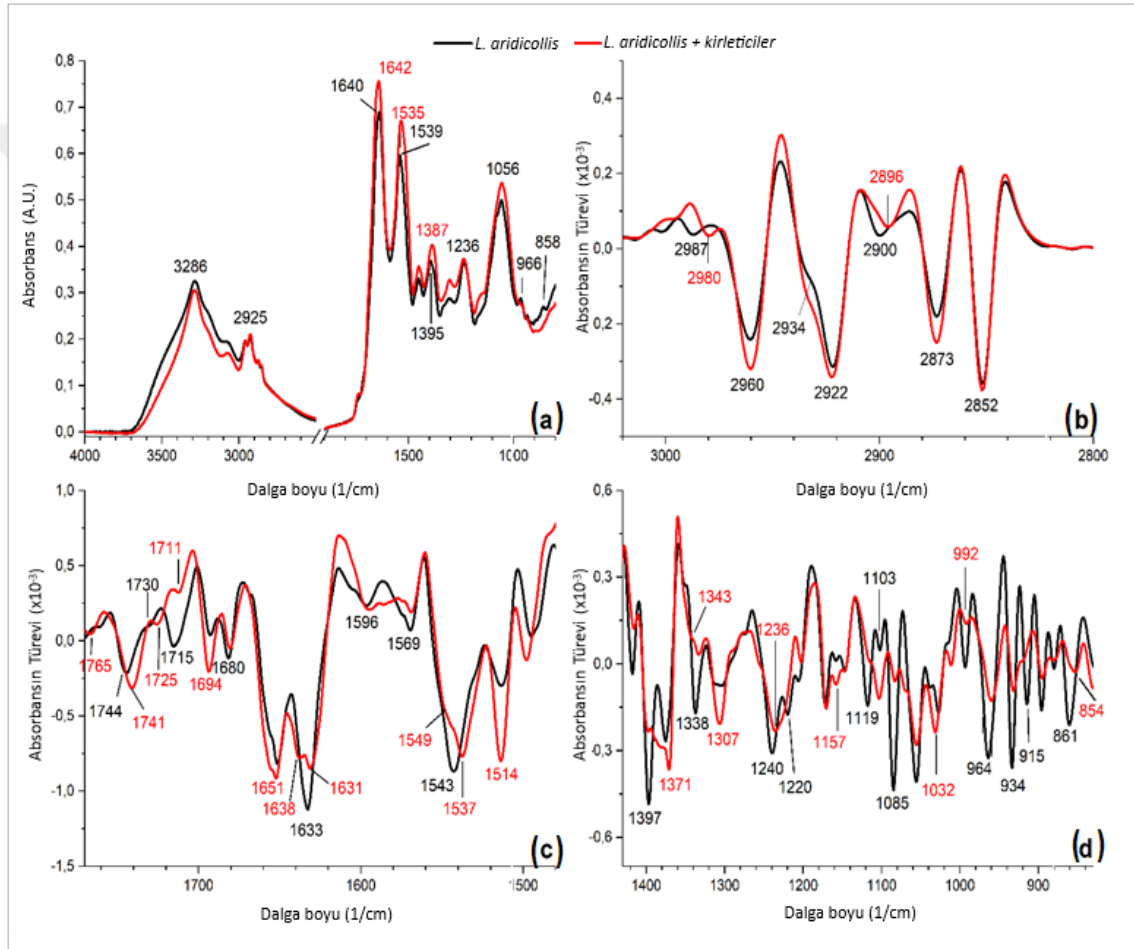
fonksiyonel grupları, hücre duvarındaki polisakkaritlerle birlikte 1200-900 1/cm bölgesinde ortaya çıkar (Kardas vd. 2014, Talari vd. 2017).

*M. oxydans* analizi yukarıda listelenen tüm ana pikleri göstermiştir (Şekil 4.7.a). Kirleticilerin varlığında büyütülen aynı bakteri, kirleticilerin yokluğunda geliştirilene kıyasla 3500, 1640, 1530, 1055, 972, 932 ve 915 1/cm pozisyonlarında absorbens değişimleri göstermiştir. Bu iki spektrumun ikinci türev profilleri protein amid I ve amid II bantlarında 1724, 1400, 1382, 1342, 1300, 1220, 1146, 1013, 970 ve 914 1/cm'de ilave farklılıklar göstermiştir (Şekil 4.7.c, d). Bu değişiklikler, *M. oxydans*'ın hızlı ve kademeli kadmiyum (Cd) biyobirikiminin etkilerini araştıran önceki bir çalışmanın bulgularıyla uyumludur (Kepenek vd. 2019).



Şekil 4.7 (a) 14.4 mg/L Cr(VI) ve 26.1 mg/L SNB içeren (kırmızı) ve kirleticiler içermeyen (siyah) besiyerinde geliştirilen *M. oxydans*'ın FTIR spektrumları. Hesaplanan ikinci türev profilleri lipid bölgesi için (b); lipid C=O ve protein amit I ve II piklerini gösteren 1770-1490 1/cm penceresi için (c); ve parmak izi bölgesi için (d) gösterilmiştir.

Aynı kirleticilerle veya kirleticiler olmayan besiyerinde gelişen *L. aridicollis*'in FTIR spektrumları şekil 4.8.a'da gösterilmiştir. Kirleticilerle geliştirilen bakteri yüksek frekanslı lipid bölgesinde (3000-2800 1/cm), protein amid I ve II bölgelerinde (1700-1500 1/cm), O-H germe modlarına atanan 3500 1/cm'de, lipid C=O titreşimine atanan 1740 1/cm'de ve parmak izi bölgesinde 1335, 1161, 1083, 967, 935 ve 860 1/cm'de değişiklikler göstermiştir. İkinci türev profili de bu değişimleri doğrulamıştır (Şekil 4.8. b, d).



Şekil 4.8 (a) 14.4 mg/L Cr(VI) ve 26.1 mg/L SNB içeren (kırmızı) ve kirletici içermeyen (siyah) besiyerinde geliştirilen *L. aridicollis* FTIR spektrumları. Hesaplanan ikinci türev profilleri lipit bölgesi için (b); lipit C=O ve protein amit I ve II piklerini gösteren 1770-1490 1/cm penceresi için (c); ve parmak izi bölgesi için (d) gösterilmiştir.

Gözlenen değişiklikleri ölçmek için lipid, protein ve nükleik asit içeriğine karşılık gelen piklerin alanları, normalize edilmiş absorbans spektrumlarından piklerin entegre edilmesiyle hesaplanmıştır. Bu hesaplamaların sonuçları çizelge 4.4'te belirtilmiştir.

Çizelge 4.4 Pik alanı hesaplama sonuçları normalize edilmiş absorbans spektrumlarından elde edilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veriler tekrarlanan ölçümlerin ortalaması  $\pm$  standart sapma olarak sunulmuştur.

|                                          | Lipid içeriği           | Ester C=O              | Protein yapısı         | Lipid protein oranı                 | Nükleik asit           |
|------------------------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------------------|------------------------|
|                                          | $A_{(3000+2830)}$       | $A_{1740}$             | $A_{1640}$             | $A_{(3000+2830)} / A_{(1640+1536)}$ | $A_{(1232+1085)}$      |
| <i>M. oxydans</i>                        | $7.907 \pm 0.032$       | $0.900 \pm 0.013$      | $25.2 \pm 0.200$       | $0.211 \pm 0.006$                   | $10.8 \pm 0.152$       |
| <i>M. oxydans</i> (kirleticiler ile)     | $7.246 \pm 0.060^{***}$ | $0.742 \pm 0.014^{**}$ | $27.3 \pm 0.737^{**}$  | $0.167 \pm 0.003^{***}$             | $9.28 \pm 0.138^{***}$ |
| <i>L. aridicollis</i>                    | $5.811 \pm 0.104$       | $0.862 \pm 0.003$      | $24.4 \pm 0.052$       | $0.150 \pm 0.004$                   | $9.59 \pm 0.076$       |
| <i>L. aridicollis</i> (kirleticiler ile) | $7.382 \pm 0.263^{***}$ | $1.059 \pm 0.017^*$    | $27.6 \pm 0.017^{***}$ | $0.171 \pm 0.005^{**}$              | $8.32 \pm 0.182^{***}$ |

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

*M. oxydans*'ın lipid içeriği kirleticilerin varlığında geliştiğinde önemli ölçüde azalmıştır; ancak 3000-2800  $1/\text{cm}$  bölgesinin ikinci türev profilinde gösterildiği gibi lipid yapısı değişmemiştir (Şekil 4.7.b). Küçülen lipit alanı, membranda daha kısa zincirli lipitlerin sentezlendiğini gösterebilir (Kardas vd. 2014). Ancak, kirleticiler *L. aridicollis* üzerinde tam tersi bir etki yaratmıştır; lipit alanı hesaplama sonuçları lipit içeriğinin kontrole kıyasla önemli ölçüde arttığını göstermiştir (Çizelge 4.4).  $\text{CH}_2$  ve  $\text{CH}_3$  germe modlarına karşılık gelen büyük pikler konumlarında değişmeden kalırken, diğer C-H germe modları sırasıyla 3001, 2987 ve 2900  $1/\text{cm}$ 'nin 2996, 2980 ve 2896  $1/\text{cm}$ 'ye kayması gibi farklılıklar göstermiştir. Bu konumlar geçici olarak lipid açıl zincirleri dışındaki hücre yapılarından kaynaklanan C-H modlarına atanmıştır (Vaynberg ve Ng 2005, Movasaghi vd. 2008). Genel olarak, lipid içeriğindeki bir değişikliği, bant genişliğindeki değişiklikler

olarak gözlemlenebilen ve ölçülebilen ve artan açıl zinciri uzunluğu ile daha düzenli ve daha az akışkan hale gelen membran akışkanlığı farklılıkları izler. Ancak bu çalışmada her iki bakteri için de durum böyle olmamıştır. Bu tür sonuçların, membran tarafından barındırılan molekül ve proteinlerin sayısı ve/veya türündeki değişikliklerden kaynaklandığı öne sürülmüştür (Kardas vd. 2014).

*M. oxydans* için 1740 1/cm bandının alanı kirleticilerin varlığında biraz küçülmüştür. Aynı bölgenin ikinci türevi, kirleticilerle büyütüldüğünde 1742 1/cm bileşeninin 1740 1/cm'ye kaydığını göstermiştir (Şekil 4.7.c). Ayrıca, 1723 1/cm bileşeninin katkısında da bir değişiklik olmuştur. H-bağlı ester C=O gruplarına atanabilir. Bu nedenle, bazı C=O gruplarının H-bağları oluşturduğu, bunun da onları daha düşük bir dalga sayısında konumlandığı ve dolayısıyla 1740 1/cm'deki genel pik alanında bir daralmaya yol açtığı sonucuna varılabilir. Öte yandan, 1740 1/cm bandının genliği *L. aridicollis* için önemli ölçüde yükselmiştir. *L. aridicollis* için aynı bölgenin ikinci türev profili 1744, 1730 ve 1715 1/cm'de bileşenler göstermiştir (Şekil 4.8.c). Kirleticilerle birlikte gelişen aynı bakteri için bu bileşenler 1740, 1725 ve 1712 1/cm'ye taşınmıştır. Her bir bileşenin göreceli oranı da kontrol grubuna kıyasla farklıdır. Yer değiştiren bileşenler ve yüksek pik alanları, çevreyle veya membran bileşenleriyle daha fazla etkileşime giren C=O gruplarının sayısının arttığını göstermektedir. Bu bulgular aynı zamanda C-H germe modlarında (3000-2830 1/cm) gözlenen değişikliklerle de uyumludur.

Protein içeriği ve yapısındaki kirletici kaynaklı değişiklikler amid I bandından takip edilmiştir (Çizelge 4.4). *M. oxydans* için, kütle merkezinden ölçüldüğünde 1644 1/cm'de konumlandırılmıştır. Bu konum, alfa sarmal ve beta tabaka yapılı protein içeriğinin bir karışımını göstermektedir. İkinci türev analizi, 1693, 1680, 1655 ve 1637 1/cm'de amid I bandını oluşturan dört bileşen göstermiştir (Şekil 4.7.c). Kirleticilerle geliştirildiğinde, 1637 bileşeninin yerini karşılaştırılabilir boyutta bir 1630 bileşeni ve ikinci, ancak daha küçük bir 1639 bileşeni almıştır. Amid I pik konumu 1640 1/cm'ye kaymış ve yapıdaki bu değişikliğin bir sonucu olarak bant genişliği düşük dalga sayısı tarafında asimetrik olarak genişlemiştir. Her iki pozisyon, 1637 ve 1630 1/cm, proteinlerin beta tabaka ikincil yapısına atanabilir. Daha güçlü H-bağı ve sıkı paketlenme gibi faktörler beta tabaka sinyali daha düşük dalga sayılarına kaydırır (Korkmaz vd. 2012). Bununla birlikte, 1630

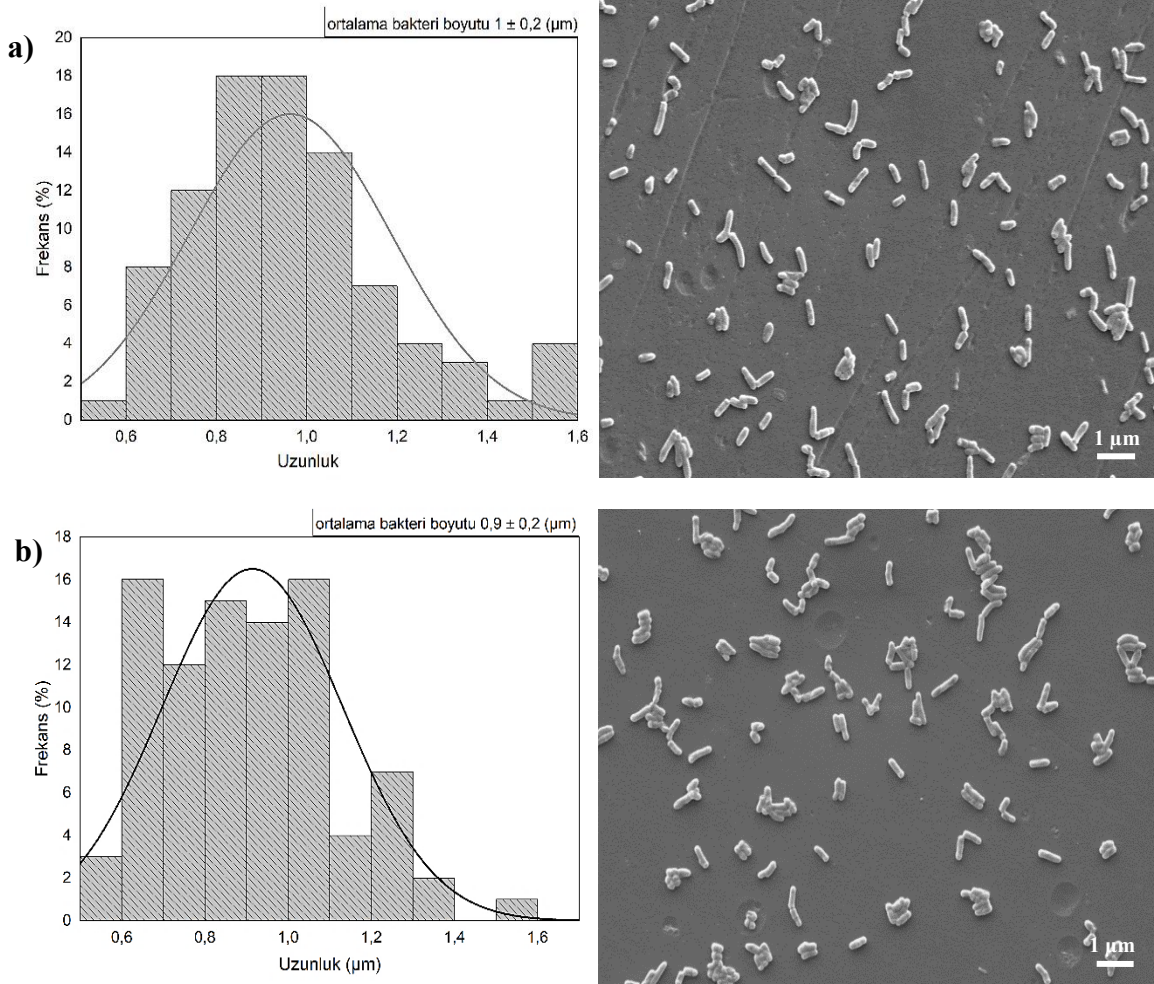
1/cm'deki bileşenin yeni protein yapılarını mı yoksa değişen ortamdan etkilenen mevcut beta tabaka yapılı proteinleri mi temsil ettiği belirsizliğini korumaktadır. Amid I pik alanının da kirleticilerin varlığında önemli ölçüde genişlemesi, daha önce bahsedilen senaryoların her ikisinin de gerçekleşmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Veriler birlikte ele alındığında, *M. oxydans*'ın yeni koşullara uyum sağlaması için protein yapısının ve içeriğinin değiştiğini göstermektedir. *L. aridicollis* için, amid I piki kontrol grubu için 1639 1/cm'de iken, kirleticilerin varlığında 1643 1/cm'ye kaymıştır (Şekil 4.8.a). Bu kayma, ikinci türev profilinde gösterildiği gibi 1652 1/cm bileşenin artan katkısından kaynaklanmıştır (Şekil 4.8.c). Amid I pik alanı da önemli ölçüde artmıştır. *L. aridicollis*'in genel protein içeriğinin, kirleticilerin varlığında artan alfa sarmal ve/veya rastgele yapılı proteinler nedeniyle arttığı ileri sürülebilir. Amid II pik pozisyonuna gelince, 1543 1/cm'den 1538 1/cm'ye kayması ve 1514 1/cm'deki azalan yoğunluk da hücre içindeki protein/enzim popülasyonundaki değişiklikleri doğrulamaktadır. Bazı çalışmalarda, protein konsantrasyonundaki artışın toksik bir ortama maruz kalındığında bir başa çıkma mekanizması olarak hizmet ettiği öne sürülmüştür (Kepenek vd. 2019, Naik ve Dubey 2013, Jaroslawiecka ve Seget 2014, Gupta vd. 1992, Gupta vd. 1993, Nithya vd. 2011). Metal tutucu proteinlerin, metal akış proteinlerinin ve metal ve toksik molekül bağlayıcı transmembran proteinlerinin üretiminin teşvik edilmesi, bu tür ortamlarda hayatta kalma mekanizması olarak önerilmiştir.

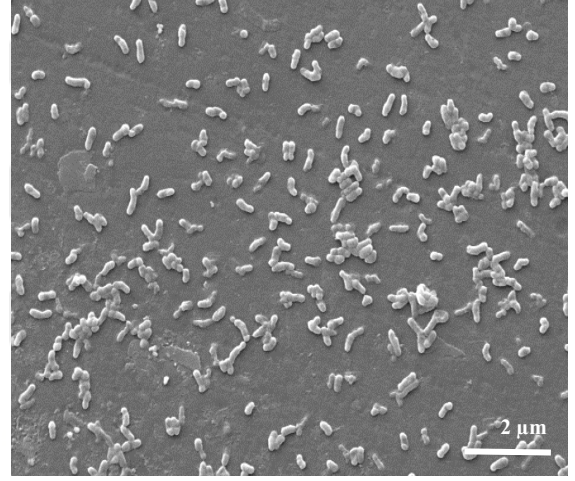
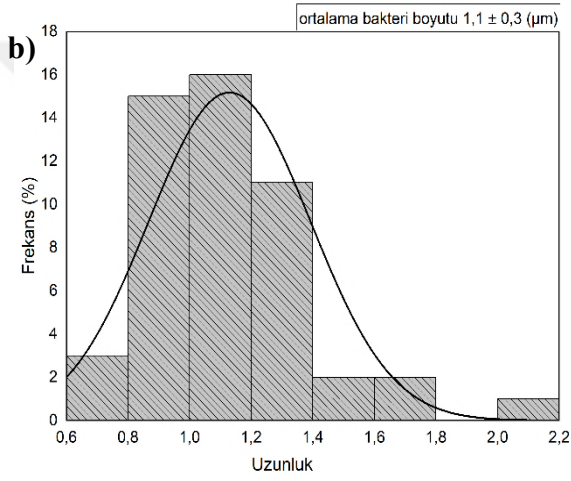
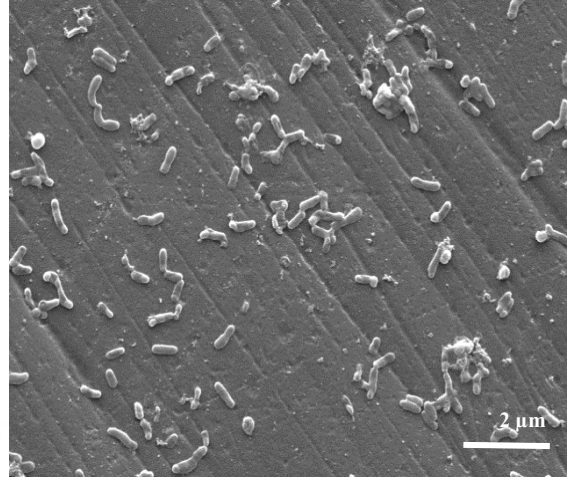
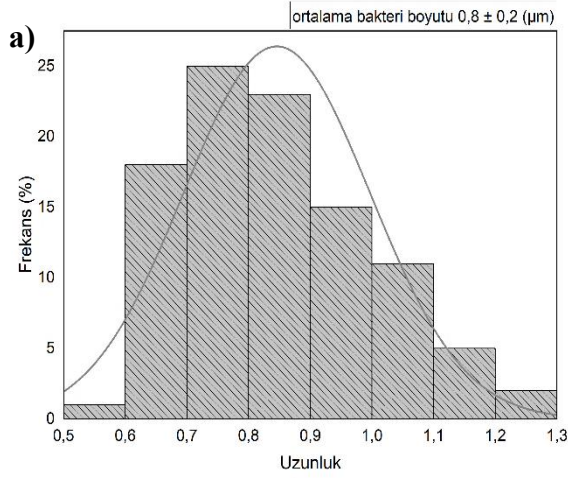
Nükleik asit içeriği, fosfolipid baş gruplarından daha az katkı ile esas olarak RNA ve DNA'dan kaynaklanan fosfat gruplarının asimetric ve simetric gerilme modu ölçülerek incelenmiştir. Her iki bakteride de nükleik asit miktarı önemli ölçüde azalmıştır, bu da DNA/RNA düzeyinde çevresel kirleticilere adaptasyon olduğunu göstermektedir. İkinci türev profilleri de 970, 960, 930 ve 914 1/cm'de değişiklikler göstererek nükleik asit seviyesindeki değişiklikleri doğrulamıştır (Şekil 4.7.d, Şekil 4.8.d).

#### 4.8 *M. oxydans* ve *L. aridicollis* SEM Analizi

Her iki bakteri örnekleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) altında morfolojik açıdan incelendiğinde, 14.4 mg/L Cr(VI) ve 26.1 mg/L SNB içeren besiyerinde gelişen bakterilerin hücre boyutlarında küçülme gözlemlenmiştir. Kirletici içermeyen besiyerinde gelişen *M. oxydans*'ın ortalama hücre boyutu 1  $\mu\text{m}$  olarak ölçülürken, kirletici içeren ortamda 0.9  $\mu\text{m}$  olarak ölçülmüştür (Şekil 4.9). Aynı şekilde *L. aridicollis* suşu için ölçüm yapıldığında, kirletici içeren ortamda gelişen bakterilerin ortalama hücre boyutunun (0.8  $\mu\text{m}$ ) kirletici içermeyen ortamda gelişenlerden (1.1  $\mu\text{m}$ ) ortalama %30 daha küçük olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.9 *M. oxydans*'ın kirletici içermeyen (a) ve içeren (b) ortamdaki hücre boyutu ve SEM görüntüsü



Şekil 4.10 *L. aridicollis*'in kirletici içermeyen (a) ve içeren (b) ortamdaki hücre boyutu ve SEM görüntüsü

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Gerçekleştirilen tez çalışmasında, Çubuk Çayı (Keçiören, Ankara) Gümüşdere Mahallesi noktasından toplanan su örneklerinden elde edilen bakteriyel kültürün farklı ortam koşullarındaki Cr(VI) ve SNB boya giderimi çalışmaları yapılmıştır. Çalışmalarda farklı pH, kirletici ve biyokütle konsantrasyonlarının ikili kirletici biyogiderimi üzerine etkisi test edilmiştir. Bununla birlikte, karışık mikrobiyal kültürden saf kültürler de izole edilmiş, biyolojik arıtım kapasiteleri karşılaştırılarak en yüksek biyoremediasyon kapasitesine sahip mikroorganizmalar tanımlanmış ve bu mikroorganizmaların kirletici gideriminde rol alan fonksiyonel grupları ATR-FTIR analizi ile belirlenmiştir.

Tez çalışmasında, yapılan deneylerde, 10.5 mg/L Cr(VI) ve 50.3 mg/L SNB içeren besiyerinde inkübasyon süresi sonunda Cr(VI) giderimi %79.8 ve SNB giderimi %66.1 olarak bulunmuştur. Diğer bir ağır metal olan Ni(II) ve SNB içeren aynı tip besiyerinde ise Ni(II) gideriminin sağlanamadığı ve SNB gideriminin %70.7 verim ile yapıldığı belirlenmiştir. Cr(VI) içeren ortamda daha yüksek giderim kapasitesi gözlemlenmiştir ve denemelere Cr(VI) ve SNB içeren ortamlar ile devam edilmiştir.

Biyoremediasyon alanında ağır metal ve boyarmadde gideriminde birçok farklı bakteri (Das vd. 2016, Akansha vd. 2019, Yin vd. 2019, Chen vd. 2022) ve bakteri konsorsiyum örneklerinin (Kılıç vd. 2007, Ma vd. 2019, Mohanty ve Kumar 2021, Plestenjak vd. 2022) kullanılmasıyla ilgili çalışmalar incelendiğinde, detoksifikasyon ve degradasyon etkinliğinin biyotik ve abiyotik faktörlerle yakın ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Yapmış olduğumuz deneylerde, daha önceki bu çalışmalara paralel olarak, kullanılan bakteriyel kültürlerin her iki kirletici bulunan ortamda karışık kültür ve saf kültür olarak farklı biyogiderim kapasitelerine sahip olduğu ve her iki şekilde de verimli bir biyogiderim sağladıkları gözlemlenmiştir.

Tamamlanan tez çalışmasında, karışık bakteriyel kültürün biyogiderim verimi dört farklı (6, 7, 8 ve 9) pH seviyelerinde yaklaşık 25 mg/L Cr(VI) ve 50 mg/L SNB içeren besiyerlerinde araştırılmıştır. En yüksek biyogiderimin Cr(VI) ve SNB için pH 8'de

sırasıyla %96.3 ve %78.5 verimle gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Çalışmaların devamında ortam pH derecesi optimum pH değerine göre ayarlanmıştır.

Lyu vd. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, karışık bakteriyel kültür tarafından Cr(VI) giderimi için optimum pH değerinin 7 ila 8 arasında olduğu belirtilmiş ve pH'ın kirleticilerin çözünürlüğü, çeşitliliği ve metabolik faaliyetleri üzerindeki etkisi sebebiyle biyogiderim verimliliğini etkileyebilecek kritik bir faktör olduğunu vurgulamışlardır. Başka bir çalışmada, Kholisa vd. (2021) atıksu arıtma çamurundan izole edilen karışık bakteriyel kültürü kullanarak Cr(VI) giderimi sağlamış ve başlangıç pH'ının artmasıyla Cr(VI) gideriminin arttığını, optimum düzeye pH 7'de ulaştığını ancak pH'ın daha da artması ile Cr(VI) gideriminin azaldığını gözlemlemişlerdir. Ek olarak, Emadi vd. (2022) tarafından yapılan bir çalışmada, izole edilen ve tanımlanan tuza toleranslı *Klebsiella* sp. AB-PR suşunun Acid Blue-113 (800 mg/L) ve Cr(VI) (30 mg/L) içeren ortamda (pH 7, sıcaklık 35 °C) maksimum giderim verimliliğinin 72 saat içinde %90 ve %89 olduğunu bildirilmiştir.

*Bacillus* sp. CRB-B1 bakteri suşunun kullanıldığı bir çalışmada da Tan vd. (2020) tarafından ortamdaki Cr(VI) gideriminin etkili bir şekilde pH 6-8 aralığında gerçekleştiği ve bu pH aralığında bakteriyel hücre yüzeyleri negatif yüklü kromatin bağlanmasını kolaylaştırarak, Cr(VI) redüksiyonu için proton sağladığını belirtmişlerdir.

Ağır metallerin gideriminin yanı sıra, degradasyon veya biyotransformasyon mekanizmaları ile optimum çevre koşulları altında enzim aracılı gerçekleşen boyarmaddelerin gideriminde de pH'ın önemli bir rol oynadığı gözlemlenmiştir (Mishra 2019). Bera (2021) tarafından yapılan bir çalışmada *Pseudomonas stutzeri* kullanılarak Procion Red H-3B boyarmaddesinin maksimum giderimi pH 6-8 aralığında gerçekleşmiş, optimum değer 7.5 olduğu belirtilmiştir. Ek olarak, Alaya vd. (2021)'nin yapmış oldukları çalışmada *Stenotrophomonas maltophilia* TPMD-1 izolatının Malachite Green boyarmadde giderim kapasitesinin pH 6-7 aralığında optimum dereceye ulaştığını, pH'ın 8'ye çıkartılması ile verimin azaldığını gözlemlemişlerdir.

Yapılan bu tez çalışmasında, karışık bakteriyel kültürün Cr(VI) giderim kapasitesi pH değişikliklerinden olumsuz şekilde etkilenmemiş, test edilen tüm pH değerlerinde yüksek verimle giderim sağlamıştır. Ortamdaki SNB giderimi ise en yüksek verimle pH değeri 8 iken gerçekleşmiştir. Elde edilen veriler neticesinde, test edilen karışık bakteriyel kültürünün reaktif boya ve Cr(VI) içeren alkali atıksuların, özellikle tekstil endüstrisi gibi endüstriyel kaynaklı atıksuların biyoremediasyonunda etkinliği ve uygulanabilirliği ortaya konmuştur.

Çalışmalarımızda, farklı kirletici konsantrasyonlarında yapılan biyogiderim çalışmalarında Cr(VI) konsantrasyonunun sabit ve başlangıç SNB konsantrasyonunun 24.7 mg/L'den 84.5 mg/L'ye arttığı ortamlarda, ağır metalin %100, boyanın ise en yüksek %87.4 verimle ortamdaki uzaklaştırıldığı görülmüştür. Sabit SNB konsantrasyonuna sahip ortamdaki Cr(VI) konsantrasyonunun 9.7 mg/L'den 55 mg/L'ye arttırıldığında biyogiderim verimi ise en yüksek %97.7, SNB biyogideriminin ise %85.1 verimle yapıldığı belirlenmiştir.

Elde ettiğimiz verilerimiz, kirletici konsantrasyonunun biyoremediasyon etkinliği üzerindeki etkisine ilişkin diğer araştırmalarla yakından uyumludur. Örneğin, Chaudhari vd. (2013), çalışmalarında boya konsantrasyonu arttıkça, Cr(VI) giderimi iyileşirken renk giderim oranının düştüğünü gözlemlemişlerdir. *Lysinibacillus* sp. KMK-A suşu ile yaptıkları araştırmada, Orange M2R boyası için %58'lik bir renk giderme etkinliği ve 48 saat içinde Cr(VI)'nın tamamen giderildiğini göstermişlerdir. Cr(VI) konsantrasyonu ile boya renk giderim oranı arasında gözlenen ters korelasyon, Rahman (2020) tarafından önerildiği gibi Cr(VI)'nın hücre sel büyüme ve mikrobiyal aktivite üzerindeki toksik etkileri ile ilişkilendirilebilir.

Tez çalışmasında, artan biyokütle konsantrasyonlarının her iki kirleticinin bakteriyel kültür tarafından biyogiderim verimi üzerine etkisi incelendiğinde, en yüksek biyogiderim 25 mg/L Cr(VI) ve 50 mg/L SNB içeren ortamda başlangıç biyokütle konsantrasyonu %8 (v/v)'de elde edilmiştir. Yapılan çalışmalarda, başlangıç biyokütle konsantrasyonu %1 (v/v)'den %8 (v/v)'e arttırıldığında, biyogiderim veriminin Cr(VI) için %96'dan %100'e, SNB için %85.1'den %100'e yükseldiği görülmüştür. %4'lük ve

%8'lik (v/v) biyokütle içeren örneklerde 5 gün içinde %100 verime ulaşıldığı gözlemlenmiştir. Bu, daha yüksek biyokütle konsantrasyonlarının giderim süreci süresinin kısalmasına yol açtığını göstermektedir; tam biyoremediasyon için gereken süre 7 günden 5 güne düşmüştür.

Bulgularımız, biyokütle konsantrasyonunun %2'den %5'e çıkmasıyla boya giderim oranında bir artış kaydeden Emadi vd. (2022)'nin bulgularına paraleldir. Ancak, onların çalışmasında %5 biyokütle konsantrasyonunun aşılmasının giderim verimliliğini daha fazla artırmadığını vurgulanmıştır. Benzer şekilde, Afrin vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada, biyokütle konsantrasyonu %2'den %5'e ve ardından %10'a yükseldikçe kirletici gideriminde önemli bir artış olduğunu ancak %10'dan sonraki biyokütle konsantrasyonu artışında yüksek konsantrasyonlarda boya ve metabolitlerinin toksik etkisi, biyokütlenin yetersiz kalması ve enzimin substratı tanıma yeteneğinin azalması sebepleri ile boya giderim veriminde düşüş yaşandığını bildirilmiştir.

Araştırmada, karışık bakteriyel kültürden elde edilen saf kültürler ile yapılan çalışmalarda en yüksek biyogiderim verimine sahip iki izolat (B ve C), pH değeri 8 ve başlangıç biyokütle konsantrasyonu %8 (v/v) olan, 26.1 mg/L Cr(VI) ve 46.5 mg/L SNB konsantrasyonuna sahip besiyerinde, beşinci günün sonunda kirleticilerin %90 ve daha fazlasını ortamdaki uzaklaştırmıştır. Bu izolatlar 16S rDNA analizine göre *M. oxydans* ve *L. aridicollis* olarak tanımlanmıştır. *M. oxydans* ve *L. aridicollis* bakterilerinin her iki kirleticiyi de içeren ortamda biyogiderim kapasiteleri araştırılmış ve en yüksek kirletici giderimleri sırasıyla %97.5 ve %91 olarak belirlenmiştir. Saf bakterilerle yapılan denemelerde, SNB konsantrasyonu 26.1 mg/L'den 99.7 mg/L'ye çıkartıldığında *M. oxydans*'ın *L. aridicollis*'e kıyasla daha yüksek verim ile SNB biyogiderimi ve her iki izolatın da benzer verim ile Cr(VI) biyogiderimi yaptığı görülmüştür.

Literatürde mevcut olan biyoremediasyon çalışmaları incelendiğinde, ağır metal ve boya giderim verimliliğine sahip olan saf bakteri kültürleri ile karışık bakteri konsorsiyumlarının kullanıldığı çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Maliyet, etkinlik ve uygulanabilirlik açısından değerlendirildiğinde, saf kültürlerin limitli biyogiderim kapasitesinin, birbirini tamamlayabilen karışık bakteri kültürleri içinde kullanıldığında

türler arası tamamlayıcı etkileşimlerden yararlanarak verimliliklerinin önemli ölçüde arttığı ortaya konmuştur (Phugare vd. 2011, Das vd. 2014, Guo vd. 2020).

Tez çalışmasının bu kısmında, giderim mekanizmalarında yer alan mikroorganizmaların çeşitli fonksiyonel gruplarının ve yapılarının varlığı ATR-FTIR analizi ile belirlenmiş, her iki bakterinin de yeni ortamla başa çıkmak için yapısal bazı değişikliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Yine de bu mekanizmalar her bir izolat için farklı görünmektedir; *M. oxydans* daha az lipid ve daha fazla protein içeriği oluşturarak uyum sağlarken, *L. aridicollis* bunu kontrol paralellerine kıyasla daha fazla lipid ve protein içeriği oluşturarak yapmıştır. Lipid açıl zinciri ve ester C=O grubu özelliklerinin analizi, her iki bakteride de membrana gömülü bileşenlerde farklılıklar olduğunu göstermektedir. İzolatların nükleik asit özelliklerinin de etkilendiği gözlemlenmiştir ve bu da adaptasyon için hücre bileşenlerinin yapısal modifikasyonlarına işaret etmektedir. Kısaca, *M. oxydans* ve *L. aridicollis* içeren hem karışık kültürler hem de saf bakteri suşları, atıksulardan boya ve ağır metal içeriğinin giderilmesi için biyoremediasyon araçları olarak umut verici potansiyeller göstermiştir.

Çalışmada, morfolojik değişikliklerin SEM analizi ile incelenmesi neticesince, 14.4 mg/L Cr(VI) ve 26.1 mg/L SNB içeren ortama maruz kalan *M. oxydans* ve *L. aridicollis* hücrelerinin boyutlarında azalma gözlemlenmiştir. Kirletici madde içermeyen ortamda, *M. oxydans*'ın ortalama hücre boyutu 1 µm iken, kirleticilerin varlığında 0.9 µm'ye düşmüştür. Buna karşılık, kirletici içeren ortamda *L. aridicollis*'in boyutundaki azalmanın daha belirgin olduğu görülmüştür.

Bu gözlemlerimiz, kontamine ortamlarda metal toksisitesiyle başa çıkmak için bakteriyel adaptasyon stratejileri üzerine yapılan çalışmalardan elde edilen bulgularla tutarlıdır. Organik ve inorganik kirleticilere maruz kalma gibi olumsuz çevresel koşullar, kirleticilerin olumsuz etkilerini azaltmak için bakterilerde çeşitli stres tepki mekanizmalarını ortaya çıkarır. Bu mekanizmalar, Mathivanan vd. (2021) tarafından belirtildiği gibi, boyut ve şekil değişiklikleri de dahil olmak üzere bakteriyel morfolojideki değişiklikleri içerir. Benzer şekilde Louati vd. (2020), deneylerinde Cd(II)'ye (70 mg/L) maruz kalan örneklerinin bakteriyel hücre boyutunda küçük

değişiklikler gözlemlemiştir. Ayrıca Giovanella vd. (2017), Naik ve Dubey (2011) tarafından yapılan çalışmalarda, *Pseudomonas* spp. 'nin hücre boyutunda ağır metal maruziyetine yanıt olarak bir azalma olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmalar, toplu olarak, metal toksisitesine yanıt olarak bakteriyel adaptif stratejilerin anlaşılmasının önemini ve bunların çevre yönetimi ve biyoremediasyon çabaları üzerindeki etkilerini vurgulamaktadır.

Bu çalışma ile elde edilen mikroorganizmaların atıksuların biyoremediasyonunda, çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda ve biyolojik arıtım sistemlerinde kullanım potansiyeline sahip, ülkemizde bulunan akarsulardan izole edilmiş yerli, güvenli, ucuz ve etkin biyosorbentler olarak kullanılabilecekleri ortaya konulmuştur.

## KAYNAKLAR

- Afrin, S., Shuvo, H. R., Sultana, B., Islam, F., Rus'd, A. A., Begum, S., & Hossain, M. N. 2021. The degradation of textile industry dyes using the effective bacterial consortium. *Heliyon*, 7. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08102>
- Akansha, K., Chakraborty, D., Sachan, S. G. 2019. Decolorization and degradation of methyl orange by *Bacillus stratosphericus* SCA1007. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18, 101044. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101044>
- Akhtar, N., Syakir Ishak, M. I., Bhawani, S. A., Umar, K. 2021. Various natural and anthropogenic factors responsible for water quality degradation: a review. *Water*, 13(19), 2660. <https://doi.org/10.3390/w13192660>
- Alaya, V., Kodi, R.K., Ninganna, E., et al. 2021. Decolorization of Malachite green dye by *Stenotrophomonas maltophilia* a compost bacterium. *Bulletin of the National Research Centre*, 45, 81. <https://doi.org/10.1186/s42269-021-00518-w>
- Ali, H., Khan, E., Ilahi, I. 2019. Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: Environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. *Journal of Chemistry*, 1, 14. <https://doi.org/10.1155/2019/6730305>
- Al-Tohamy, R., Ali, S. S., Li, F. Okasha, K. M., Mahmoud, Y.A.G., Elsamahy, T., Jiao, H., Fu, Y., Sun, J. A. 2022. A critical review on the treatment of dye-containing wastewater: Ecotoxicological and health concerns of textile dyes and possible remediation approaches for environmental safety. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 231, 113160. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.113160>
- Anderson, A., Anbarasu, A., Pasupuleti, R. R., Manigandan, S., Praveenkumar, T. R., Kumar, J. A. 2022. Treatment of heavy metals containing wastewater using biodegradable adsorbents: A review of mechanism and future trends. *Chemosphere*, 295, 133724. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133724>
- Benkhaya, S., M'rabet, S., El Harfi, A. 2020. A review on classifications, recent synthesis and applications of textile dyes. *Inorganic Chemistry Communications*, 115, 107891. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2020.107891>
- Benkhaya, S., M'rabet, S., Lgaz, H., El Bachiri, A., El Harfi, A. 2022. Dyes: classification, pollution, and environmental effects. *Dye Biodegradation, Mechanisms and Techniques: Recent Advances*, 1-50. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-5932-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-16-5932-4_1)
- Bera, S. P., Tank, S. K. 2021. Screening and identification of newly isolated *Pseudomonas* sp. for biodegrading the textile azo dye CI Procion Red H-3B. *Journal of Applied Microbiology*, 130(6), 1949-1959. <https://doi.org/10.1111/jam.14920>
- Beşergil, Bilsen. 2015. *Enstrümantal Analiz Temel İlkeler*, Gazi Kitabevi, Ankara.

- Bharathi, D., Nandagopal, J. G. T., Ranjithkumar, R., Gupta, P. K., Djearamane, S. 2022. Microbial approaches for sustainable remediation of dye-contaminated wastewater: a review. *Archives of Microbiology*, 204(3), 169. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02767-3>
- Chaudhari, A. U., Tapase, S. R., Markad, V. L., Kodam, K. M. 2013. Simultaneous decolorization of reactive Orange M2R dye and reduction of chromate by *Lysinibacillus* sp. KMK-A. *Journal of Hazardous Materials*, 262, 580-588. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.09.006>
- Chen, W., Li, W., Wang, T., Wen, Y., Shi, W., Zhang, W., Yang, Y. 2022. Isolation of functional bacterial strains from chromium-contaminated site and bioremediation potentials. *Journal of Environmental Management*, 307, 114557. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.114557>
- Cheng, H., Yuan, M., Zeng, Q., Zhou, H., Zhan, W., Chen, H., Wang, Y. 2021. Efficient reduction of reactive black 5 and Cr(VI) by a newly isolated bacterium of *Ochrobactrum anthropi*. *Journal of Hazardous Materials*, 406, 124641. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124641>
- Chung, K. T. 2016. Azo dyes and human health: A review. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 34(4), 233-261. <https://doi.org/10.1080/10590501.2016.1236602>
- Clark, M. 2011. Fundamental principles of dyeing. *Handbook of textile and industrial dyeing: Principles, processes and types of dyes*, 1, 3-27.
- Cogliano, V. J., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi F., Wild C. P. 2011. Preventable exposures associated with human cancers, JNCI: *Journal of the National Cancer Institute*, 103(24), 1827–1839.
- Crini, G., Lichtfouse, E. 2019. Advantages and disadvantages of techniques used for wastewater treatment. *Environmental Chemistry Letters*, 17, 145-155. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0785-9>
- Das, A., Mishra, S., Verma, V. K. 2016. Enhanced biodecolorization of textile dye Remazol navy blue using an isolated bacterial strain *Bacillus pumilus* HKG212 under improved culture conditions. *Journal of Biochemical Technology*, 6(3), 962-969.
- Das, S., Mishra, J., Das, S. K., Pandey, S., Rao, D. S., Chakraborty, A., Thatoi, H. 2014. Investigation on mechanism of Cr(VI) reduction and removal by *Bacillus amyloliquefaciens*, a novel chromate tolerant bacterium isolated from chromite mine soil. *Chemosphere*, 96, 112-121. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.08.080>
- Dutta, S., Adhikary, S., Bhattacharya, S., Roy, D., Chatterjee, S., Chakraborty, A., Banerjee, D., Ganguly, A., Nanda, S., Rajak, P. 2024. Contamination of textile dyes in aquatic environment: Adverse impacts on aquatic ecosystem and human health,

- and its management using bioremediation. *Journal of Environmental Management*, 353, 120103. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.120103>
- Dutta, D., Arya, S., Kumar, S. 2021. Industrial wastewater treatment: Current trends, bottlenecks, and best practices. *Chemosphere*, 285, 131245. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131245>
- Emadi, Z., Sadeghi, M., Forouzandeh, S., Sadeghi, R., Sadeghi, R., Mohammadi-Moghadam, F. 2022. Simultaneous decolorization/degradation of AB-113 and chromium(VI) removal by a salt-tolerant *Klebsiella* sp. AB-PR and detoxification of biotransformed-metabolites. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 19(3), 2007-2024.
- Englande, A. J. Jr., Krenkel, P., Shamas, J. 2015. Wastewater Treatment & Water Reclamation. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences, B978-0-12-409548-9.09508-7. doi: 10.1016/B978-0-12-409548-9.09508-7
- Gibb, H., O'Leary, K. G. 2014. Mercury exposure and health impacts among individuals in the artisanal and small-scale gold mining community: a comprehensive review. *Environmental Health Perspectives*, 122.7, 667-672. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307864>
- Giovanella, P., Cabral, L., Costa, A. P., de Oliveira Camargo, F. A., Gianello, C., Bento, F. M. 2017. Metal resistance mechanisms in Gram-negative bacteria and their potential to remove Hg in the presence of other metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 140, 162-169. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.02.010>
- Gregory, P. 1990. Classification of Dyes by Chemical Structure. In: Waring, D.R., Hallas, G. (eds) *The Chemistry and Application of Dyes*. Topics in Applied Chemistry. Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7715-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7715-3_2)
- Guo, G., Hao, J., Tian, F., Liu, C., Ding, K., Xu, J., Guan, Z. 2020. Decolorization and detoxification of azo dye by halo-alkaliphilic bacterial consortium: Systematic investigations of performance, pathway and metagenome. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 204, 111073. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111073>
- Gupta, A., Whitton, B. A., Morby, A. P., Huckle, J. W., Robinson, N. J. 1992. Amplification and rearrangement of a prokaryotic metallothionein locus smt in *Synechococcus* PCC 6301 selected for tolerance to cadmium. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 248(1323), 273-281. doi: 10.1098/rspb.1992.0072
- Gupta, A., Morby, A. P., Turner, J. S., Whitton, B. A., Robinson, N. J. 1993. Deletion within the metallothionein locus of cadmium-tolerant *Synechococcus* PCC 6301 involving a highly iterated palindrome (HIP1). *Molecular microbiology*, 7(2), 189–195. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01110.x>

- Gürses, A., Açıkıldız, M., Güneş, K., Gürses, M. S. 2016. Dyes and pigments: their structure and properties. *Dyes and Pigments*, 13-29. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-33892-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-33892-7_2)
- Haripriyan, U., Gopinath, K. P., Arun, J., & Govarathanan, M. 2022. Bioremediation of organic pollutants: A mini review on current and critical strategies for wastewater treatment. *Archives of Microbiology*, 204(5), 286. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02907-9>
- Hossini, H., Shafie, B., Niri, A. D., Nazari, M., Esfahlan, A. J., Ahmadpour, M., Hoseinzadeh, E. 2022. A comprehensive review on human health effects of chromium: Insights on induced toxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, 29.47, 70686-70705. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22705-6>
- Hunger, K. (Ed.). 2007. *Industrial dyes: chemistry, properties, applications*. John Wiley & Sons, Weinheim.
- IARC. 2004. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Inorganic and Organic Lead Compounds. International Agency for Research on Cancer.
- Islam, T., Repon, M. R., Sarwar, Z., Rahman, M. M. 2023. Impact of textile dyes on health and ecosystem: a review of structure, causes, and potential solutions. *Environmental Science and Pollution Research*, 30, 9207–9242. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-24398-3>
- Jarosławiecka A, Piotrowska-Seget Z. 2014. Lead resistance in micro-organisms. *Microbiology (Reading)*, 160(Pt 1), 12-25. doi: 10.1099/mic.0.070284-0. 10.1099/mic.0.070284-0
- Jena, P. S., Pradhan, A., Nanda, S. P., Dash, A. K., Naik, B. 2022. Biosorption of heavy metals from wastewater using *Saccharomyces cerevisiae* as a biosorbent: A mini review. *Materials Today: Proceedings*, 67, 1140-1146. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.07.306>
- Jiang, L. F., Yao, T. M., Zhu, Z. L., Wang, C., Ji, L. N. 2007. Impacts of Cd (II) on the conformation and self-aggregation of Alzheimer's tau fragment corresponding to the third repeat of microtubule-binding domain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1774(11), 1414-1421. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.08.014>
- Kant, R. 2012. Textile dyeing industry an environmental hazard. *Natural Science*, 4, 22-26. doi: 10.4236/ns.2012.41004.
- Kapahi, M., Sachdeva, S. 2019. Bioremediation options for heavy metal pollution. *Journal of Health and Pollution*, 9(24), 191203. <https://doi.org/10.5696/2156-9614-9.24.191203>

- Kardas, M., Gozen, A. G., Severcan, F. 2014. FTIR spectroscopy offers hints towards widespread molecular changes in cobalt-acclimated freshwater bacteria. *Aquatic Toxicology*, 155, 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.05.027>
- Kepenek, E. S., Gozen, A. G., Severcan, F. 2019. Molecular characterization of acutely and gradually heavy metal acclimated aquatic bacteria by FTIR spectroscopy. *Journal of Biophotonics*, 12(5), e201800301. <https://doi.org/10.1002/jbio.201800301>
- Khalil, N., Morrow, L. A., Needleman, H., Talbott, E. O., Wilson, J. W., Cauley, J. A. 2009. Association of cumulative lead and neurocognitive function in an occupational cohort. *Neuropsychology*, 23, 10–19. <https://doi.org/10.1037/a0013757>
- Khan, S., Malik, A. 2014. Environmental and health effects of textile industry wastewater. *Environmental Deterioration and Human Health: Natural and anthropogenic determinants*, 55-71. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-7890-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-94-007-7890-0_4)
- Kholisa, B., Matsena, M., Chirwa, E. M. N. 2021. Evaluation of Cr(VI) reduction using indigenous bacterial consortium isolated from a municipal wastewater sludge: Batch and kinetic studies. *Catalysts*, 11, 1100. <https://doi.org/10.3390/catal11091100>
- Kılıç, N. K., Nielsen, J. L., Yüce, M., Dönmez, G. 2007. Characterization of a simple bacterial consortium for effective treatment of wastewaters with reactive dyes and Cr(VI). *Chemosphere*, 67(4), 826-831. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.08.041>
- Kishor, R., Purchase, D., Saratale, G. D., Saratale, R. G., Ferreira, L. F. R., Bilal, M., Bhargava, R. N. 2021. Ecotoxicological and health concerns of persistent coloring pollutants of textile industry wastewater and treatment approaches for environmental safety. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(2), 105012. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.105012>
- Korkmaz, F., Köster, S., Yildiz, O., Mäntele, W. 2012. In situ opening/closing of OmpG from *E. coli* and the splitting of  $\beta$ -sheet signals in ATR-FTIR spectroscopy. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 91, 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.01.025>
- Kumar, A., Dixit, U., Singh, K., Gupta, S.P., Beg, M.S.J. 2021. Structure and properties of dyes and pigments. *Dyes and Pigments-Novel Applications and Waste Treatment*, 11, 131. doi:10.5772/intechopen.97104
- Lellis, B., Fávaro-Polonio, C. Z., Pamphile, J. A., & Polonio, J. C. 2019. Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms. *Biotechnology Research and Innovation*, 3(2), 275-290. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2019.09.001>
- Linos, A., Petralias, A., Christophi, C. A., Christoforidou, E., Kouroutou, P., Stoltidis, M., Veloudaki, A., Tzala, E., Makris, K. C., Karagas, M. R. 2011. Oral ingestion of

- hexavalent chromium through drinking water and cancer mortality in an industrial area of Greece—an ecological study. *Environmental Health*, 10, 50. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-10-50>
- Liu, W., Liu, C., Liu, L., You, Y., Jiang, J., Zhou, Z., Dong, Z. 2017. Simultaneous decolorization of sulfonated azo dyes and reduction of hexavalent chromium under high salt condition by a newly isolated salt-tolerant strain *Bacillus circulans* BWL1061. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 141, 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.005>.
- Loomis, D., Guha, N., Hall, A. L., Straif, K. 2018. Identifying occupational carcinogens: an update from the IARC Monographs. *Occupational and Environmental Medicine*, 75(8), 593–603. <http://dx.doi.org/10.1136/oemed-2018-105189>
- Louati, I., Elloumi-Mseddi, J., Cheikhrouhou, W., Hadrich, B., Nasri, M., Aifa, S., Mechichi, T. 2020. Simultaneous cleanup of Reactive Black 5 and cadmium by a desert soil bacterium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190, 110103. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110103>
- Lyu, Y., Yang, T., Liu, H., Qi, Z., Li, P. Shi, Z., Zhang, Y. 2021. Enrichment and characterization of an effective hexavalent chromium-reducing microbial community YEM001. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 19866-19877. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11863-0>
- Ma, L., Xu, J., Chen, N., Li, M., Feng, C. 2019. Microbial reduction fate of chromium (Cr) in aqueous solution by mixed bacterial consortium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 170, 763-770. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.041>
- Mathivanan, K., Chandirika, J. U., Vinothkanna, A., Yin, H., Liu, X., Meng, D. 2021. Bacterial adaptive strategies to cope with metal toxicity in the contaminated environment—A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 226, 112863. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112863>
- Mishra, S., Dwivedi, S. P., & Singh, R. B. 2010. A review on epigenetic effect of heavy metal carcinogens on human health. *The Open Nutraceuticals Journal*, 3, 1. doi: 10.2174/18763960010030100188
- Mishra, Saurabh, and Abhijit Maiti. 2019. Applicability of enzymes produced from different biotic species for biodegradation of textile dyes. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 21, 763-781. <https://doi.org/10.1007/s10098-019-01681-5>
- Mohanty, S. S., Kumar, A. 2021. Enhanced degradation of anthraquinone dyes by microbial monoculture and developed consortium through the production of specific enzymes. *Scientific Reports*, 11(1), 7678.
- Morris, C. (Ed.). 1992. *Academic Press Dictionary of Science and Technology*, Academic Press, San Diego.
- Movasaghi, Z., Rehman, S., Rehman, D. I. 2008. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43(2), 134-179.

- Mudgal, V., Madaan, N., Mudgal, A., Singh, R., Mishra, S. 2010. Effect of toxic metals on human health. *The Open Nutraceuticals Journal*, 3, 94–99. doi: 10.2174/18763960010030100094
- Nagata, C., Nagao, Y., Shibuya, C., Kashiki, Y., Shimizu, H. 2005. Urinary cadmium and serum levels of estrogens and androgens in postmenopausal Japanese women. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 14(3), 705–708. <https://doi.org/10.1158/1055-9965>.
- Naik, M. M., Dubey, S. K. 2011. Lead-enhanced siderophore production and alteration in cell morphology in a Pb-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain 4EA. *Current Microbiology*, 62, 409–414. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9722-2>
- Naik, M. M., Dubey, S. K. 2013. Lead resistant bacteria: lead resistance mechanisms, their applications in lead bioremediation and biomonitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.09.039>
- Nithya, C., Gnanalakshmi, B., Pandian, S. K. 2011. Assessment and characterization of heavy metal resistance in Palk Bay sediment bacteria. *Marine Environmental Research*, 71(4), 283–294. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.02.003>
- Pande, V., Pandey, S. C., Sati, D., Pande, V., Samant, M. 2020. Bioremediation: an emerging effective approach towards environment restoration. *Environmental Sustainability*, 3, 91–103. <https://doi.org/10.1007/s42398-020-00099-w>
- Pereira, L., Alves, M. 2012. Dyes—Environmental Impact and Remediation. In: Malik, A., Grohmann, E. (eds) *Environmental Protection Strategies for Sustainable Development. Strategies for Sustainability*. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-1591-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-94-007-1591-2_4)
- Phugare, S. S., Kalyani, D. C., Patil, A. V., Jadhav, J. P. 2011. Textile dye degradation by bacterial consortium and subsequent toxicological analysis of dye and dye metabolites using cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress studies. *Journal of Hazardous Materials*, 186(1), 713–723. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.11.049>
- Plestenjak, E., Kraigher, B., Leskovec, S., Mandic Mulec, I., Marković, S., Ščančar, J., Milačič, R. 2022. Reduction of hexavalent chromium using bacterial isolates and a microbial community enriched from tannery effluent. *Scientific Reports*, 12(1), 20197. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24797-z>.
- PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004. PubChem Compound Search. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/>
- Rahman, Z. 2020. An overview on heavy metal resistant microorganisms for simultaneous treatment of multiple chemical pollutants at co-contaminated sites, and their multipurpose application. *Journal of Hazardous Materials*, 396, 122682. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122682>

- Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. <https://imagej.net/ij/>, 1997-2018.
- Saravanan, A., Kumar, P. S., Duc, P. A., Rangasamy, G. 2023. Strategies for microbial bioremediation of environmental pollutants from industrial wastewater: A sustainable approach. *Chemosphere*, 313, 137323. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137323>
- Saxena, A., Gupta, S. 2020. Bioefficacies of microbes for mitigation of azo dyes in textile industry effluent: A review. *BioResources*, 15(4), 9858-9881. doi: 10.15376/biores.15.4.Saxena
- Sathya, K., Nagarajan, K., Carlin Geor Malar, G. et al. 2022. A comprehensive review on comparison among effluent treatment methods and modern methods of treatment of industrial wastewater effluent from different sources. *Appl Water Sci* 12, 70. <https://doi.org/10.1007/s13201-022-01594-7>
- Singh, A., Pal, D. B., Mohammad, A., Alhazmi, A., Haque, S., Yoon, T., Gupta, V. K. 2022. Biological remediation technologies for dyes and heavy metals in wastewater treatment: New insight. *Bioresource Technology*, 343, 126154. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126154>
- Snell, F. D., Snell, C. T. 1959. *Colorimetric methods of analysis*. D. van Nostrand, New Jersey, USA.
- Solayman, H. M., Hossen, M. A., Abd Aziz, A., Yahya, N. Y., Leong, K. H., Sim, L.C., & Zoh, K.D. 2023. Performance evaluation of dye wastewater treatment technologies: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 11(3), 109610. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.109610>
- Talari, A. C. S., Martinez, M. A. G., Movasaghi, Z., Rehman, S., Rehman, I. U. 2017. Advances in Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 52(5), 456-506. <https://doi.org/10.1080/05704928.2016.1230863>
- Tan, H., Wang, C., Zeng, G., Luo, Y., Li, H., Xu, H. 2020. Bioreduction and biosorption of Cr (VI) by a novel *Bacillus* sp. CRB-B1 strain. *Journal of Hazardous Materials*, 386, 121628. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121628>
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., Sutton, D. J. 2012. Heavy metal toxicity and the environment. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology: Volume 3: Environmental Toxicology*, 133-164. [https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6)
- Vaynberg, J., Ng, L. M. 2005. Surface chemistry of fluoroethanols: I. A FTIR study of the reaction of 2, 2-difluoroethanol on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> surface. *Surface Science*, 577(2-3), 175-187.
- Vidali, M. 2001. Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73(7), 1163-1172. doi: 10.1351/pac200173071163

- Vij, A.G., Dhundasi, S. 2009. Hemopoietic, hemostatic and mutagenic effects of lead and possible prevention by zinc and vitamin C. *Al Ameen Journal of Medical Sciences*, 2, 27–36.
- Vijayaraghavan, K., Yun, Y. S. 2008. Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances*, 26(3), 266-291.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.02.002>
- Waalkes, M., Rehm, S., Coogan, T., Ward, J. 1997. Role of cadmium in the etiology of cancer of the prostate. *Endocrine Toxicology*. 2nd ed. Washington DC., Taylor and Francis, 227–243.
- Wang, Z., Wu, J., Humphries, B., Kondo, K., Jiang, Y., Shi, X., Yang, C. 2018. Upregulation of histone-lysine methyltransferases plays a causal role in hexavalent chromium-induced cancer stem cell-like property and cell transformation. *Toxicology and applied pharmacology*, 342, 22-30. doi: 10.1016/j.taap.2018.01.022
- WWAP (United Nations World Water Assessment Programme). 2017. The United Nations World Water Development Report 2017. Wastewater: The Untapped Resource. Paris, UNESCO.
- Xu, J., Yang, L., Wang, Z., Dong, G., Huang, J., Wang, Y. 2006. Toxicity of copper on rice growth and accumulation of copper in rice grain in copper contaminated soil. *Chemosphere*, 62(4), 602-607. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.05.050>
- Yang, Q., Han, B., Xue, J., Lv, Y., Li, S., Liu, Y., Wu, P., Wang, X., Zhang, Z. 2020. Hexavalent chromium induces mitochondrial dynamics disorder in rat liver by inhibiting AMPK/PGC-1 $\alpha$  signaling pathway. *Environmental Pollution*, 265, 114855. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114855>
- Yin, K., Wang, Q., Lv, M., Chen, L. 2019. Microorganism remediation strategies towards heavy metals. *Chemical Engineering Journal*, 360, 1553-1563. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.10.226>
- Zabłocka-Godlewska, E., Przysaś, W., 2020. Fed-batch decolourization of mixture of Brilliant Green and Evans Blue by bacteria species applied as pure and mixed cultures: Influence of growth conditions. *Water, Air, Soil Pollution*, 231, 75. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-4441-1>
- Zamora-Ledezma, C., Negrete-Bolagay, D., Figueroa, F., Zamora-Ledezma, E., Ni, M., Alexis, F., Guerrero, V. H. 2021. Heavy metal water pollution: A fresh look about hazards, novel and conventional remediation methods. *Environmental Technology & Innovation*, 22, 101504. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101504>