

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**GEN TEKNOLOJİSİYLE ÜRETİLEN YENİ
BİYOSORBENTLER KULLANILARAK SU VE
ATIKSULARDAN KROM VE KURŞUNUN
BİYOGİDERİMİ**

**Hazırlayan
Şeyma AKKURT**

**I. Danışman
Prof. Dr. Merve OĞUZ
II. Danışman
Doç. Dr. Aysel ALKAN UÇKUN**

Doktora Tezi

**Mart 2022
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**GEN TEKNOLOJİSİYLE ÜRETİLEN YENİ
BİYOSORBENTLER KULLANILARAK SU VE
ATIKSULARDAN KROM VE KURŞUNUN
BİYOGİDERİMİ
(Doktora Tezi)**

**Hazırlayan
Şeyma AKKURT**

I. Danışman

Prof. Dr. Merve OĞUZ

II. Danışman

Doç. Dr. Aysel ALKAN UÇKUN

**Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından FDK-2019-9543 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Mart 2022
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Şeyma AKKURT

İmza

YÖNERGEYE UYGUNLUK

“Gen Teknolojisiyle Üretilen Yeni Biyosorbentler Kullanılarak Su ve Atıksulardan Krom ve Kurşunun Biyogiderimi” adlı Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan

Şeyma AKKURT

İmza

Danışman

Prof. Dr. Merve OĞUZ

İmza

II. Danışman

Doç. Dr. Aysel ALKAN UÇKUN

İmza

Çevre Mühendisliği ABD Başkanı

Prof. Dr. Oktay ÖZKAN

İmza

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca engin tecrübesi ve bilimsel katkılarıyla beni yönlendiren, yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve bu günlere gelmemde en büyük katkı sahibi hocam Sayın Prof. Dr. Merve OĞUZ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışmanın konusunun belirlenmesinde ve çalışma süresince karşılaşılan sorunların çözümünde öneri ve desteklerini esirgemeyen, yardımıyla daima yanımda olan, bana güvenen, beni cesaretlendiren ve bana destek olan kıymetli ikinci danışman hocam Sayın Doç. Dr. Aysel ALKAN UÇKUN'a,

Doktora tez sürecimde çalışmanın şekil almasında değerli öneri ve katkılarıyla beni yönlendiren değerli tez izleme komitesi üyeleri Sayın hocalarım Prof. Dr. Uğur ŞAHİN ve Prof. Dr. Oktay ÖZKAN'a,

Deneyisel çalışmalarım sırasında karşılaştığım zorlukları aşmamda öneri ve yardımlarını eksik etmeyen ve destekleyen kıymetli hocam Sayın Dr. Öğretim Üyesi Miraç UÇKUN'a,

Çalışmalarım sırasında kıymetli fikirlerini ve desteklerini eksik etmeyen Adıyaman Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölüm Başkanı Sayın Doç. Dr. Yavuz DEMİRCİ'ye ve Adıyaman Üniversitesi Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Dr. Öğretim Üyesi Müslüm ALTUN'a,

Gen klonlama deneyleri için gerekli laboratuvar ortamı sağlayan ve yardımlarını esirgemeyen İnönü Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Hüseyin KAHRAMAN'a

Tez çalışmaları boyunca atıksu temini ile ilgili yardımlarından dolayı Kayseri Organize Sanayi Bölgesi Çevre Yönetim Müdürü Yakup GÜLTEKİN'e,

Bu tez çalışmasına maddi destek veren Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Ayrıca; her zaman yanımda olan, beni cesaretlendiren ve varlıkları ile bana güç veren desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen, annem, babam ve kardeşlerime,

En içten dileklerimle teşekkür ederim.

Şeyma AKKURT

Mart 2022, KAYSERİ

GEN TEKNOLOJİSİYLE ÜRETİLEN YENİ BİYOSORBENTLER KULLANILARAK SU VE ATIKSULARDAN KROM VE KURŞUNUN BİYOGİDERİMİ

Şeyma AKKURT

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Doktora Tezi, Mart 2022

I.Danışman: Prof. Dr. Merve OĞUZ

II. Danışman: Doç. Dr. Aysel ALKAN UÇKUN

ÖZET

Genetik mühendisliği teknolojileri kullanılarak tehlikeli metallerin sudan arıtımına yönelik çalışmaların sayısı artmaktadır. Metalloitiyoninler, birçok organizmada bulunan yüksek metal bağlama affinitesine sahip proteinlerdir. Bu çalışmada, insan MT2A ve MT3 genleri, sulu çözeltilerden kromu (Cr) ve kurşunu (Pb) gidermek için *Escherichia coli* Jm109 (*E. coli*) bakterisine klonlanmıştır. Bu bakterileri kullanarak Cr ve Pb'nin biyogiderim deneyleri gerçekleştirilmiştir. En yüksek Cr giderimi %89'luk bir verimle MT2A suşunda, Cr indirgenmesi %76'lık bir verimle yine MT2A suşunda; Pb giderimi ise %54'lük bir oranla MT3 suşunda gözlenmiştir. Krom kaplama atıksuyundan Cr'yi en yüksek oranda MT2A'nın (%65), Pb'yi ise en yüksek oranda MT3 (%70) suşunun giderdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar dikkate alınarak, MT2A ve MT3'ün asit uygulanmış ölü biyosorbentleri kullanılarak Cr ve Pb'nin sulu çözeltilerden biyosorpsiyonu gerçekleştirilmiştir. İzoterm, kinetik ve termodinamik çalışmalar sonunda Cr ve Pb biyosorpsiyonlarının Langmuir izoterm modeline, yalancı birinci dereceden kinetiğe uyduğu ve biyosorpsiyonların ekzotermik olduğu görülmüştür. Cr ve Pb uygulanan hücrelerin yüzeyindeki morfolojik değişiklikler taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile hücre içindeki birikimleri ise taramalı transmisyon elektron mikroskobu (STEM) ile görüntülenmiştir. Ayrıca dönüşümlü kızılötesi spektrofotometresi (FTIR) sonuçlarından Cr ve Pb bağlanmasında etkili olan fonksiyonel grupların amino (amid I, amid II), fosforil, karbonil, amin, alkan ve sülfoksit olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, Cr ve Pb giderimi için sırasıyla, MT2A ve MT3'ün biyoteknolojik araçlar olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyolojik arıtım, Cr ve Pb biyogiderim, Genetiği değiştirilmiş bakteri, Biyosorpsiyon, Metalloitiyonin.

BIOREMOVAL OF CHROMIUM AND LEAD FROM WATER AND WASTEWATER USING NEW BIOSORBENTS PRODUCED BY THE GENE TECHNOLOGY

Şeyma AKKURT

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

PhD Thesis, March 2022

Supervisor: Prof. Dr. Merve OĞUZ

Co-Advisor: Assoc. Prof. Dr. Aysel ALKAN UÇKUN

ABSTRACT

The number of studies on the removal of hazardous metals from water using genetic engineering technologies has been growing. Metallothioneins are proteins with high metal binding affinity that exist in many organisms. In this study, human MT2A and MT3 genes were cloned into *Escherichia coli* (*E. coli*) Jm109 bacteria to remove chromium (Cr) and lead (Pb) from aqueous solutions. Bioremoval experiments of Cr and Pb were carried out using these bacteria. The highest Cr removal was in the MT2A strain with a yield of 89%, and the Cr reduction was again in the MT2A strain with a yield of 76%; Pb removal was observed with a rate of 54% in the MT3 strain. It was determined that MT2A (65%) removed the Cr at the highest rate from the chrome plating wastewater, and the MT3 (70%) strain removed the Pb at the highest rate. Considering these results, biosorption of Cr and Pb from aqueous solutions was carried out using acid treated dead biosorbents of MT2A and MT3. As a result of isotherm, kinetic and thermodynamic studies, it was determined that Cr and Pb biosorptions comply with the Langmuir isotherm model, pseudo first order kinetics and biosorptions were found exothermic. Morphological changes on the surface of the cells treated with Cr and Pb were visualized by scanning electron microscopy (SEM), and their accumulation in the cell was visualized by scanning transmission electron microscopy (STEM). In addition, the functional groups that are effective in Cr and Pb binding were determined from the results of the cyclic infrared spectrophotometer (FTIR) to be amino (amide I-II), phosphoryl, carbonyl, amine, alkane and sulfoxide. In conclusion, it has been shown that MT2A and MT3 can be used as biotechnological tools for Cr and Pb removal, respectively.

Keywords: Biological Treatment, Cr and Pb Bioremoval, Genetically Modified Bacteria, Biosorption, Metallothioneine.

İÇİNDEKİLER

GEN TEKNOLOJİSİYLE ÜRETİLEN YENİ BİYOSORBENTLER KULLANILARAK SU VE ATIKSULARDAN KROM VE KURŞUNUN BİYOGİDERİMİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	iii
KABUL VE ONAY	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR.....	xiv
TABLolar LİSTESİ.....	xviii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xix
GİRİŞ	1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Atıksular	3
1.2. İçme Suyu Ağır Metal Standartları.....	4
1.3. Ağır Metaller ve Çevresel Etkileri.....	10
1.3.1.Krom	11
1.3.2.Kurşun	13
1.4. Atıksulardan Ağır Metallerin Giderimi.....	14
1.4.1. Biyolojik Arıtma Yöntemleri	16
1.4.1.1. Biyosorpsiyon.....	17
1.4.1.2. Biyokümülyasyon (Biyobirikim)	18

1.5. Biyosorpsiyon ve Biyoakümülyasyon Proseslerinin Ağır Metal Giderimindeki Önemi	19
1.6. Rekombinant DNA teknolojisi	22
1.7. Genetiğı Değıştirilmiş Bakterilerin Biyoremediasyondaki Önemi	23
1.8. <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	28
1.9. Metallotiyoninler	30
1.9.1. Metallotiyonin Geninin İzofomları	31
1.9.2. Metallotiyonin 2A (MT2A)	31
1.9.3. Metallotiyonin 3 (MT3)	32
1.9.4. Metallotiyoninler ve Metal Detoksifikasyonu	32
1.9.5. Metallotiyoninlerin İndüksiyonu	33
1.10. Adsorpsiyon İzotermi	34
1.10.1. Langmuir İzotermi	34
1.10.2. Freundlich İzotermi	36
1.11. Adsorpsiyon Kinetiğı	36
1.12. Adsorpsiyon Termodinamiğı	38
1.13. Literatür Araştırması	39
1.13.1. Sulardan Krom ve Kurşun Giderimine Yönelik Çalışmalar	39
1.13.2. Rekombinant Bakteriler ile Metallerin Giderimine Yönelik Çalışmalar	42

2. BÖLÜM

YÖNTEM VE MATERYAL

2. Materyal	50
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler	50
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri	50
2.1.3. Çalışmada Kullanılan Metaller	51
2.1.4. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar	51
2.1.5. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler	53
2.2. Metot	55

2.2.1. Gen Klonlama ve Bakteri Transformasyonu	55
2.2.1.1. Genlerin Restriksiyon Enzimleri ile Kesilmesi ve Ligasyon	56
2.2.1.2. Transformasyon	56
2.2.1.3. Seçilen Kolonilerden Plazmid İzolasyonu	58
2.3. Gece Kùltürlerinin (Overnight) Hazırlanması	59
2.3.1. Bakteri Stoklarının Hazırlanması	60
2. 4. Metal Giderim Tayini	60
2. 4. 1. Metallerin sulu çözeltilerinin hazırlanması	60
2.4.2. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK)	60
2.5. Biyobirikim deneyleri	64
2.5.1. Besiyerinde birikim	64
2.5.2. Hücre yüzeyinde birikim	65
2.5.3. Hücre içinde birikim	66
2.6. Difenilkarbazit Yöntemi ile Cr(VI) Tayini	66
2.7. Krom Kaplama Tesisi Atıksuyundan Cr ve Pb Biyogiderimi	67
2.7.1. Krom Kaplama Tesisi Atıksuyunun Biyolojik Arıtımı	70
2.8. Biyosorpsiyon deneyleri	70
2.9. Desorpsiyon ve Yeniden Kullanım Prosedürü	71
2.10. Taramalı elektron mikroskop (SEM) ve Taramalı geçirimli elektron mikroskobu (STEM) analizleri	71
2.11. Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometre (FTIR) analizi	72

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Hücrelerin Büyümesine Cr ve Pb'nin Etkisi	74
3.1.1. Hücrelerin Büyümesine Cr'nin Etkisi	74
3.1.2. Hücrelerin Büyümesine Pb'nin Etkisi	76
3.1.3. Bakterilerin Cr ve Pb MİK Değerlerinin Belirlenmesi	78
3.2. Biyogiderim Sonuçları	82
3.2.1. Hücrelerin Cr Biyogiderim ve Cr(VI) İndirgeme Oranları	82

3.2.3. Pb Biyobirikim Oranları	85
3.3. Biyosorpsiyon Sonuçları	86
3.3.1. Cr Biyosorpsiyon Verimine pH'nın Etkisi	87
3.3.2. Cr Biyosorpsiyon Verimine Sıcaklığın Etkisi.....	87
3.3.3. Cr Biyosorpsiyon Verimine Temas Süresinin Etkisi	88
3.3.4. Cr Biyosorpsiyon Verimine Biyosorbent Konsantrasyonunun Etkisi	89
3.3.5. Cr Biyosorpsiyon Verimine Başlangıç Cr Konsantrasyonunun Etkisi ..	90
3.4. Pb Biyosorpsiyonu.....	91
3.4.1. Pb Biyosorpsiyon Verimine pH'nın Etkisi	91
3.4.2. Pb Biyosorpsiyon Verimine Sıcaklığın Etkisi.....	92
3.4.3. Pb Biyosorpsiyon Verimine Temas Süresinin Etkisi	93
3.4.4. Pb Biyosorpsiyon Verimine Biyosorbent Konsantrasyonunun Etkisi	94
3.4.5. Pb Biyosorpsiyon Verimine Başlangıç Pb Konsantrasyonunun Etkisi ..	95
3.5. Biyosorbentlerin Tekrar Kullanılabilirliği ve Desorpsiyon Oranları	96
3.5.1. Cr desorpsiyonu ve biyosorbentin tekrar kullanılabilirliği	96
3.5.2. Pb desorpsiyonu ve biyosorbentinin tekrar kullanılabilirliği.....	97
3.6. Hücrelerin Adsorpsiyon Eğrileri	98
3.6.1. Cr Adsorpsiyon İzoterm Eğrileri	98
3.6.2. Pb Adsorpsiyon İzoterm Eğrileri	100
3.7. Biyosorpsiyon Kinetikleri.....	101
3.7.1. Cr Biyosorpsiyon Kinetikleri.....	101
3.7.2. Pb Biyosorpsiyon Kinetikleri.....	103
3.8. Biyosorpsiyon Termodinamikleri	105
3.8.1. Cr Biyosorpsiyon Termodinamiği	105
3.8.2. Pb Biyosorpsiyon Termodinamiği	106
3.9. Krom ve Kurşun Uygulanan Bakterilerin SEM Görüntüleri.....	107
3.10. MT2A suşunun STEM Görüntüleri	111
3.11. FTIR Analizi	113

4. BÖLÜM

TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1. Cr ve Pb'nin Hücre Büyümesine Etkisi	115
4.2. MT2A ve MT3 Genlerinin Suşların Cr ve Pb Giderim Oranlarına Etkisi.....	115
4.2.1. MT2A ve MT3 Genlerinin Suşların Cr Giderim ve Cr(VI) İndirgeme Oranlarına Etkisi	115
4.2.2. MT2A ve MT3 Genlerinin Suşların Pb Giderim Oranlarına Etkisi.....	117
4.3. Ortam Çevresel Koşullarının Cr ve Pb Biyosorpsiyonu Üzerine Etkileri.....	118
4.3.1. pH'nın Cr Biyosorpsiyonuna Etkisi.....	118
4.3.2. Sıcaklığın Cr Biyosorpsiyonuna Etkisi	119
4.3.3. Temas Süresinin Cr Biyosorpsiyonuna Etkisi.....	119
4.3.4. Biyosorbent Konsantrasyonunun Cr Biyosorpsiyonuna Etkisi	119
4.3.5. Başlangıç Cr Konsantrasyonunun Cr Biyosorpsiyonuna Etkisi	120
4.4. Ortam Çevresel Koşullarının Pb Biyosorpsiyonu Üzerine Etkileri	121
4.4.1. pH'nın Pb Biyosorpsiyonuna Etkisi.....	121
4.4.2. Sıcaklığın Pb Biyosorpsiyonuna Etkisi	122
4.4.3. Temas Süresinin Pb Biyosorpsiyonuna Etkisi.....	123
4.4.4. Biyosorbent Konsantrasyonunun Pb Biyosorpsiyonuna Etkisi	123
4.4.5. Başlangıç Pb Konsantrasyonunun Pb Biyosorpsiyonuna Etkisi	123
4.5. MT2A ve MT3 Biyosorbentlerinin Tekrar Kullanılabilirliği	124
4.6. Adsorpsiyon İzotermi.....	125
4.7. Adsorpsiyon Kinetiği	127
4.8. Adsorpsiyon Termodinamiği	127
4.9. Hücrelerin SEM ve STEM Analizi ile Cr ve Pb'nin Hücreler Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi.....	128
4.9.1. Hücrelerin SEM Görüntüleri	128
4.9.2. MT2A ve MT3 Hücrelerinin STEM Görüntüleri.....	130
4.10. Fonksiyonel Grupların Cr ve Pb Biyosorpsiyonuna Etkisi.....	131
4.11. Sonuç ve Öneriler	134

KAYNAKÇA	138
ÖZGEÇMİŞ.....	171



KISALTMALAR

AAS: Atomik absorpsiyon analizi

AKM: Askıda katı madde

As: Arsenik

AtPCS: *Arapidopsis thaliana* fitoşelatin sentezi

B. cereus: *Bacillus cereus*

CaCl₂: Kalsiyum klorür

Cd: Kadmiyum

C₀: Başlangıç metal konsantrasyonu mg/L

Co: Kobal

Cr: Krom

Cr(VI): Hekzavalent krom

Cr(III): Trivalent krom

Cr(OH)₃: Krom hidroksit

Cs: Arıtm sonrasındaki metal konsantrasyonu mg/L

Cu: Bakır

Ç.O.: Çözünmüş oksijen

EU: Avrupa Birliği

EC: Elektriksel iletkenlik

E. coli: *Escherichia coli*

EDS: Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit

FTIR: Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre

g: gram

GD: Genetiği değiştirilmiş

GDB: Genetiği değiştirilmiş bakteriler

GDM: Genetiği değiştirilmiş mikroorganizma

GDO: Genetiği değiştirilmiş organizma

GST: Gulutasyon S transferazlar

HNO₃: Nitrik asit

H₂SO₄: Sülfirik asit

Hg: Civa

hMT-1A: İnsan metallothiyonin 1A geni

ICP-MS: İndüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometrisi

IPTG: İzopropil p-D-tiyogalaktoz

K₂Cr₂O₇: Potasyum dikromat

kDa: Kilo dalton

KOI: Kimyasal oksijen ihtiyacı

KOSB: Kayseri Organize Sanayi Bölgesi

L: Litre

LB: Luria bertani

LC50: Hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon

MBP: Maltoz bağlayıcı protein

Mg: Magnezyum

mg: miligram

MİK: Minimum inhibisyon konsantrasyon

mL: Mili litre

mM: Mili molar

mntA: Manganez taşıma geni

MT: Metalloprotein

MT2A: Metalloprotein 2A

MT3: Metalloprotein 3

Na: Sodyum

NaCl: Sodyum klorür

Ni: Nikel

nmol: Nano mol

OD₆₀₀: 600 nm dalga boyundaki optik yoğunluk

OsMT: Pirinç metalloproteinini

Pb: Kurşun

Pb(NO₃)₂: Kurşun nitrat

PBS: Fosfat tamponu

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ppk: Polifosfat kinaz

P. aerogenosa: *Pseudomonas aerogenosa*

rpm: Dakikadaki devir sayısı

SEM: Taramalı elektron mikroskop

SKKY: Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği

STEM: Geçirimli taramalı elektron mikroskobu

TEM: Taramalı elektron mikroskobu

TSE 266: Türk Standartları Enstitüsü

TTC: Trifeniltetrazoryum klorür

USEPA: ABD Çevre Koruma Ajansı

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

X-gal: 5-bromo-4-kloro-3-indol--D-galaktosid

Zn: Çinko

μM: Mikro molar

μl: Mikro litre

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Türkiye’de ve Dünyada kabul edilen içme suyu standartları	5
Tablo 1.2. Atıksuların atıksu altyapı tesislerine deşarjında öngörülen atıksu standartları	5
Tablo 1.3. Sanayi atıksularının alıcı ortama Cr(VI) deşarj limitleri.	7
Tablo 1.4. Sanayi atıksularının alıcı ortama toplam Cr deşarj limitleri.	8
Tablo 1.5. Sanayi atıksularının alıcı ortama Pb deşarj limitleri.	9
Tablo 1.6. Ağır metal kirlilik kaynakları	10
Tablo 1.7. Ağır metal giderim yöntemleri, avantaj ve dezavantajları.....	15
Tablo 1.8. Biyosorpsiyon ve Biyoakümülyasyon Prosesleri Arasındaki Farklar	19
Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan LB agar besiyeri bileşimi	51
Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan LB sıvı besiyeri bileşimi	51
Tablo 2.3. Metal tuzlarının kimyasal formülü ve molekül ağırlıkları.....	51
Tablo 2.4. Deneylerde kullanılan cihazlar	52
Tablo 2.5. Deneylerde kullanılan kimyasallar	53
Tablo 2.6. KOSB Krom Kaplama Tesislerinin Atıksu Karakterizasyonu	69
Tablo 3.1. Bakterilerin Cr ve Pb MİK Değerleri	78
Tablo 3.2. MT2A’nın Cr için izoterm modelleri katsayıları.....	99
Tablo 3.3. MT3’ün Pb için Langmuir ve Freundlich izoterm modellerinin katsayıları	101
Tablo 3.4. Yalancı birinci mertebeden ve yalancı ikinci mertebeden reaksiyon kinetik sabitleri.....	102
Tablo 3.5. Yalancı birinci mertebeden ve yalancı ikinci mertebeden reaksiyon kinetik sabitleri.....	104
Tablo 3.6.Cr’nin Farklı Sıcaklıklardaki Termodinamik Parametreleri.....	105
Tablo 3.7. Pb’nin Farklı Sıcaklıklardaki Termodinamik Parametreleri.....	106
Tablo 4.1. Biyosorpsiyonun R_L değerlerine göre Değerlendirilmesi.....	126

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Krom	12
Şekil 1.2. Kurşun.....	14
Şekil 1.3. Biyogiderim mekanizmaları	16
Şekil 1.4. Bakteriler tarafından toksik metallere karşı genetik direnç mekanizmasının geliştirilmiş bir gösterimi.....	24
Şekil 1.5. Metalloproteinin yapısı	30
Şekil 1.6. MT2A'nın 16.kromozom üzerindeki lokalizasyonunun şematik gösterimi ...	31
Şekil 2.1. <i>E. coli</i> Jm109 ve rekombinantları	50
Şekil 2.2. Klonlama: Restriksiyon endonükleaz enzimleri (a), Ligaz enzimi (b), MT2A ve MT3 insan genleri (c)	55
Şekil 2.3. pET-21 plazmidinin fiziki haritası	56
Şekil 2.4. Rekombinant plazmid (a), Isı şoku ile gen aktarımı için sıcaklığın 42 °C'ye ayarlanması (b-c).....	57
Şekil 2.5. MT2A ve MT3 genleri klonlanan hücrelerin petrideki koloni görünümü	59
Şekil 2.6. Overnight kültürlerin (a) ve gliserol stokların (b) hazırlanması	60
Şekil 2.7. Ağır metal konsantrasyonlarının hazırlanması a) Stok çözeltilerinden seyreltme yapılması b) Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan metal ara stokları.....	61
Şekil 2.8. MİK tayini: Çalkalamalı inkübatör (a), Mikroplaka okuyucu (b)	62
Şekil 2.9. Cr MİK değerinin saptanması için kullanılan mikroplaka kuyucuk dizaynı ..	63
Şekil 2.10. Pb MİK değerinin saptanması için kullanılan mikroplaka kuyucuk dizaynı	63
Şekil 2.11. Santrifüj sonrasında örneklerin şırınga filtreden süzülmesi	65
Şekil 2.12. Hücre yüzeyinde metal birikimi çalışmaları	65
Şekil 2.13. Difenilkarbazit metodu: Cr(VI) standart çözeltilerinin hazırlanması (a), Standart çözeltileri difenilkarbazit eklendikten sonraki menekşe moru renk oluşumu (b)	67
Şekil 2.14. Cr(VI) kalibrasyon eğrisi	67
Şekil 2.15. KOSB Krom Kaplama Tesisi Atıksu Numuneleri.....	68
Şekil 2.16. Manifold düzeniği.....	68
Şekil 2.17. İkinci tesis krom kaplama tesisi atıksuyunun hücrelere uygulandıktan 24 saat sonraki koloni görünümü <i>E. coli</i> Jm109 (a), MT2A (b), MT3 (c)	69

Şekil 3.1. Farklı konsantrasyonlarda Cr uygulanan <i>E. coli</i> Jm109'un büyüme eğrisi	75
Şekil 3.2. Farklı konsantrasyonlarda Cr uygulanan MT2A'nın büyüme eğrisi	75
Şekil 3.3. Farklı konsantrasyonlarda Cr uygulanan MT3'ün büyüme eğrisi	76
Şekil 3.4. Farklı konsantrasyonlarda Pb uygulanan <i>E. coli</i> Jm109'un büyüme eğrisi....	77
Şekil 3.5. Farklı konsantrasyonlarda Pb uygulanan MT2A'nın büyüme eğrisi.....	77
Şekil 3.6. Farklı konsantrasyonlarda Pb uygulanan MT3'ün büyüme eğrisi	78
Şekil 3.7. Cr uygulanan <i>E. coli</i> Jm109 suşunun mikrop laka görüntüsü	79
Şekil 3.8. Cr uygulanan MT2A suşunun mikrop laka görüntüsü.....	79
Şekil 3.9. Cr uygulanan MT3 suşunun mikrop laka görüntüsü.....	80
Şekil 3.10. Pb uygulanan <i>E. coli</i> Jm109 suşunun mikrop laka görüntüsü	80
Şekil 3.11. Pb uygulanan MT2A suşunun mikrop laka görüntüsü	81
Şekil 3.12. Pb uygulanan MT3 suşunun mikrop laka görüntüsü	81
Şekil 3.13. Hücrelerin sulu çözeltilerden Cr giderim oranları	82
Şekil 3.14. Numunelere difenilkarbazit çözeltisi eklendikten sonraki renk oluşumu.....	83
Şekil 3.15. Hücrelerin Sulu Çözeltilerden Cr(VI) İndirgeme Oranları	83
Şekil 3.16. Hücrelerin krom kaplama tesisi atıksuyundan Cr giderim oranları	84
Şekil 3.17. Hücrelerin sulu çözeltilerden Pb giderim oranları	85
Şekil 3.18. Hücrelerin krom kaplama tesisi atıksuyundan Pb giderim oranları.....	86
Şekil 3.19. MT2A biyosorbentinin pH'ya bağlı Cr biyosorpsiyonu.....	87
Şekil 3.20. MT2A biyosorbentinin sıcaklığa bağlı Cr biyosorpsiyonu.....	88
Şekil 3.21. MT2A biyosorbentinin zamana bağlı Cr biyosorpsiyonu.....	89
Şekil 3.22. MT2A biyosorbent konsantrasyonuna bağlı Cr biyosorpsiyonu	90
Şekil 3.23. MT2A biyosorbentinin Cr konsantrasyonuna bağlı Cr biyosorpsiyonu	91
Şekil 3.24. MT3 biyosorbent pH'ya bağlı Pb biyosorpsiyonu.....	92
Şekil 3.25. MT3 biyosorbent sıcaklığa bağlı Pb biyosorpsiyonu	93
Şekil 3.26. MT3 biyosorbentinin temas süresine bağlı Pb biyosorpsiyonu	94
Şekil 3.27. MT3 biyosorbent konsantrasyonuna bağlı Pb biyosorpsiyonu.....	95
Şekil 3.28. MT3 biyosorbentinin Pb konsantrasyonuna bağlı Pb biyosorpsiyonu	96
Şekil 3.29. MT2A'nın döngü sayısına göre Cr biyosorpsiyon ve desorpsiyon oranları .	97
Şekil 3.30. MT3'ün döngü sayısına göre Pb biyosorpsiyon ve desorpsiyon oranları.....	98
Şekil 3.31. MT2A'nın Cr için Langmuir izoterm eğrisi	99
Şekil 3.32. MT2A'nın Cr için Freundlich izoterm eğrisi.....	99
Şekil 3.33. MT3'ün Pb için Langmuir izoterm eğrisi	100

Şekil 3.34. MT3'ün Pb için Freundlich izoterm eğrisi.....	101
Şekil 3.35. Cr'nin Yalancı Birinci Dereceden Kinetik Modeli.....	102
Şekil 3.36. Cr'nin Yalancı İkinci Dereceden Kinetik Modeli.....	102
Şekil 3.37. Pb'nin Yalancı Birinci Dereceden Kinetik Modeli.....	103
Şekil 3.38. Pb'nin Yalancı İkinci Dereceden Kinetik Modeli	104
Şekil 3.39. MT2A'nın Cr termodinamiği hesabı için $1/T$ 'ye karşılık $\ln K_c$ grafiği.....	105
Şekil 3.40. MT3'ün Pb termodinamiği hesabı için $1/T$ 'ye karşılık $\ln K_c$ grafiği.....	106
Şekil 3.41. <i>E. coli</i> Jm109 suşu SEM görüntüleri	108
Şekil 3.42. MT2A suşu SEM görüntüleri.....	109
Şekil 3.43. MT3 suşu SEM görüntüleri	110
Şekil 3.44. MT2A STEM görüntüleri	112
Şekil 3.45. MT3 hücresinin STEM görüntüleri	112
Şekil 3.46. MT2A kontrol ve Cr uygulanmış (25 mg/L) MT2A'nın FTIR spektrumu	113
Şekil 3.47. MT3 kontrol ve Pb uygulanmış (100 mg/L) MT3'ün FTIR spektrumu	114

GİRİŞ

Günümüzde, nüfusun hızlı bir şekilde artması, sanayileşme, düzensiz kentleşme, teknolojideki gelişmeler, enerji-besin yetersizliği, insanların aşırı tüketim taleplerine paralel olarak atıkların miktarı ve çeşitliliği sürekli olarak artmaktadır. Bu durumun bir sonucu olarak çevre kirliliği küresel anlamda önemli bir sorun haline gelmiştir (Verma ve Kuila, 2019). Endüstriyel faaliyetler sonucunda oluşan sanayi atıklarının su kaynaklarına deşarj edilmesi, akarsuların ağır metallerle daha çabuk ve fazla kirlenmesine yol açmakla kalmayıp, insan sağlığı ve ekosistem için önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Bu nedenle ağır metal içeren atıksuların uygun arıtma yöntemleri kullanılarak acilen arıtılması gereklidir (Doğan, 2012). Atıksulardan ağır metallerin giderilmesi için elektrokoagülasyon, kimyasal çöktürme, membran teknolojisi, ultrafiltrasyon, çökelme, çöktürme, elektrokimyasal çöktürme, indirgeme, filtrasyon, ters ozmos, iyon değişimi ve adsorpsiyon prosesleri yaygın olarak kullanılan teknolojilerdir. Ancak bu proseslerin maliyetlerinin yüksek olması, ilave kimyasal gereksinimi, zararlı yan ürün oluşumu, kompleks proses olmaları ve düşük arıtma verimlerine sahip olmaları gibi dezavantajları kullanım alanlarını kısıtlamaktadır. Bu prosesler genellikle atıksudaki ağır metallerin yüksek konsantrasyonlarının arıtımı için kullanılmaktadır (Cao vd., 2018; Sağlam ve Cihangir, 1995). Düşük konsantrasyonlardaki ağır metallerin gideriminde bu proseslerin kullanımı oldukça zordur. Günümüzde suda yaşayan mikroorganizmaların atıksularda bulunan metallere karşı direnç kazanarak bu metallerin gideriminde etkili rol oynadığı bilinmektedir (Srinath vd., 2002). Biyoteknolojik süreçlerde ağır metaller gibi tehlikeli maddelerin giderilmesinde mikroorganizmaların kullanılıyor olması biyoremediasyon prosesinin önemini gün geçtikçe arttırmaktadır (Vural vd., 2018). Metallerin giderimi ve geri kazanımının, doğada hali hazırda bulunan mikroorganizmalar ile yapılması arıtma maliyetini düşürmektedir. Biyolojik arıtım süreçleri, geleneksel fiziksel-kimyasal arıtım yöntemlerine kıyasla çevre dostu, ekonomik, kolay uygulanabilir olması ve yüksek arıtma verimliliğine sahip olması nedeniyle yaygın olarak

kullanılmaktadır (Sağlam ve Cihangir, 1995). Ağır metal içeren atıksuların giderimi hakkında ekonomik, çevre dostu ve kolay uygulanabilir teknolojilere olan ilginin artması nedeniyle, günümüzde bu konuda yapılan çalışmalar hız kazanmıştır.

Bu çalışmanın amacı, genetik mühendisliği teknolojileri kullanılarak sulu çözeltilerden ve atıksudan Cr ve Pb'nin giderimini sağlamaktır. Literatür çalışmaları sonucunda elde edilen bilgilerden yola çıkılarak önemli metal bağlayıcı protein olan insan MT (MT2A ve MT3) genleri, *E. coli* suşuna klonlanmıştır. MT2A ve MT3 genlerinin sulu çözeltilerden ve krom kaplama tesisi çıkış suyundan Cr ve Pb giderimindeki etkinliğine dair literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca, rekombinant MT2A ve MT3 biyosorbentleri kullanılarak Cr ve Pb'nin sulardan biyosorpsiyonu ilk defa bu çalışmada gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma ile literatürdeki bu eksikliklere katkı sağlanarak, Cr ve Pb biyosorpsiyonlarının en iyi hangi ortam koşullarında gerçekleştiği ve biyosorpsiyon mekanizması (izoterm, kinetik ve termodinamik açıdan) hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir. Biyogiderim ve biyosorpsiyon proseslerini etkileyen dış ortam koşullarını tespit etmek için çalışmada sulu çözeltiler kullanılmıştır. Bu şekilde optimum şartlar belirlenmiştir ve gerçek atıksu arıtımı gerekli olan ortam koşullarının belirlenmesi sağlanmıştır. Çalışma sonunda elde edilen sonuçlar ile endüstriyel atıksulardan ağır metal giderimi uygulamalarında karşılaşılabilecek problemlerin çözümüne ve giderim verimlerinin artırılması için uygulanacak yeni metotların geliştirilmesine katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Atıksular

Evsel, endüstriyel ve tarımsal kullanımdan sonra akarsu, deniz ve göllere deşarj edilen özelliğı tamamen ya da kısmen değışmiş sulara atıksu denir (Öztürk, 2008). Su kirliliğı, alıcı su kaynağının kimyasal, fiziksel, bakteriyolojik, radyoaktif ve ekolojik özelliklerinin olumsuz yönde etkilenmesi olarak adlandırılır. Sular, fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak kirlenebilmektedir. Suların renk, koku, tat, sıcaklık gibi fiziksel özelliklerinin değışmesi fiziksel kirlilik olarak adlandırılır. Suyun sıcaklığının değışmesi, suyun yoğunluğu, viskozitesi ve yüzey geriliminin değışmesine neden olmaktadır. Ayrıca su sıcaklığına bağılı olarak gazların sudaki çözünürlüğü de değışmektedir (Yalçın, 2016). Sudaki renk ve bulanıklık suyun ışık geçirgenliğini etkilemesinin bir sonucu olarak organizma gelişimini değıştirmektedir. Bunlar gibi suyun fiziksel özelliğindeki değışmeler sucul hayatı olumsuz yönde etkilemektedir ve diğerkirleticilerin varlığının bir göstergesidir (Yalçın, 2016). Alıcı su ortamında kimyasal kirliliğe, inorganik atıklar ve ağır metaller neden olmaktadır. Sudaki Ç.O. ile fosfor, azot, ağır metaller ve radyoaktif maddelerin reaksiyona girmesi ile sudaki çözünmüş oksijen konsantrasyonu azalmaktadır. Böylece sudaki canlı hayatını olumsuz yönde etkilemektedir. Organik atıkların yüksek konsantrasyonlarda alıcı su ortamına deşarj edilmesinin sonucunda bakteriler, küfler ve algler suda çok fazla çoğalarak suyun biyolojik olarak kirlenmesine neden olur. Virüsler ve patojen bakteriler de su ortamında üreyerek insan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir (Sundstrom ve Klei, 1979). Sulardaki kirlenme sucul ekosistemlerin doğal dengesinin bozulmasına ve suyun kendi kendini temizleme kapasitesinin azalmasına ya da tamamen yok olmasına neden olmaktadır. Su kirliliğı, hava ve toprak ekosistemlerini de olumsuz yönde etkileyerek doğal dengenin bozulmasına sebep olmaktadır (Öztürk, 2008).

1.2. İçme Suyu Ağır Metal Standartları

Ağır metal kirleticileri çevreye doğal ve antropojenik yollarla girebilir ve topraklarda, su kütlelerinde veya havada birikebilir. Havaya karışan ağır metaller, hayvanlar ve insanlar tarafından havadan aerosol olarak veya toz halinde solunarak metabolizmayı etkileyecekleri alanlara akciğerler yoluyla ulaşırlar (Hamutoğlu vd., 2012). Toprakta bulunan organik madde olan humus, (toprağın yeşil görünmesini sağlar) ağır metal katyonlarına karşı yüksek bir afiniteye sahiptir ve onları topraktan geçen sudan alır. Bitkilerin kökleri, su ile birlikte bu elementleri alır ve önce bitkilere sonra da hayvanlara aktarılır. Ağır metaller ayrıca toprakta bulunan mineral parçacıklarına adsorpsiyon ve çökelme reaksiyonları ile birikir (Manafi vd., 2012). Suda adsorbe edilmiş ağır metallerle sahip parçacıklar dibe çöker ve çökeltiler üzerinde birikebilir (Kang ve So, 2016). Organizmalar bu parçacıkları tüketirse, ağır metaller besin ağına girer (Arivalagan vd., 2014; Kumar vd., 2017). Böylece besin zincirinde her bir basamakta toksik metal kalıntısı meydana gelir ve her bir üst basamakta kalıntı miktarı artış gösterir (Kargın ve Erdem, 1991). Besin zincirinde, genellikle biyolojik olarak bozunmayan ağır metaller; akciğer, böbrek, karaciğer, pankreas ve sinir bozuklukları gibi birçok sağlık tehlikesine yol açacak şekilde birikir (Arivalagan vd., 2014; Kumar vd., 2017). Bu nedenle sürekli tüketilen içme sularının ve yiyeceklerin içerebileceği maksimum ağır metal değerleri sınırlandırılmış ve resmi kuruluşlar tarafından düzenli olarak kontrol edilmesi zorunlu hale gelmiştir (Kahvecioglu vd., 2003). Su kaynaklarının korunması ve su kirliliğinin önlenmesi için dünyada ve ülkemizde gerekli hukuki ve teknik esasları ortaya koyan standartlar bulunmaktadır. Ağır metaller gibi birçok element ve bileşik belirli oranların üzerinde bulunduğu toksik etki göstermektedir. Bu nedenle Türk Standartları (TSE 266), Dünya Sağlık Örgütü (WHO), ABD Çevre Koruma Ajansı (USEPA) ve Avrupa Birliği (EC)'ne göre içme suyu kalitesi limit değerleri Tablo 1.1'de verilmiştir (EPA, 2018; Jobby vd., 2018; WHO, 2011). Tablo 1.2 'de Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği'nde (SKKY) yer alan atıksu standartları verilmiştir (SKKY, 2004).

Tablo 1.1. Türkiye’de ve Dünyada kabul edilen içme suyu standartları

Ağır Metaller	TS 266 2005 (mg/L)	WHO 2011 (mg/L)	EPA 2008 (mg/L)	EU 1991 (mg/L)
Cr(VI)	-	0,05	0,1	-
Toplam Cr	0,05	0,05	0,10	0,05
Pb	0,010	0,010	0,015	0,010
B	1	2,4	-	1
As	0,01	0,01	0,01	0,01
Cd	0,005	0,003	0,005	0,005
Cu	2	2	1	2

Tablo 1.2. Atıksuların atıksu altyapı tesislerine deşarjında öngörülen atıksu standartları (SKKY Tablo 25).

Parametre	Kanalizasyon sistemleri tam arıtma ile sonuçlanan atıksu altyapı tesislerinde	Kanalizasyon sistemleri derin deniz deşarjı ile sonuçlanan atıksu altyapı tesislerinde
Sıcaklık (°C)	40	40
pH	6,5-10	6-10
Askıda katı madde (mg/L)	500	350
Yağ ve gres (mg/L)	250	50
Katran ve petrol kökenli yağlar (mg/L)	50	10
Kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) (mg/L)	4000	600
Biyokimyasal Oksijen İhtiyacı (BOİ₅) (mg/L)	-	400
Sülfat (SO₄²⁻) (mg/L)	1700	1700
Toplam sülfür (S) (mg/L)	2	2

Tablo 1.2 devam ediyor

Parametre	Kanalizasyon sistemleri tam arıtma ile sonuçlanan atıksu altyapı tesislerinde	Kanalizasyon sistemleri derin deniz deşarjı ile sonuçlanan atıksu altyapı tesislerinde
Fenol (mg/L)	20	10
Serbest klor (mg/L)	5	5
Toplam azot (N) (mg/L)	- (a)	40
Toplam fosfor (P) (mg/L)	- (a)	10
Arsenik (As) (mg/L)	3	10
Toplam siyanür (Toplam CN) (mg/L)	10	10
Toplam kurşun (Pb) (mg/L)	3	3
Toplam kadmiyum (Cd) (mg/L)	2	2
Toplam krom (Cr) (mg/L)	5	5
Toplam civa (Hg) (mg/L)	0,2	0,2
Toplam bakır (Cu) (mg/L)	2	2
Toplam nikel (Ni) (mg/L)	5	5
Toplam çinko (Zn) (mg/L)	10	10
Toplam kalay (Sn) (mg/L)	5	5
Toplam gümüş (Ag) (mg/L)	5	5
Cl ⁻ (Klorür) (mg/L)	10000	-
Metilen mavisi ile reaksiyon veren yüzey aktif maddeleri (MBAS) (mg/L)	Biyolojik olarak parçalanması Türk Standartları Enstitüsü standartlarına uygun olmayan maddelerin boşaltımı prensip olarak yasaktır.	

Tablo 1.3'te SKKY'de sanayi atıksularının Cr(VI) ve Tablo 1.4'te toplam Cr deşarj limit değerleri verilmiştir. Tablo 1.5'te sanayi atıksularının SKKY'de belirtilen Pb deşarj limit değerleri verilmiştir.

Tablo 1.3. Sanayi atıksularının alıcı ortama Cr(VI) deşarj limitleri (SKKY, 2004)

Endüstri (Cr(VI))	Kompozit numune 2 saatlik (mg/L)	Kompozit numune 24 saatlik (mg/L)
Deri, Deri Mamulleri ve Benzeri Sanayilerin Atıksularının Alıcı Ortama Deşarj Standartları	0,5	0,3
Petrol Sanayii (Petrol Rafinerileri ve Benzerleri)	0,2	0,1
Petrol Sanayii (Hidrokarbon Üretim Tesisleri)	0,5	0,2
Kimya Sanayi (Boya, Boya Hammadde ve Yardımcı Madde Üretimi ve Benzerleri)	0,5	0,3
Kimya Sanayii (Petrokimya ve Hidrokarbon Üretim Tesisleri)	0,5	0,2
Metal Sanayii (Genelde Metal Hazırlama ve İşleme)	0,5	0,5
Metal Sanayii (Galvanizleme)	0,5	-
Sektör: Metal Sanayii (Dağlama İşlemi)	0,5	-
Metal Sanayii (Elektrolitik Kaplama, Elektroliz Usulüyle Kaplama)	0,5	-
Metal Sanayii (Metal Renklendirme)	0,5	-
Metal Sanayii (İletken Plaka İmalatı)	0,5	-
Metal Sanayii (Sırlama, Emayeleme, Mineleme Tesisleri)	0,5	-
Metal Sanayii (Metal Taşlama ve Zımparalama Tesisleri)	0,5	-
Metal Sanayii (Laklama/Boyama)	0,5	-
Metal Sanayii (Alüminyum Hariç Olmak Üzere Demir Dışı Metal Üretimi)	0,5	-
Seri Makina İmalatı, Elektrik Makinaları ve Techizatı, Yedek Parça Sanayii Atıksularının Alıcı Ortama Deşarj Standartları	0,5	0,5
Taşıt Fabrikaları (Otomobil, Kamyon, Traktör, Minibüs, Bisiklet, Motosiklet ve Benzeri Taşıt Aracı Üreten Fabrikalar)	0,05	-
Karışık Endüstriyel Atıksularının Alıcı Ortama Deşarj Standartları Küçük ve Büyük Organize Sanayi Bölgeleri ve Sektör Belirlemesi Yapılamayan Diğer Sanayiler	0,5	0,5
Katı Artık Değerlendirme ve Bertaraf Tesisleri	0,5	0,5

Tablo 1.4. Sanayi atıksularının alıcı ortama toplam Cr deşarj limitleri (SKKY, 2004)

Endüstri (Toplam Cr)	Kompozit numune 2 saatlik (mg/L)	Kompozit numune 24 saatlik (mg/L)
Deri, Deri Mamulleri ve Benzeri Sanayilerin Atıksularının Alıcı Ortama Deşarj Standartları	3	2
Maden Sanayi	2	1
Tekstil Sanayi	2	1
Kimya Sanayi (Boya, Boya Hammadde ve Yardımcı Madde Üretimi ve Benzerleri)	2	1
Metal Sanayi (Genelde Metal Hazırlama ve İşleme)	2	1
Metal Sanayi (Galvanizleme ve Dağlama işlemi)	2	-
Metal Sanayi (Elektrolitik Kaplama, Elektroliz Usulüyle Kaplama)	1	-
Metal Sanayi (Metal Renklendirme)	1	-
Metal Sanayi (İletken Plaka İmalatı)	1	-
Metal Sanayi (Sırlama, Emayeleme, Mineleme Tesisleri)	2	-
Metal Sanayi (Metal Taşlama ve Zımparalama Tesisleri)	1	-
Metal Sanayi (Laklama/Boyama)	1	-
Metal Sanayi (Alüminyum Hariç Olmak Üzere Demir Dışı Metal Üretimi)	2	-
Taşıt Fabrikaları (Otomobil, Kamyon, Traktör, Minibüs, Bisiklet, Motosiklet ve Benzeri Taşıt Aracı Üreten Fabrikalar)	2	1
Karışık Endüstriyel Atıksularının Alıcı Ortama Deşarj Standartları Küçük ve Büyük Organize Sanayi Bölgeleri ve Sektör Belirlemesi Yapılamayan Diğer Sanayiler	2	1
Katı Artık Değerlendirme ve Bertaraf Tesisleri	2	1

Tablo 1.5. Sanayi atıksularının alıcı ortama Pb deşarj limitleri (SKKY, 2004).

Endüstri (Pb(II))	Kompozit numune 2 saatlik (mg/L)	Kompozit numune 24 saatlik (mg/L)
Maden Sanayii (Kadmiyum Metali, Demir ve Demir Dışı Metal Cevherleri ve Endüstrisi, Çinko Madenciliği, Kurşun ve Çinkonun Rafinize Edildiği Tesisler, Kalsiyum, Florür, Grafit ve Benzeri Cevherlerin Hazırlanması)	0,5	-
Maden Sanayii (Seramik ve Toprakta Çanak-Çömlek Yapımı ve Benzerleri)	1	-
Cam Sanayii Atıksularının Alıcı Ortama Deşarj Standartları	1	Anlık numune -
Petrol Sanayii (Hidrokarbon Üretim Tesisleri)	1	0,5
Kimya Sanayi (Boya, Boya Hammadde ve Yardımcı Madde Üretimi ve Benzerleri)	2	1
Kimya Sanayii (Petrokimya ve Hidrokarbon Üretim Tesisleri)	1	0,5
Metal Sanayii (Genelde Metal Hazırlama ve İşleme)	2	1
Metal Sanayii (Galvanizleme)	1	-
Metal Sanayii (İletken Plaka İmalatı)	1	-
Metal Sanayii (Sırlama, Emayeleme, Mineleme Tesisleri)	1	-
Metal Sanayii (Akü İmalatı, Stabilizatör İmalı, Birincil ve İkincil Akümülatör, Batarya ve Pil İmalatı ve Benzeri.)	2	-
Metal Sanayii (Metal Taşlama ve Zımparalama Tesisleri)	1	-
Metal Sanayii (Laklama/Boyama)	1	-
Metal Sanayii (Alüminyum Hariç Olmak Üzere Demir Dışı Metal Üretimi)	2	-
Metal Sanayii (Demir ve Demir Dışı Dökümhane ve Metal Şekillendirme)	2	-
Seri Makina İmalatı, Elektrik Makinaları ve Techizatı, Yedek Parça Sanayii Atıksularının Alıcı Ortama Deşarj Standartları	2	1
Taşıt Fabrikaları (Otomobil, Kamyon, Traktör, Minibüs, Bisiklet, Motosiklet ve Benzeri Taşıt Aracı Üreten Fabrikalar)	0,3	-
Karışık Endüstriyel Atıksularının Alıcı Ortama Deşarj Standartları Küçük ve Büyük Organize Sanayi Bölgeleri ve Sektör Belirlemesi Yapılamayan Diğer Sanayiler	2	1
Katı Artık Değerlendirme ve Bertaraf Tesisleri	2	1

1.3. Ağır Metaller ve Çevresel Etkileri

Metaller yer kabuğunda doğal olarak bulunan bileşenlerdir (Nies, 1999). Ağır metaller, yoğunluğu 5 g/cm^3 'ten daha büyük olan ve moleküler ağırlıkları 63,5 ve 200,6 g olan doğada eser miktarda bulunan metaller olarak tanımlanmaktadır (Nies, 1999). Cr, kadmiyum (Cd), civa (Hg), arsenik (As), Pb dahil olmak üzere periyodik tabloda yaklaşık olarak 60 metal ağır metal olarak adlandırılmaktadır (Kahvecioglu vd., 2003). Metaller organizmaların hayatını devam ettirmeleri için gerekli olup olmamasına göre üç ana grupta sınıflandırılmaktadır. İlk grup, biyokimyasal ve fizikokimyasal olayların gerçekleştirilmesi için düşük konsantrasyonlarda gerekli olan (Zn, Ni, Cu, Fe gibi) elementlerden oluşmaktadır ancak bu metallerin yüksek konsantrasyonları mikro ve makroorganizmalar için toksiktir (Bruins vd., 2000). İkinci grupta, organizma için gerekli olabilen nikel (Ni), silisyum (Si), kalay (Sn) ve vanadyum (V) gibi elementler yer almaktadır. Üçüncü grupta ise As, Cr, berilyum (Be), Cd, Hg, Pb, Si ve antimon (Sb) gibi organizmalar için toksik ve esansiyel olmayan ağır metaller yer almaktadır (Katalay, 2005). Ağır metaller de kendi içinde üç ayrı alt gruba ayrılmaktadır. Bunlar, toksik metaller (Hg, Cr, Pb, Zn, Cu, Ni, Cd, As, kobalt (Co), Sn, vb.), değerli metaller (Pd, platin (Pt), gümüş (Ag), altın (Au), rutenyum (Ru) vb.) ve radyonüklitler (uranyum (U), toryum (Th), radyum (Ra), Amerikyumun (Am), vb. gibidir (Wang ve Chen, 2006). Ağır metaller organik bileşikler gibi doğada parçalanamazlar ancak biyolojik sistemlerde birikerek besin zincirinde yer alırlar (Wang ve Chen, 2006). Tablo 1.6'da çeşitli ağır metallerin kirlilik kaynağı listelenmiştir (Jacob vd., 2018).

Tablo 1.6. Ağır metal kirlilik kaynakları

Kaynaklar	Ağır Metaller	Şiddeti	Referanslar
Endüstriyel atıklar: Madencilik, ilaç, tekstil, petrokimya ve petrol sızıntıları ve E-atık	Zn, Ni, Cu, Cr, Pb, Cd, Mn	Yüksek	(Schaidler vd., 2014)
Hava kaynaklı kaynaklar: Yığın, araç ve kaçak emisyonlar	As, Cd, Pb	Geniş alan dağılım	(Wuana ve Okieimen, 2011)

Tablo 1.6 devam ediyor

Kaynaklar	Ağır Metaller	Şiddeti	Referanslar
Gübreler	Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Zn	Şiddetli	(Roberts, 2014)
Pestisitler	Cu, Hg, Mn, Pb, Zn	Orta	(Tchounwou vd., 2012)
Kanalizasyon çamuru	As, Cd, Cr, Cu, Pb, Hg, Ni, Se, Mo, Zn, Tl, Sb	Düşük-orta	(Shamuyarira and Gumbo, 2014)

Tablo 1.6’da verilen çeşitli kirletici kaynaklarından ağır metaller çevreye doğal ve antropojenik yollarla girer ve toprakta, su kütlelerinde veya havada birikebilir (Chen vd., 2015; Kuppusamy vd., 2017). Esansiyel olmayan ağır metaller çok düşük konsantrasyonlarda bile psikolojik yapıyı etkileyerek sağlık problemlerine yol açabilir. Buna en iyi örneklerden biri, kükürtlü enzimlere bağlanan Hg’dir (Duffus ve Worth, 1996). Ağır metallerin organizmaya göre yaşamsal olup olmadığı değişmektedir. Örneğin Ni, bitkiler üzerinde toksik etki gösterirken, hayvanlarda eser element olarak bulunması gerekir. Bazı sistemlerde ise ağır metallerin etki mekanizması konsantrasyona bağlı olarak değişmektedir. Ağır metaller konsantrasyon sınırını aştıklarında toksik etki gösterirler. Ancak, ağır metallerin canlı bünyelerindeki etkisi, canlı türüne ve metal iyonunun çeşidine ve yapısına bağlıdır (çözünürlük değeri, kimyasal yapısı, redoks ve kompleks oluşturma yeteneği, vücuda alınış şekli, çevrede bulunma sıklığı, lokal pH değeri vb.) (Kahvecioglu vd., 2003).

1.3.1.Krom

Atom numarası 24, atom ağırlığı 51,996 g/mol, yoğunluğu 7,19 g/cm³ olan Cr’nin erime noktası ise 1900 °C’dir (Yalçın, 2016). Periyodik cetvelde “Cr” sembolü ile gösterilir. Cr dünyada en fazla bulunan elementler arasında yedinci sırada yer alırken, yer kabuğunda 21. sırada bulunur (Doğan, 2012; Koçberber Kılıç, 2008).



Şekil 1.1. Krom

Yer kabuğundaki, mevcut Cr miktarı 100 ile 300 $\mu\text{g/g}$ arasında değişirken, topraklarda 5 ile 3000 $\mu\text{g/g}$ aralığında bulunur. Dünyada yıllık Cr üretimi yaklaşık 107 ton olup, bunun önemli bir kısmı (%60-70) amalgam imalat sanayinde kullanılırken, sadece küçük bir kısmı (%15) diğer kimyasal endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadır (Tian vd., 2019). Cr, paslanmaz çelik metal ve silah endüstrisi, elektrokaplama, kromat imalatı, boyalar ve pigment imalatı, ahşap koruma, deri tabaklama endüstrisi, geleneksel ve nükleer santrallerde alaşım üretimi ve korozyon önleyici olarak farklı antropojenik aktivitelerde yaygın kullanımı nedeniyle yaygın çevresel kirleticilerden biridir ve önemli miktarda Cr içeren atıksu üretilmesinin sonucu olarak doğal su kütlelerine salınır (Thacker vd., 2006; Tian vd., 2019). Cr'nin iki, üç ve altı değerlikli formları vardır ancak iki değerlikli Cr(II) formunun kararsız olması nedeniyle, altı değerlikli Cr(VI) ve üç değerlikli Cr(III) formları atıksuda ve doğada en çok bulunan türleridir. Cr(VI), suda iyi çözünebilen özellikte olup kanserojendir ve Cr(III)'ten 100 kat daha toksik ve 1000 kat daha mutajeniktir (Chojnacka, 2010). Cr(VI), çözeltilerde CrO_4^{2-} (kromat) veya $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ (dikromat) halinde bulunur ve sülfat (SO_4^{2-}) ile yapısal benzerliği nedeniyle, sülfat taşıma yollarından hızla hücresel geçirgenlik bariyerini aşabilir (Patra vd., 2010). Cr(VI), hızla Cr(V)'e indirgenir ve serbest radikaller üretilir. Serbest radikaller, oksidatif strese, DNA hasarına ve gen ekspresyonuna neden olarak mikroorganizmalar da dahil olmak üzere tüm yaşam sistemleri için toksiktir (Mabbett ve Macaskie, 2001; Wise vd., 2004).

Cr(III) zararsız ve suda çözünmeyen, ancak insan vücudu için gerekli olan bir elementtir. Cr(III)'ün, insülinin hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanmasını kolaylaştırarak kan şekeri düzeyinin korunmasında önemli rolü vardır (Karthik vd., 2017). Ayrıca Cr(III)'ün vücut yağ, kolesterol ve trigliserit seviyelerini düşürmede ve kas kütlelerinde artışta olumlu etkisi

vardır (Jobby vd., 2018). Cr'nin diğer formlarına insan vücudunun ihtiyacı yoktur. Havaya Cr partikülleri karıştığında 10 gün kalabilir. Toprak partiküllerine sıkıca yapışırken, suda ise dibe çöker ve topraktan düşük konsantrasyonlarda sulara karışabilir. Havadan solunarak, suyla ve besinlerle vücuda alınabilir (Jobby vd., 2018). Yüksek konsantrasyonlarda Cr'ye maruz kalındığında; göz ve cilt tahrişi, şiddetli ishal, cilt ve solunum yollarının korozyonu, böbrek fonksiyon bozukluğu ve insanlarda akciğer, karaciğer gibi birçok sağlık sorununa neden olabilir. Cr, USEPA tarafından A sınıfı insan kanserojeni olarak belirlenmiştir (Thacker vd., 2006). USEPA'ya göre, Cr(VI)'nın yüzey suyuna deşarjı için izin verilen limit 0,5 mg/L iken Cr(III), Cr(VI) ve diğer formlarını içeren toplam Cr'nin limit değeri 2 mg/L'den daha az olarak belirlenmiştir (Chang vd., 2019). Ayrıca WHO ve Avrupa standartları içme suyunda izin verilen toplam Cr limit değerini 0,05 mg/L olarak belirlemiştir. Toksik Maddeler ve Hastalıklar Dairesi Başkanlığı, ABD İnsan Sağlığı Hizmetleri Dairesi Cr(VI)'yı 17. sırada toksik madde olarak sınıflandırmıştır (Kumar ve Dwivedi, 2019). Ülkemizde SKKY'ye göre, Cr(VI) limit değerleri birinci kalite su için ölçülemeyecek kadar az, 2. kalite suda 20 µg/L ve 3. kalite suda ise 50 µg/L Cr (VI) olarak belirlenmiştir (SKKY, 2004). İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik'te (2013) içme suyunda bulunan Cr limit değeri 50 µg/L olarak belirlenmiştir (Sağlık Bakanlığı, 2013). TSE 266 içme suyunda bulunabilecek Cr sınır değeri 0,05 mg/L'dir (TSE, 2005).

1.3.2.Kurşun

Atomik ağırlığı 207,19 g/mol, atom numarası 82, yoğunluğu 11,34 g/cm³ olan Pb'nin erime noktası ise 327,5 °C'dir. Periyodik cetvelde "Pb" sembolü ile gösterilen elementtir. Pb'nin kütle numaraları 208, 206, 207 ve 204 olan 4 farklı izotopu vardır. Düşük erime sıcaklığı ve iletkenliğe sahip olan Pb kolaylıkla şekil verilebilen toksik bir elementtir ve mavimsi renkte olup, hava ile temas ettikten sonra gümüş/mat gri renge dönüşür (Özbolat ve Tuli, 2016).



Şekil 1.2. Kurşun

Pb; madencilik, metal ve metal arıtma endüstrileri, otomobil aküleri, tıbbi ekipmanlar, kurşunlu boyalar, kurşun-asit pilleri, saç boyalarının imalatında, seramik endüstrisi, kaplama, bilimsel ve optik aletler, cepheleler, katı atık yapımı, kurşunlu benzin, arıtma çamuru, enerji santrali ve atık yakma tesislerinden kaynaklanan atıklarda yüksek konsantrasyonlarda bulunan tehlikeli ağır metallerden biridir (Dauvin, 2008). Pb, hücre zarlarına zarar verebilecek enzim ve proteini temel metal iyonları ile değiştirebilen ve DNA'nın yapısını tahrip edebilen bakterilerden insanlara kadar tüm canlılar için oldukça toksik bir metaldir (Olaniran vd., 2013). Pb'nin fazlası insan vücudunda birikebilir ve anemi, infertilite, hipertansiyon, hafıza kaybı, düşük, böbrek bozuklukları ve zihinsel geriliğe neden olabilir (Ren vd., 2015). Bu nedenle Pb, USEPA tarafından tehlikeli inorganik atık listesine eklenmiştir ve USEPA tarafından içme suyundaki Pb limit değeri 0,015 mg/L (15 µg/L) olarak belirlenmiştir (Rosen vd., 2017). WHO'ya göre, içme suyunda izin verilen güvenli Pb seviyesi 10 µg/L (0,01 mg/l) olarak belirlenmiştir (Watt vd., 2000). TSE 266'ya göre içme suyunda 0,01 mg/L'yi aşmaması gereklidir (TSE, 2005).

1.4. Atıksulardan Ağır Metallerin Giderimi

Ağır metaller, organizmalarda toksik, kanserojen ve biyolojik olarak biriken özellikte olmaları nedeniyle bitki, hayvan ve insan hayatını tehdit etmektedirler. Bu nedenle ağır metal içeren evsel ve endüstriyel atıksular deşarj edilmeden önce arıtılmalıdır (Fu ve Wang, 2011; Hamutoğlu vd., 2012). Nihai deşarjdan önce ağır metallerle kirlenmiş atıksuların arıtılması için çeşitli atıksu arıtma teknolojileri mevcuttur (Janyasuthiwong vd., 2017). Kimyasal çöktürme, buharlaşma ile geri kazanım, oksidasyon/redüksiyon filtrasyon, iyon değişimi, membran teknolojileri ve elektrokimyasal arıtma teknolojileri

yaygın olarak kullanılmaktadır (Fu ve Wang, 2011). Bu geleneksel arıtma yöntemlerinin arıtma süreçlerinin zorluklar içermesi, zararlı yan ürün oluşumu ve aktif çamurda yüksek oranda toksik bileşiklerin oluşumu da metallerin arıtımını zorlaştırmaktadır. Buna ilaveten, susuzlaştırılması ve bertarafı zor olan toksik çamurların üretilmesi gibi çeşitli sorunlara yol açmaktadır. Ayrıca bu yöntemlerin çoğu, sadece yüksek veya orta metal konsantrasyonlarında ekonomik olarak uygulanabilirken düşük konsantrasyonlardaki metal kirliliğinde (1-100 mg/L) kullanılmamaktadır. Geleneksel arıtma yöntemlerinin yüksek oranda kimyasal madde ve enerji ihtiyaçlarının olması da önemli dezavantajlarından biridir (Martín-Lara vd., 2013). Tablo 1.7’de ağır metallerin gideriminde yaygın olarak kullanılan yöntemlerin avantaj ve dezavantajları verilmiştir (Hamutoğlu vd., 2012 ; Volesky, 2001).

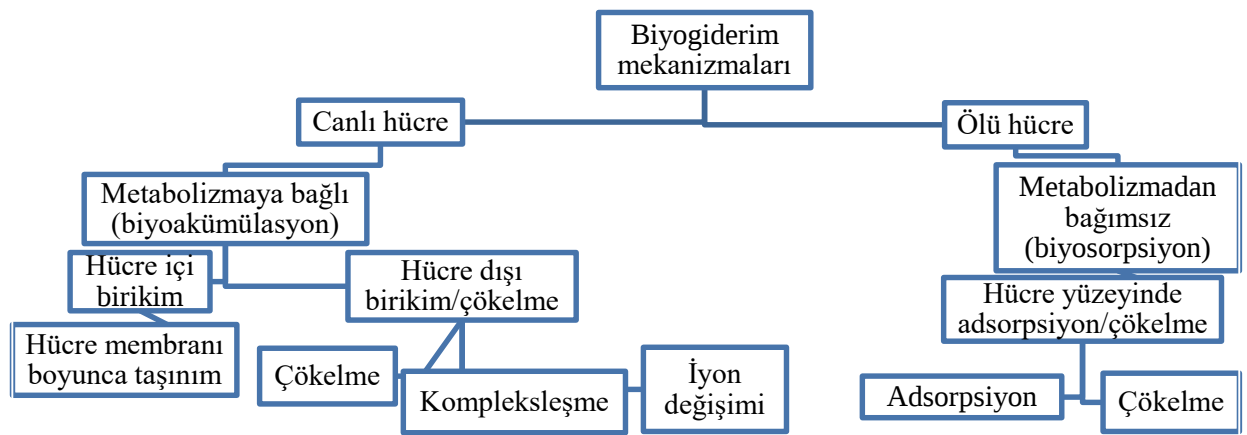
Tablo 1.7. Ağır metal giderim yöntemleri, avantaj ve dezavantajları

Yöntem	Avantaj	Dezavantaj
Kimyasal çöktürme ve filtrasyon	✓ Basit ve Ucuz	✓ Yüksek konsantrasyonlarda zor giderim ✓ Etkin değil ✓ Aktif çamur oluşumu
Elektrokimyasal yöntemler	✓ Metal geri kazanımı	✓ Pahalı olması ✓ Sadece yüksek konsantrasyonlarda etkin olması
Kimyasal oksidasyon ve indirgenme	✓ İnaktivasyon	✓ Ortam hassasiyeti
İyon değişimi	✓ Etkin arıtım ve saf atık ✓ Metal geri kazanımı	✓ Partiküllere hassas ve reçinelerin pahalı olması
Buharlaştırma	✓ Saf atık elde etme	✓ Fazla enerji gereksinimi ✓ Pahalı olması ✓ Atık çamur oluşumu
Ters ozmos	✓ Geri dönüşüm için saf atık eldesi	✓ Yüksek basınç ✓ Membran boyutu ✓ Pahalı olması
Adsorpsiyon	✓ Sorbentlerin Aktif karbon kullanımı	✓ Tüm metaller için uygun olmaması

Metallerin biyolojik yöntemlerle uzaklaştırılması ve geri kazanımı, kullanılan geleneksel fiziksel-kimyasal arıtım yöntemlerine kıyasla ekonomik ve pratik olması, arıtma veriminin yüksek olması, çevre dostu olması nedeniyle tercih edilmektedir ve biyoteknolojik yaklaşım olarak önemi gün geçtikçe artmaktadır (Kalita ve Joshi, 2017).

1.4.1. Biyolojik Arıtma Yöntemleri

Canlı veya cansız mikroorganizmalara veya bitkilere dayanan biyolojik arıtma, toksik metallerin seviyelerini uygun maliyetli ve çevre dostu bir şekilde çevresel olarak kabul edilebilir sınırlara indirmeyi sağlar (Volesky, 2001). Biyolojik arıtmada, mikroorganizmalar tarafından ağır metallerin adsorbe edilmesi, metallerin hücre içinde biyobirikimi, hücre yüzeyine tutunması (biyosorpsiyon, adsorpsiyon) ve metallerin mikroorganizma tarafından salgılanan biyolojik ajanlarla giderimi veya geri kazanılmaları sağlanır (Gadd, 1990; Öztürk, 2008; Srinath vd., 2002). Mikroorganizmalarla ağır metal giderimi metabolizmadan bağımsız olarak ve/veya metabolizmaya bağlı olarak gerçekleşmektedir (Şekil 1.3) (Yalçın, 2016).



Şekil 1.3. Biyogiderim mekanizmaları (Yalçın, 2016)

Biyokütlenin bulunduğu bir sulu ortamda çözünebilen kimyasallar varsa, adsorbatlar (kirleticiler) biyolojik maddelerle biyosorpsiyon adı verilen süreçte hücresel yüzeylere bağlanır veya biyoakümülyasyon yoluyla hücrelerin içinde biriktirilir (Chojnacka, 2010; Kaduková ve Virčíková, 2005). Biyosorpsiyon ve biyoakümülyasyon, doğadaki madde döngüsüne katılır. Canlı organizmalar kimyasal maddeleri biyolojik olarak biriktirebildiği için kirleticiler de toksik maddelere dönüşür. Bu süreç kalıcı olarak

gerçekleşir ve neredeyse tüm biyokütle türleri tarafından gerçekleştirilir. Doğal ortamda gerçekleşen bu süreç insan kontrollü çalışma koşulları altında endüstriyel uygulamaları da yapılabilmektedir. Biyosorpsiyon ve biyoakümülyasyon, hemen hemen tüm biyolojik atıksu arıtma süreçlerinde ve tüm biyoremediasyon teknolojilerinde kendiliğinden meydana gelen bir prosestir (Rehman vd., 2006).

1.4.1.1. Biyosorpsiyon

Mikroorganizmalar tarafından ağır metallerin biyosorpsiyonu ve biyoakümülyasyonu suların ağır metallerin giderimi için kullanılan önemli proseslerdir. Biyosorpsiyon, metabolizmadan bağımsız olarak gerçekleşen fizikokimyasal bir olay olup bir ağır metal alım sürecidir. Esas olarak hücre membranında bulunan polisakkaritlerin, proteinlerin ve lipidlerin sahip olduğu fonksiyonel gruplar tarafından gerçekleşmektedir (Srinath vd., 2002). Bu fonksiyonel gruplar amino, karboksilik, sülfat, sülfidril, fosfat ve tiyol grupları olup metalleri bağlamada farklı affinite ve özgülüğe sahiptirler (Holan vd., 1993; Ting vd., 1991). Metaller, hücre yüzeyinde fiziksel adsorpsiyon veya iyon değişimi ile biriktirilmektedir (Zabochnicka-Swiatek ve Krzywonos, 2014). Biyosorpsiyon, canlı hücreler ve ölü biyoküteller kullanılarak ağır metalin metabolizmadan bağımsız olarak uzaklaştırılması işlemidir ve metallerin hücre yüzeyine pasif olarak bağlanmasıdır (Srinath vd., 2002). Biyosorpsiyon ile metallerin gideriminde, mikroorganizmaların hücre duvarı (yüzeyi) negatif yüklü olduğu için pozitif yüklü metal iyonlarını (Cu^{+2} , Pb^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} , Cd^{+2} , Ni^{+2} , Hg^{+2} , Cr^{+3} , Cr^{+6} , Fe^{+2} , Fe^{+3} vb.) bağlar. Bu proses; pH, sıcaklık, iyonik güç, absorbent miktarı ve boyutuna bağlı olarak değişmektedir (Timkova vd., 2018). Metallerin metabolizmadan bağımsız alımı (pasif) daha hızlı olup, daha az enerjiye ihtiyaç duyulmaktadır. Biyosorpsiyon prosesinde harcanan enerji (21 kJ/mol), biyobirikim (biyoakümülyasyon) için harcanan enerjiden (63 kJ/mol) daha düşüktür (Kadukova ve Vircikova, 2005). Ayrıca, biyosorpsiyonda ölü ve tutuklanmış hücreler kullanılabilir (Öztürk, 2008). Biyosorpsiyon prosesinin avantajları, biyokütlenin tekrar kullanılabilirliği, toksisite ne olursa olsun metallerin atıksudan uzaklaştırılması (çok düşük dozdaki kirleticilerde bile etkilidir), dengeye ulaşılana kadar kısa çalışma süreleri (90 dakika) ve toksik olabilecek ikincil kirleticilerin üretilmemesidir. Bu avantajları biyosorpsiyonun kullanımını yaygınlaştırmaktadır (Kadukova ve Vircikova, 2005).

1.4.1.2.Biyoakümülyasyon (Biyobirikim)

Biyoakümülyasyon, ağır metallerin alımı için hücresele enerjiyi kullanan metabolizmaya bağılı olarak gerçekleşen bir süreçtir (Fernandez vd., 2018). Biyoakümülyasyonda, mikroorganizma metalleri seçerek kontrollü bir şekilde bünyesine almaktadır. Birden fazla metale maruz kaldıklarında mikroorganizmalar metabolize edebileceğı metalleri tercih etmektedir. Mikrobiyal biyobirikimde ilk aşamada, fiziksel adsorpsiyon yani biyosorpsiyon gerçekleşir. Daha sonra, metal iyonları hücre zarından sitoplazma içerisine taşınır (Gadd, 1990; Han vd., 1992). Biyoakümülyasyon, mikrobiyal iç yapıya, biyokimyasal özelliklere, genetik ve fizyolojik yeteneklere ve çevresel koşullara bağılı olduğı için ağır metal alımı biyosorpsiyona göre daha uzun zaman almaktadır (Vijayaraghavan ve Yun, 2008). Metalin hücre peptidoglikan tabakasına bağlandığında biyoakümülyasyon sürecinin yük değışiklikleri gibi hücre yüzey özelliklerinin de etkilendiğı bildirilmiştir. Buna ek olarak biyoakümülyasyon prosesini sıcaklık da etkilemektedir. Yüksek ve düşük sıcaklıklar bakterilerin metabolik aktivitelerini yok edebilir (Javanbakht vd., 2014). Bu mekanizmada, hücre içi sekresyon, spesifik organeller içinde lokalizasyon gibi canlılık özellikleri, MT bağlanması, partikül metal birikimi, hücre dışı çökelme ve kompleks oluşumu meydana gelebilir (Gadd, 1990). Bu konuda yapılmış olan birçok çalışmada, bakteri, mantar, yosun ve diğere bitki kaynaklı biyoküteller kullanılarak sulu çözeltilerden metallerin hücrelere aktif olarak bağlandığı tespit edilmiştir (Gavrilescu, 2004; Cheung ve Gu, 2007; Wang ve Chen, 2009; Chojnacka, 2010). Biyoakümülyasyonda en önemli problemlerden biri yüksek metal konsantrasyonlarında hücrelerin inhibisyonudur. Bazı mikroorganizmaların metal birikim mekanizmalarının anlaşılması, kontamine çözeltilerin konsantrasyonu, arıtım ve geri kazanım süreçlerinin geliştirilmesinde belirleyicidir. Biyosorpsiyon ve biyoakümülyasyon prosesleri birbirinden farklıdır. Prosesler arasındaki farklılıklar detaylı bir şekilde Tablo 1.8’de verilmiştir (Chojnacka, 2010).

Tablo 1.8. Biyosorpsiyon ve biyoakümülyasyon prosesleri arasındaki farklar (Chojnacka, 2010)

Biyosorpsiyon	Biyoakümülyasyon
Pasif süreç	Aktif süreç
Ölü Biyokütle	Canlı Biyokütle
Metaller hücre yüzeyine bağlanır.	Metaller hücresel yüzeyine hücre içine bağlanır.
Adsorpsiyon	Absorpsiyon
Tersinir proses	Kısmen tersinir proses
Besin maddeleri gerekli değildir.	Besin maddeleri gereklidir.
Tek aşamalı süreç	Çift aşamalı süreç
Hızlı gerçekleşir.	Yavaş gerçekleşir.
Metabolizma tarafından kontrol edilmez.	Metabolizma tarafından kontrol edilir.
Toksik etkisi yoktur.	Kirleticiler toksik etkiye neden olabilir.
Hücrel büyüme yok.	Hücrel büyüme var.
Metal iyonlarının ara denge konsantrasyonuna ulaşır.	Çok düşük denge konsantrasyonuna ulaşılır.

1.5. Biyosorpsiyon ve Biyoakümülyasyon Proseslerinin Ağır Metal Giderimindeki Önemi

Biyosorpsiyon ve biyoakümülyasyon, atıksulardan ağır metal gideriminde yaygın olarak kullanılan biyolojik proseslerdir. Bu yöntemlerin düşük işletme maliyeti, bertaraf edilecek kimyasal ve/veya biyolojik çamur hacminin en aza indirilmesi ve düşük konsantrasyonlardaki atıkların detoksifikasyonunda yüksek verimli olmaları gibi önemli avantajları vardır. Giderme işlemi hızlıdır, sadece birkaç dakika sürer, normal basınç ve sıcaklık altında gerçekleşmektedir. Bununla birlikte, biyosorpsiyon/biyoakümülyasyon bazı prosesler kullanan sınırlı sayıda arıtma tesisi bulunmaktadır (Kadukova ve Vircikova, 2005). Bu prosesler ile doğal su kaynaklarından veya atıksulardan metallerin gideriminde etkili mikroorganizmalar kullanılmalıdır. Ancak biyoremediasyonda kullanılacak mikroorganizmalar, maruz kalacakları metalin toksik etkilerine karşı dayanıklı olmalıdır, aksi takdirde metal mikroorganizmaları öldürür ve arıtım işlemi

yapılamaz (Ergül Ülger, 2016). Bu zararlı etkiyi ortadan kaldırmak için mikroorganizmalar, hücresel morfolojik değişiklikler, enzimlerin salgılanması gibi kendini koruma mekanizmaları geliştirirler (Jacob vd., 2018). Toksik bileşiklerle kontamine olmuş ortamlarda, mikroorganizmalar sadece bu tür bileşiklere dayanmakla kalmaz, aynı zamanda bunları kendi yararları için iyileştirme yolları da geliştirirler (Guo vd., 2010). Bakteriler, sentezledikleri proteinler ve genetik yapıları sayesinde metallere karşı direnç gösterirler (Guo vd., 2010). Bakteriler Cd, Cr, Cu, Pb, Hg ve Ni gibi toksik metallere karşı metal dirençli genler eksprese ederek hayatta kalırlar. Mikroorganizmaların metaller ile karşılaştıklarında kendilerini korumak için geliştirdiği beş ana mekanizma vardır. Bu mekanizmalar aşağıda sıralanmıştır (Ianieva, 2009).

1) Metallerin hücre içine alınmasının engellenmesi: Hücre duvarı, plazma zarı veya kapsül metal iyonlarının hücreye girmesini engelleyebilir. Farklı taksonomik gruplara ait bakteriler, metal iyonlarını hücre duvarının veya kapsülün iyonlaştırılabilir grupları (karboksil, amino, fosfat ve hidroksil grupları) ile adsorbe edebilir (El-Helow vd., 2000). Ölü bakteri hücreleri de metal iyonlarını bağlayabilir, bu adsorpsiyon pasif bir süreçtir. Termal işlemle öldürülen bakteri hücrelerinin, canlı hücrelerle aynı veya daha yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahip oldukları tespit edilmiştir (Fabre vd., 2003). Bu konuda yapılan çalışmalarda; *Pseudomonas putida* (Pardo vd., 2003), *Brevibacterium sp.* (Taniguchi vd., 2000) ve *Bacillus sp.* (Green-Ruiz, 2006) suşlarının canlı olmayan hücreleri için yüksek düzeyde ağır metal iyonlarının pasif emilimi gözlenmiştir. Ağır metal iyonları, ağırlıklı olarak karboksil ve polisakkarit grupları ile bakteriyel kapsüller tarafından adsorbe edilebilir. *Enterobacter chloaceae* (Iyer vd., 2005), *Marinobacter sp.* (Bhaskar ve Bhosle, 2006), ve *Acinetobacter sp.*'nin metal iyonları biriktirdiği gösterilmiştir (Ianieva, 2009). Bu mekanizmaya başka bir örnek ise, *E. coli*'de membranda bulunan porin proteininde yapılan değişiklik ile metal iyonlarının hücre dışında tutulmasıdır (Rouch vd., 1995). Bu sistem genelde tek bir genin mutasyonu ile meydana gelir ve membranın metal iyonlarına karşı geçirgenliğini azaltır (Ji ve Silver, 1995).

2) Metallerin mikroorganizmadan aktif olarak uzaklaştırılması: Metaller aktif taşıma yoluyla hücre dışına pompalanırlar. Bu mekanizma plazmit veya

kromozom tarafından kodlanabilir (Ergül Ülger, 2016 ; Ianieva, 2009). Bazı metal iyonları hücreye temel elementlerin alınmasından sorumlu sistemler aracılığıyla girebilir. Örneğin, kromat hücrenin içine sülfat taşıma sistemi (Cervantes ve Gutierrez-Corona, 1994) aracılığıyla taşınırken Cd, Zn, Co, Ni ve mangan (Mn) metal iyonları hücrelere magnezyum (Mg) sistemi aracılığıyla girer (Nies ve Silver, 1989). ATP hidrolizi ve elektrokimyasal gradyan enerjisi metal iyonlarının hücre dışında tutulmasını sağlar (Ianieva, 2009). Elektrokimyasal gradyan enerjisini kullanarak en iyi çalışan akış sistemini, çoklu metal dirençli bakteri olan *Ralstonia metallidurans* CH34 suşunda Cu, Co ve Zn metal iyonlarına toleransından sorumlu olan Czc operonu kodlar (Nies, 2000).

- 3) **Metallerin proteinlere bağlanması ile hücre içinde birikmesi:** Bu mekanizma ile ağır metallerin hücre içinde, hücre metabolizmasına etki edemeyecekleri bir yerde (örneğin vakuollerde) birikmesi sağlanarak hücrel organellerle etkileşimleri önlenir (Ergül Ülger, 2016).
- 4) **Metallerin hücre dışında tutulması:** Metal iyonlarının periplazmada veya dış zardaki hücrel bileşenler tarafından birikmesi veya çözünmeyen bileşikler olarak metal iyonlarının kompleksleştirilmesi ile metal iyonları hücre dışında tutulur. Bu mekanizmaya örnek olarak, Cu dirençli *Pseudomonas syringae* suşları, Cu iyonlarını ve bakteri kolonilerini bağlayan CopA, CopB ve CopC (dış membran proteini) proteinlerini sentezler ve metal birikimi sonucunda mavi renge dönüşür (Cha ve Cooksey, 1991). Başka bir çalışmada ise, *Saccharomyces cerevisiae*'nin büyük miktarda glutatyon salgılayarak Ni adsorbsiyonunu azaltabildiği tespit edilmiştir. Mayanın taşıdığı metilglioksal geni metallerin yoğun olduğu bölgelerde ekstrasellüler glutatyon maddesi oluşturur. Bu komplekslere toksik metaller bağlanır ve hücreye girmesi engellenir (Ergül Ülger, 2016).
- 5) **Enzimlerle metallerin daha az toksik forma dönüştürülmesi:** Bu mekanizma, hücre içinde ve enzimatik yollarla gerçekleşmektedir. Bazı bakteriler, enerji üretimi için elektron vericileri veya alıcıları olarak, metalleri ve metalloidleri kullanabilirler. Oksitlenmiş formdaki metaller, bakterilerin

anaerobik solunumu sırasında elektronların terminal alıcıları olarak işlev görebilir. Metal iyonlarının enzimatik olarak indirgenmesi, daha az toksik Hg (Barkay vd., 2003) ve Cr formlarının oluşmasına da neden olmaktadır (Viti vd., 2003). Enzimatik indirgeme ile en iyi çalışılan metal detoksifikasyon sistemi, mer-operonu tarafından gerçekleştirilir. İki değerlikli Hg metal iyonları, MerT transport proteini ile hücreye aktarılır ve MerA hücre içi redüktaz ile elementer Hg⁰'a indirgenir (Brown vd., 2002).

Mikrobiyal izolatlar böylesine olağanüstü doğal özellikleri sayesinde, zararlı kirlenici maddelerin azaltılması ve/veya bozunması ve kontamine atmosferin temizlenmesi için başarıyla kullanılmaktadır (Jacob vd., 2018). Son yıllarda, ağır metallerin giderilmesinde genetik olarak tasarlanmış bakterilerin güçlü adaptasyon ve yüksek arıtma verimliliği özelliklerine sahip olmaları nedeniyle birçok araştırmada bu konuya odaklanılmıştır. Cu, Co, Cr, Ni, Mo, Fe, Zn ve Mn gibi ağır metaller, belirli bir konsantrasyonu aştıklarında metabolik fonksiyonları, transkripsiyon sürecini veya genetik materyallere zarar vererek her türlü mikroorganizma üzerinde çeşitli biyokimyasal, fizyolojik veya genotoksik etkilere neden olabilir (Emamverdian vd., 2015; Rasheed vd., 2019). Bununla birlikte, bazı mikroorganizmalar biyolojik detoksifikasyon yoluyla ağır metal toksisitesine karşı direnç geliştirebilir. Direnç mekanizması temel olarak iki şekildedir: MT gibi metal iyonları için yüksek bağlama kapasitesine sahip bir kompleks ya da bazı spesifik metal iyonu taşıma sistemleri, ağır metallerin alımını azaltmak için ağır metal iyonlarını hücre dışına taşır (Rasheed vd., 2019). Birçok çalışmada, MT geni eksprese edilmiş *E. coli* hücrelerinin, Cd (Deng vd., 2007; Kim vd., 2005), As (Singh vd., 2008) ve Cu (Sekhar vd., 2011) gibi metal biyoakümüülasyonunu arttırdığı tespit edilmiştir.

1.6. Rekombinant DNA teknolojisi

Rekombinant DNA'nın üretilmesi ve hücre içinde replikasyonunu gösteren ilk yayın, 1972 ve 1973 yıllarında Kethleen Danna ve Daniel Nathans tarafından yapılmıştır (Jackson vd., 1972; Katartaş, 2011). 1972 yılında Paul Berg yapmış olduğu çalışmada, rekombinant DNA teknolojisi ile genetiği değiştirilmiş (GD) ilk DNA molekülünü oluşturmuştur. 1973 yılında *E. coli* bakterisine *Salmonella* genleri aktararak daha önce bakteride olmayan yeni özellikler geliştirmesi sağlanmıştır. Bu bakteri, genetiği değiştirilmiş ilk organizma (GDO) olarak kabul edilmektedir (Yaşar vd., 2017).

Rekombinant DNA teknolojisi (genetik mühendisliği), bir organizmadan herhangi bir yolla izole edilen bir genin (DNA parçasının) uygun bir konağın içerisine sokularak orada çoğaltmasını ve bazen de ifade edilmesini amaçlayan çalışmalara ait tekniklerin tümüne denir. Bu teknoloji, en geniş anlamda belli bir amaca yönelik olarak doğrudan genetik materyal üzerinde yapılan çalışmaları kapsar (Elçin, 2021).

Gen Klonlaması,

- Bir organizmadan elde edilen ve içinde istenilen geni taşıyan DNA parçalarının, taşıyıcı özellikte bir DNA molekülüne (vektör) bağlanarak rekombinant DNA oluşturulur.
- Rekombinant DNA moleküllerinin uygun bir konak hücreye sokularak orada çoğaltılması ve hepsi birbirinin aynı olan bir DNA popülasyonunun elde edilir.
- Konak hücreler çoğaldıkça rekombinant DNA molekülleri nesillere aktarılarak yeni hücrelerdeki kopya sayılarının arttırılır.
- Çok sayıda hücre bölünmesiyle oluşan bir klonda (rekombinant DNA teknolojisi ile sentezlenen belirli DNA/gen kopyaları) hücrelerin her birinde istenilen geni taşıyan rekombinant DNA moleküllerinin bir ya da daha fazla sayıda kopyası bulunur (Elçin, 2021).

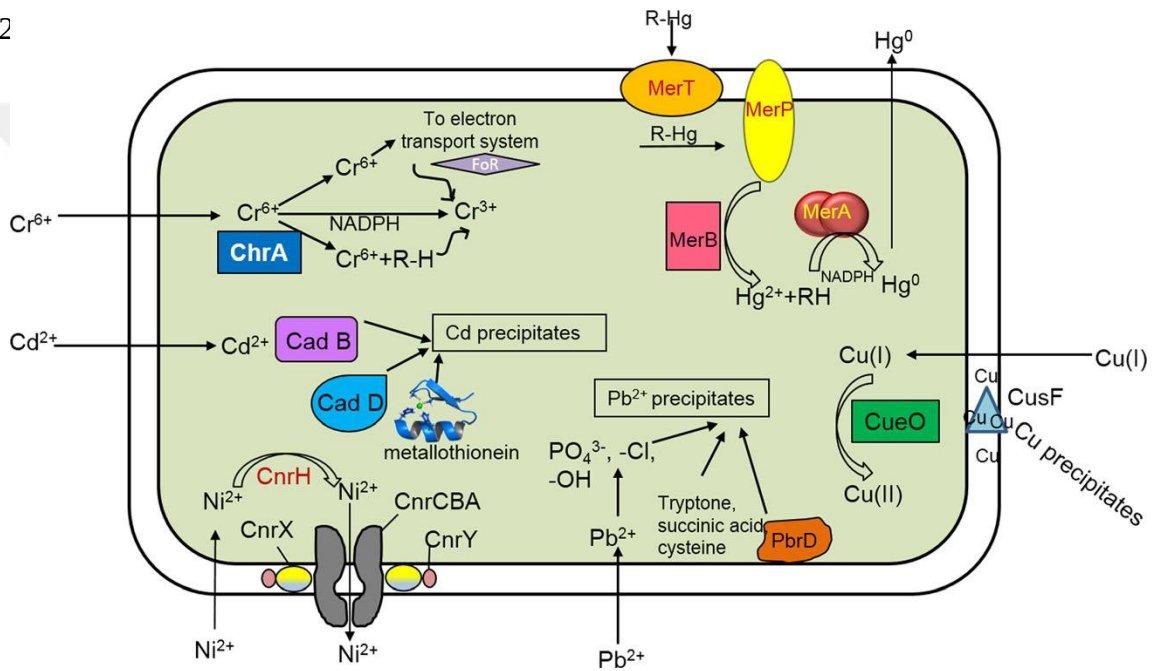
Rekombinant DNA teknolojisi aşı üretimi, gıda endüstrisinde, endüstriyel enzim üretiminde ve biyoremediasyon uygulamalarında kullanılmaktadır. Alt başlıkta genetiği değiştirilmiş bakterilerin biyoremediasyonda kullanımı ile ilgili detaylı bilgi verilmiştir.

1.7. Genetiği Değiştirilmiş Bakterilerin Biyoremediasyondaki Önemi

Çevresel sorunlara yol açan kirleticilerin artışı, küresel anlamda önemli bir çevre sorunudur. Çevreyi ve insanları ağır metal kirliliğinden korumak için konvansiyonel arıtma yöntemlerinden farklı olarak, yeni arıtma teknolojilerinin tasarlanması gerekliliği ve önemi gün geçtikçe artmaktadır. Toksik atıkların giderilmesi veya azaltılması için mikrobiyal sistemlerden yararlanan düşük maliyetli ve çevre dostu biyoremediasyon prosesi bu yöntemlerden biridir (Kalita ve Joshi, 2017; Verma ve Kuila, 2019). Bu teknoloji, mikroorganizmaların doğasına bağlı olarak gerçekleşen multidisipliner bir

yaklaşım gerektirmektedir (Singh vd., 2011). Ağır metaller gibi kirleticilerin birçoğu, doğal yollarla yeterli bir şekilde parçalanamadığı için çevrede yüksek kalıcılığa sahiptir (Das vd., 2016). Birçok organik kirletici biyolojik yollarla ayrıştırılırken, inorganik toksik metaller çeşitli enzimler tarafından dönüştürülür. Bakteriler, savunma mekanizmalarının bir parçası olarak toksik metallere karşı direnç geliştirmektedir. Çevrede toksik metallerin varlığına yanıt olarak dirençli bakteriler tarafından metallerin toksik formunu yok etmek veya azaltmak için birçok hücre içi ve hücre dışı enzim sentezlenmektedir. Şekil 1.4'te bakterilerin toksik metallere karşı genetik direnç mekanizmaları gösterilmiştir (Das vd.,

2



Şekil 1.4. Bakteriler tarafından toksik metallere karşı genetik direnç mekanizmasının genelleştirilmiş bir gösterimi (Das vd., 2016)

Metallerin hücreye alınmasında, birçok mikroorganizmanın metal bağlayıcı proteinler sentezledikleri rapor edilmiştir (Verma ve Kuila, 2019). Bu sentezin, ağır metallerin detoksifikasyon mekanizması gereği yapıldığı saptanmıştır. Metallerin her iki tip alımında (hücre içi ve hücre dışı birikim) bu özgül düşük moleküler ağırlıklı proteinlerin önemi büyüktür (Gadd, 1990; Han vd., 1992). Yapılan çalışmalarda çeşitli bakterilerin (*Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas putida*, *Mycobacterium marinum*, *E. coli*, *Sphingomonas desiccabilis*, *Bacillus idriensis* vb.) kontamine ortamda toksik metal bileşiklerinin biyolojik olarak giderilmesini sağlayan önemli genlere sahip olduğu bildirilmiştir (Ackerley vd., 2004; Valls vd., 2000). Biyoremediasyonda, bu dirençli

genler sayesinde mikroorganizmalar çok toksik ortamlarda dahi hayatta kalırlar (Ianieva, 2009). Ancak bakterilerin metallere karşı olan doğal direnç mekanizmaları kontamine ortamlardaki kirliliğin giderimi için tek başına yeterli değildir. Bu nedenle bakterilerin metal alım kapasitelerinin artırılması gereklidir. Biyoremediasyon prosesi, moleküler biyoteknoloji kullanılarak belirli metaller için daha yüksek biyosorpsiyon kapasiteleri ve seçiciliği olan tasarlanmış organizmalar oluşturmak için imkân sağlamaktadır (Wang ve Chen, 2009). Genetiği değiştirilmiş mikroorganizmaların (GDM) ağır metallerin biyoremediasyonunda kullanımı, fiziko-kimyasal yöntemlere kıyasla çevre dostu olması, yan ürün oluşturmaması, yüksek metal bağlama kapasiteleri vb. özellikleri nedeniyle ön plana çıkmaktadır (Singh vd., 2011). Bununla birlikte, GDM dayanan biyolojik giderim, yeni bir teknolojidir ve toksik metal kontaminasyonlarını gidermenin çevre dostu ve etkili bir yolu olarak dikkat çekmektedir (Liu vd., 2011; Mejare ve Bülow, 2001). Genetik modifikasyon (dönüşüm) bakterilerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bakteriler arasında genetik dönüşüm; transdüksiyon ve konjugasyon yoluyla doğal olarak gerçekleşmektedir. Bu doğal araçların yanı sıra, modern genetik mühendisliği ve rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak, metaller gibi doğada kirlilik oluşturan maddelerin giderilmesi için doğada bulunmayan genlerin yapay bir kombinasyonunu oluşturma fırsatı sunmaktadır. Bu genler sayesinde metallere karşı yüksek affinite ve seçiciliğe sahip mikroorganizmalar tasarlanabilmektedir (Das vd., 2016; Gupta ve Singh, 2017).

Son zamanlarda, genetik mühendisliği stratejilerini kullanarak kirleticilerin giderim oranlarını arttırmak için bir dizi imkân ortaya çıkmıştır. Örneğin, bilinen metabolik yolaklardaki hız sınırlayıcı basamakların bozunma oranlarını artırmak için bu yolaklar genetik olarak manipüle edilebilir veya inatçı bileşiklerin degradasyonunda etkili olan tamamen yeni metabolik yollar bakteri suşlarına dahil edilebilmektedir. Genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalarda (GDM), gerçekleştirilecek dört strateji vardır. Bunlardan ilki, enzim özgüllüğünün ve afinitesinin değiştirilmesidir. Metabolik yolağın her aşamasına spesifik genlerin transkripsiyonu ve translasyonu ile üretilen enzimler aracılık etmektedir. GDM'ler, enzimatik aktivitelerini ve enzim substrat özelliklerini değiştiren hibrit gen kümeleri tarafından geliştirilmiştir. Bu gen kümeleri, gelişmiş dönüştürme kabiliyetine sahip enzimi kodlamaktadır. Bir çalışmada *E. coli* suşu, trikloretilenin (TCE) degradasyonu için bir hibrid gen kümesini ifade etmek üzere genetik olarak modifiye edilmesi bu yaklaşıma örnek verilebilir. İkinci yaklaşımda ise yolakların

oluşturulması ve düzenlenmesidir. GDM'ler, mevcut katabolik yolları geliştirilerek veya bu yolları yabancı suş kullanılarak indirgenmesi mümkün olmayan biraz daha fazla bileşiği bozacak şekilde geliştirilmiştir. Üçüncü yaklaşımda, biyoproses geliştirme, izleme ve kontrol, dördüncü yaklaşımda ise biyoduyarlılık ve biyosensör uygulamalarında kimyasal algılama, toksisite azaltma ve son nokta analizleri yer almaktadır. Ayrıca, GDM'ler sadece kirletici varlığından ziyade kirletici biyoyararlanımının izlenmesine izin veren kimyasal sensörlere sahiptir. Üstelik biyoluminesans üreten GDM'ler mikroorganizmaların kirlenmiş alanda ve biyoremediasyonun son noktasına kadar yayılımının anlaşılmasına yardımcı olmaktadır.

GDM'ler, yabancı tip mikroorganizmaların sınırlı kullanım alanlarını artırmaktadır. Mikroorganizmalar aerobik katabolik ve kometabolik yollarla sınırlıdır. Bu nedenle anaerobik ortama uygulanamazlar. Oksijenazlar için genler eklenerek geliştirilen GDM'lerin anaerobik ortam koşullarında kullanılmasını mümkün kılmaktadır. Biyoremediasyon için mikroorganizmaları uygulamadan önce çoklu kontamine alanlarda bulunan tüm ksenobiyotikler dikkate alınmalıdır. GDM'ler, genlerin tek bir mikroorganizmaya eklenmesi nedeniyle birçok mikroorganizmanın özelliklerine sahip olurlar. Bu nedenle, GDM'ler biyoremediasyon amacıyla başarıyla kullanılabilir (Kulshreshtha, 2013). Temel bakteri genleri tek bir kromozom üzerinde taşınır, ancak sıradışı substratların bazılarının katabolizması için gerekli enzimleri belirleyen genler plazmitler üzerinde taşınabilir. Katabolizmada plazmitlerin rolü vardır. Bu nedenle, genetiği değiştirilmiş bakteriler (GDB) kirleticilerin biyolojik bozunmasında etkin bir şekilde kullanılabilir ve gelecekte daha geniş kullanım alanlarının oluşmasına yol açabilir (Abatenh vd., 2017). GDB'lerdeki hassas proteinlerin, ağır metallerin yanı sıra diğer inatçı bileşiklerin detoksifikasyonuna katkıda bulunduğu bilinmektedir (Arshad vd., 2007). Moleküler biyolojinin bakterileri remediasyon işlemlerinde kullanmak için tasarlamada potansiyel bir uygulamaya sahip olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir. GDB, daha yüksek arıtım kapasitesine sahiptir ve belirli koşullar altında çeşitli kirleticilerin etkili bir şekilde giderildiği yapılmış olan çalışmalarda tespit edilmiştir (Barac vd., 2004).

Bakterilerin ağır metal biyosorpsiyon kapasitelerinin artırılması için, genetiği değiştirilmiş suşların üretilmesinde rekombinant DNA teknolojisi kullanılmaktadır. Bu stratejilerin çoğu, bakteri hücre duvarının metal iyonunu bağlayıcı polipeptitlerle

donatılması ile kirleticilerin rekombinant suşlara bağlanması esasına dayanmaktadır (Gupta ve Singh, 2017). Bakterilerin metal iyonlarını bağlama kapasitelerini artırmak için yaygın olarak kullanılan proteinler; metal bağlayıcı peptitler, metallotiyoninler (MT) veya poli-histidinlerdir (Ike vd., 2007). Bu peptitler genellikle hayvanlarda, bitkilerde, ökaryotik mikroorganizmalarda veya bazı prokaryotlarda bulunmaktadır (Vijver vd., 2004). Sisteince zengin, düşük moleküler ağırlıkta ve metal bağlama özelliğine sahip olan proteinlere metallotiyonin denir ve ağır metallerin detoksifikasyonunu sağlar. Böyle proteinler, çeşitli ökaryotik ve prokaryotik canlılardan izole edilebilmektedir (Gadd, 1990; Han vd., 1992). Spesifik bir metal bağlayıcı protein olan MT; Cd, Cu, Hg, Co, Zn gibi ağır metal iyonları dahil olmak üzere birçok element tarafından indüklenebilmektedir (Vijver vd., 2004). Örneğin, bir çalışmada ağır metallerin biyosorpsiyonun artırılmasında genetiği değiştirilmiş suşların üretiminde rekombinant DNA teknolojisinden faydalanılmıştır (Gupta ve Singh, 2017). Bir diğer çalışmada ise, biyosorpsiyon kapasitesini artırmak için bir füzyon proteini (IgA proteazının p-alanı) içeren plazmidin yabancı suşa transfer edilmesi sonucu rekombinant suş üretilmiş ve daha iyi sonuçlar elde edildiği belirlenmiştir (Valls vd., 2000). Brim ve arkadaşları (2000) yapmış oldukları çalışmada, *E. coli* BL308'den klonladıkları Hg(II) direnç genini (*merA*) eksprese eden *Deinococcus radiodurans* şusunu elde etmişlerdir. Çalışmada üretilen yeni suşların, radyoaktif atık sahalarında bulunanlardan çok daha yüksek konsantrasyonlarda hem radyasyon hem de iyonik Hg varlığında büyüdüğü ve Hg^{+2} 'yi daha az toksik uçucu elementer formu olan Hg^0 'ye etkili bir şekilde indirgediğini belirtmişlerdir. Kang ve ark (2007) tarafından yapılan bir çalışmada, *Schizosaccharomyces pombe* (SpPCS)'den PC sentaz geninin *E. coli*'de aşırı ekspresyonundan sonra PC sentezinin ve Cd birikiminin 7,5 kat arttığı tespit edilmiştir. Çalışmada, geri besleme inhibisyon (GshI) sentetazı ile birlikte ekspresyonu yapıldığında, PC üretiminde 10 kat ve Cd birikiminde ise sırasıyla, yaklaşık 10 kat ve 2 kat artış olduğu ileri sürülmüştür. Bir başka çalışmada, transkonjugant suş *Cupriavidus metallidurans* MSR33, ağır metal dirençli pMOL28 ve pMOL30 olmak üzere iki büyük plazmide sahip olan *Cupriavidus metallidurans* CH34 kullanılarak geliştirilmiştir. Her plazmid, Hg direncine sahip bir *merRTPADE* operonu ihtiva etmektedir. Transkonjügasyondan sonra kirli sudan Hg giderme kabiliyetine sahip güçlü spektrumlu Hg direncinin gelişmesine neden olduğu belirlenmiştir (Mergeay vd., 2003). Bir diğer çalışmada, *Rhodopseudomonas palustris* suşundan izole edilen S-adenosil metiyonin metiltransferaz geni (*arsM*) *E. coli* suşuna klonlandıktan sonra,

inorganik As'den uçucu trimetilsin metilat elde edilmiştir. *Sphingomonas desiccabilis* ve *Bacillus idriensis* ArsM geninin klonlanması ile yabancı suşlara kıyasla metillenmiş As gazının salınmasında 10 kat artışa yol açtığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, *Thermus thermophilus* HB8'in, toksik As formlarını toksik olmayan forma oksitleyebilen arsenit oksidaz üretimi ile ilişkili TTHB128 ve TTHB127 genlerine sahip olduğu bildirilmiştir (Yang 2010). Araştırmacılar, *Anabaena sp.*'ye LinA genini (*P. paucimobilis*'tan) ve *Nostoc Ellipsosporum'a* fcbABC (*Arthrobacter globiformis*'ten) genlerini aktararak GDB'ler geliştirmişlerdir. linA geni lindanın (γ -hexachlorocyclohexane), fcbABC geni ise halobenzoatların biyolojik olarak parçalanmasını sağlamaktadır. Sonuç olarak bu rekombinant suşların, bu kirleticilerin sudan biyoremediasyonunda kullanılabileceği saptanmıştır (Kulshreshtha, 2013).

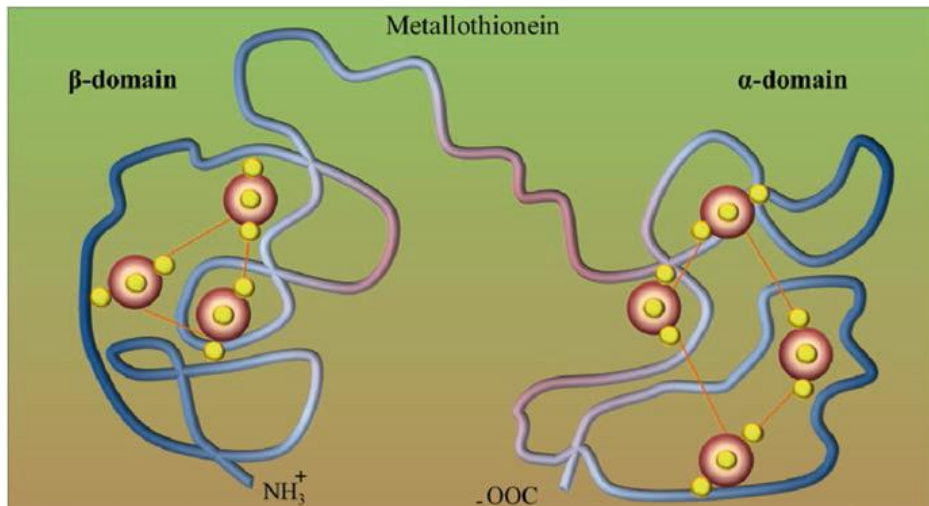
1.8. *Escherichia coli* (*E. coli*)

Koli basili olarak da bilinen *E. coli*, 1885 yılında Theodor Escherich tarafından keşfedilmiştir. *Enterobacteriaceae* ailesine üye olan bu mikroorganizma memeli hayvanların kalın bağırsağında yaşamaktadır. Çubuk şeklinde olup, boyutları 1-2 μ m uzunluğunda ve 0,1-0,5 μ m çapındadır. *E. coli*, gram negatif bir bakteri olduğundan endospor oluşturmaz, pastörizasyon veya kaynatma ile ölür. Memeli hayvanların bağırsaklarında büyümeye adapte olmuş olduğu için en iyi vücut sıcaklığında çoğalmaktadır (Vikipedi, 2022). Her ne kadar *E. coli* komensal bir bakteri olsa da bazı *E. coli* suşları oldukça ciddi enfeksiyonlara yol açabilmektedir (Alteri ve Mobley, 2012; Chaudhuri ve Henderson, 2012). Normalde bağırsakta yaşadığı için *E. coli*'nin çevresel sularda varlığı dışkı kirlenmesinin bir belirtisidir. *E. coli*'nin bağırsak dışı ve bağırsak içi olmak üzere iki patojenik suşu bulunmaktadır. Bağırsak dışı patojenler geniş çapta enfeksiyonlara neden olmaktadır. *E. coli*, ishalli hastalıklara, idrar yolu enfeksiyonlarına, menenjit, peritonit, mastit, sepsis ve gram-negatif pnömoni enfeksiyonlarına da neden olabilmektedir. *E. coli*'nin, tavuk, dana ve başka hayvanlarda da hastalık yapabildiği görülmüştür. *E. coli*, lipopolisakkaritler, peptidoglikan ve fosfolipitleri içeren bir hücre duvarına sahiptir. Lipopolisakkaritler doğada anyoniktir ve bu da hücre duvarında negatif yük oluşturur. Metal iyonları doğada katyoniktir. Böylece elektrostatik etkileşimlerle *E. coli*'nin anyonik hücre duvarına katyonik metal iyonları adsorbe edilir (Khan vd., 2015). *E. coli*, genel olarak bakteri biyolojisinin anlaşılması amacıyla üzerinde sıkça çalışılmış bir model organizmadır. Canlılar arasında hakkında en fazla şey bilinen

organizma olduğu da söylenebilir (Vikipedi, 2022). *E. coli*, basit yapılı olması, kültüvasyonunun kolaylığı, basit besiyeri gereksinimleri, hızlı ve kolay üretilmesi, ekstrem koşullara yüksek adaptasyon yeteneği, dayanıklılığı, morfolojik, genetik ve fizyolojik açıdan iyi bilinmesi ve birçok tekniğın ona göre geliştirilmiş olması gibi avantajlara sahiptir. Bu özellikleri nedeniyle *E. coli*, mikrobiyolojide çok fazla çalışılmaktadır ve moleküler biyolojide önemli bir yeri vardır (Öztürk, 2019). Bakteriyel konjügasyon, genetik rekombinasyon kavramları ilk *E. coli*'de keşfedilmiştir. DNA'nın çoğalması, RNA transkripsiyonu, protein sentezi gibi moleküler biyolojinin pek çok önemli mekanizması, metabolizmanın çoğu ayrıntısı bu organizmada yapılan araştırmalarla anlaşılmıştır. En az on Nobel Ödülü *E. coli* ile yapılan araştırmalara dayanmaktadır. Ayrıca modern genetik mühendisliğinde, *E. coli*'nin önemli bir yeri vardır. Araştırmacılar bu bakteriyi büyük miktarda DNA veya protein üretmek amacıyla bir fabrika gibi kullanırlar. Rekombinant DNA teknolojisinin ilk faydalı uygulamalarından biri *E. coli*'nin manipüle edilerek onun diyabetli hastalar için insülin üretmesini sağlamak olmuştur (Öztürk, 2019). Ayrıca *E. coli*, birçok proteini yüksek verimde eksprese edilebilecek kapasiteye sahiptir. Klonlama ve ekspresyonun farklı hücrelerde yapılabilmesi, elde edilmek istenen proteine ve seçilen ekspresyon sistemine göre suş seçimi gibi olanakları en geniş kapsamda sunan organizmadır (Molla, 2013). Tez çalışmasında *E. coli*'nin tercih edilmesinin nedeni, kullanım alanının geniş olması, maliyetinin düşük olması, tüm gen yapısının bilinmesi ve genetik olarak kolayca manipüle edilebilmesidir. Tez kapsamında kullanılan *E. coli* suşu ve özellikleri ile ilgili bilgi aşağıda verilmiştir. *E. coli* Jm109 suşu, M13 ya da faJmid vektörlerden elde edilecek tek zincirli DNA'nın çoğaltılmasının yanında genellikle transformasyon başarısının artması ve böylece daha verimli transformasyon sağlanması için kullanılan bir suştur. Bu başarısı, içerisine transforme edilmiş olan klonlanmış DNA'yı istenmeyen bir şekilde kesen *E. coli* enzimlerinden (endonükleazlardan) kısmen yoksun olmasından ve kendi kromozomal DNA'sı ile klonlanmış DNA arasında herhangi bir rekombinasyon yapma yeteneğinin bulunmamasından kaynaklanmaktadır. Bu özellikler, genetik haritasında sırayla *endA* – ve *recA* – olarak gösterilmektedir. Bu özellikleri sayesinde istenen rekombinant DNA'nın yüksek verimde ve kalitede elde edilmesini de sağlamaktadır. Aynı zamanda beta-galaktosidaz aktivitesine bağlı olan klonlamalarda, kontrolün kolay olmasını sağlayacak mavi-beyaz koloni seçimine de olanak sağlamaktadır. Basit besiyerlerinde rahatlıkla üreyebilmesi de bir diğerk avantajdır (Molla, 2013).

1.9. Metallothiyoninler

Metallothiyonin (MT), ilk defa at böbreğinde Cd bağlayıcı protein olarak keşfedilmiştir, ancak daha sonra başka birçok organizmada bulunduğu rapor edilmiştir (Khan vd., 2015). Sisteince zengin (%20-30), tiyol içeren, metal bağlayıcı özelliğe sahip düşük moleküler ağırlıklı (6-7 kDa) proteinlere metallothiyoninler (Mfs) denir ve ağır metallerin detoksifikasyonunda yer almaktadır (Vasak, 2005; Verma ve Kuila, 2019). MT'ler, hem esansiyel (Zn, Cu, Ni, vb.) hem de toksik (Cd, Hg, Pb, vb.) ağır metalleri bağlamaktadır. MT'ler prokaryotlardan omurgalılara kadar çok çeşitli taksonomik gruplarda bulunmaktadır (Sauge-Merle vd., 2012). MT'ler; esansiyel metallerin homeostazisini sağladığı (Bremner, 1987), I-II grup ağır metallerin detoksifikasyonunda rol alarak hücreleri ve organları metallerin toksik etkilerine karşı koruduğu (Vallee, 1995), yüksek oranda tiyol içermesi nedeniyle, serbest radikal süpürücüsü olarak görev aldığı bilinmektedir (Hussain vd., 1996; Sato ve Bremner, 1993). Memeli MT'leri 20'si sistein kalıntısı olmak üzere toplam 61-68 amino asit uzunluğunda tek zincirli polipeptidlerdir. Metal kompleksinin 3D yapısı, alfa ve beta olmak üzere iki ayrı alanı içermektedir (Şekil 1.5). N-terminalinde asetilmetyonin ve karboksil terminalinde alanin bulunan iki alan arasında dağıtılan 7 adet 2 değerlikli metal iyonunu bağlayabilmektedir (Sauge-Merle vd., 2012; Vasak ve Meloni, 2011).



Şekil 1.5. Metallothiyoninin yapısı (Petrlova ve Mikelova 2006; Rosen vd., 2017)

MT'lere metal bağladıktan sonra polipeptid zincir yapıları değişmektedir. Canlı ve dokularda MT-metal bileşenleri arasında farklılık gözlenmektedir. Bu durum, maruz kalınan metal çeşidine ve maruziyet yoluna göre değişiklik göstermektedir. MT'lerin,

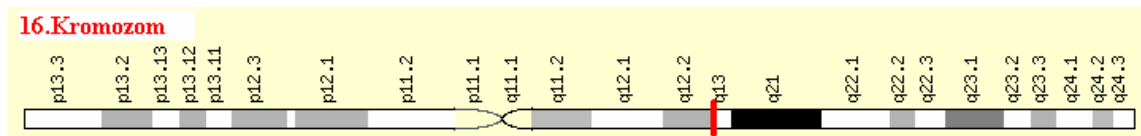
farklı metallere olan affinitesi, $Zn^{+2} < Pb^{+2} < Cd^{+2} < Cu^{+2} < Ag^{+2} = Hg^{+2} = Bi^{+3}$ şeklinde sıralanabilir (Vasak, 2005).

1.9.1. Metalloitiyonin Geninin İzofomları

Memelilerde dört farklı metalloitiyonin izoformu (MT-1 ila MT-4) bulunmaktadır (Adam vd., 2014). MT izoformlarının ekspresyonu ve lokalizasyonu, hücre içi düzeyde (sitozol, mitokondri, çekirdekler, lizozomlar) ve dokularda değişkenlik göstermektedir. MT-1 ve MT-2 izoformları; böbrek, karaciğer ve bağırsak dokularında lokalizedir. Önceden MT3'ün sadece beyinde sentezlendiği düşünülmüştür ancak daha sonra yapılan çalışmalarda; üreme dokularında, dilde, midede, kalpte ve böbrekte de sentezlendiği tespit edilmiştir (Garrett vd., 1999). MT-4, sadece epitel deri hücrelerinde sentezlenmektedir (Adam vd., 2014). Böyle proteinlerin çeşitli ökaryotik ve prokaryotik canlılardan izole edilmesi mümkündür (Gadd, 1990; Han vd., 1992).

1.9.2. Metalloitiyonin 2A (MT2A)

MT2A, 16. kromozomun, 16q13 bölgesinde bulunan, düşük molekül ağırlığında (6042 Da) proteinlerdir. MT2A proteini, 20'si sistein olmak üzere toplam 61 amino asitten oluşmaktadır (Kayaaltı, 2007). MT2A'nın kromozom yapısı Şekil 1.6'da gösterilmiştir (Kayaaltı, 2007).



Şekil 1.6. MT2A'nın 16. kromozom üzerindeki lokalizasyonunun şematik gösterimi (Kayaaltı, 2007)

Metalloitiyonin proteinlerinin 10 fonksiyonel izoformu bulunmaktadır. Farklı metallere karşı bu izoformlar arasında MT2A'nın daha fazla sentezlendiği görülmüştür (Liu vd., 2007; Vasak, 2005). Metaller, MT'lerin sisteince zengin olduğu bölgelerine bağlanırlar. MT2A, toplamda 7 adet metal iyonunu (N terminalinde üç adet ve C terminalinde dört adet) bağlayabilmektedir (Kayaaltı, 2007).

1.9.3. Metalloitiyonin 3 (MT3)

MT3 büyüme engelleyici faktör (GIF) olarak da bilinmektedir. 66-68 aminoasit kalıntısı içermektedir ve biri N terminalinde (β -alanı) ve diğeri C terminalinde (α -alanı) olmak üzere iki metal-tiyolat alanı bulunmaktadır (Zheng vd., 2004). MT3, Zn, Cu veya Cd gibi metalleri neredeyse diğeri metalloitiyonin ailesiyle aynı şekilde bağlayabilmektedir (Toriumi vd., 2005). Bir çalışmada, MT3'ün Cu^{+2} 'ye MT-1 ve MT-2'den daha yüksek affinite gösterdiği tespit edilmiştir (Toriumi vd., 2005). Başka bir çalışmada, MT-1 ve MT3'ün Zn^{+2} ve Cd^{+2} 'nin metal bağlanma kapasitesi karşılaştırılmıştır. MT3'ün MT-1 ile karşılaştırıldığında daha yüksek metal bağlama kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir (Palumaa vd., 2003).

1.9.4. Metalloitiyoninler ve Metal Detoksifikasyonu

Birçok mikroorganizma metallere maruz kaldığında, metal bağlayıcı proteinler sentezlemektedir. Bu sentezin, ağır metallerin detoksifikasyon mekanizması gereği yapıldığı saptanmıştır. Geleneksel biyosorbentlerle karşılaştırıldığında, MT'ler birçok ağır metale karşı yüksek bağlanma affinitesine sahiptir. Yapılan çalışmalar metal derişimlerinin artışına paralel olarak, metal bağlayıcı proteinlerin sentezinin arttığını göstermektedir (Adam vd., 2014). MT'ler, hücre içerisinde serbest dolaşarak, metalleri bağlar ve hücreye zarar vermelerini engellemektedir (Dziegiel, 2004). Ayrıca MT'ler, hücreleri oksidatif hasardan korumaktadır (Aktay ve Söylemezoğlu, 2001). MT'lerin metal detoksifikasyonları; maruz kalan hücreye, metalin özelliğine ve konsantrasyonuna göre değişiklik göstermektedir. Bir çalışmada, düşük konsantrasyonlarda Cd maruziyetinde bile MT miktarının arttığı ileri sürülmüştür. Kısa süreli maruz kalma durumunda metal detoksifiye edilirken, uzun süreli maruziyetin sonunda ise Cd bağlanmış MT (Cd-MT) formunun karaciğerden böbreklere taşınması nedeniyle, nefrotoksik etki oluşturduğu saptanmıştır (Sauer vd., 1997). Yapılan çalışmalarda, MT izoformlarının bir metale maruz kalması sonucunda hepsinde aynı anda bir artış görülmemiştir. Bu konuda yapılmış olan çalışmalarda, metalleri detoksifiye etmek için MT-1 ve MT-2'nin ekspresyonlarında hemen artış gözlenirken, MT-1A'nın, metaller ancak hücreye toksik etki yapmaya başladıklarında ekspresyonlarını artırdıkları gözlenmiştir (Boogaard vd., 1991). Ayrıca, yapılan bir çalışmada, insanda MT2A geninin bazal düzeydeki ekspresyonunun, MT-1 geninden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu durum MT izoformlarının farklı miktarlarda sentezlendiğini göstermektedir (West vd.,

1990). Metalloitiyoninlerin, Pb'ye maruz kaldığında ekspresyonlarını artırarak, Pb-MT kompleksi oluşturarak Pb toksisitesini azalttığı yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir. Hücre kültürü ile yapılan çalışmalarda, MT'nin hücrelerde Pb konsantrasyonu düşük olduğunda, kısa süreli maruziyette ve tümör oluşumu fazla ilerlememiş ise metalin toksik etkilerini azaltmaya çalıştığı ifade edilmiştir ancak uzun süreli maruziyette ve ölümcül düzeydeki Pb konsantrasyonları için bir koruma sağlamadığı ileri sürülmüştür (Park vd., 2001).

1.9.5. Metalloitiyoninlerin İndüksiyonu

MT ekspresyonu üzerine, en çok metallerin ve glukokortikoidlerin etkileri araştırılmıştır. MT izoformlarının ekspresyonlarının hepsini metallerin indüklediği tespit edilmiştir. Ancak, glukokortikoidlerin sadece MT2A ve MT-1E genlerinin ekspresyonunu indüklediği rapor edilmiştir (Kayaaltı, 2007). Yapılmış olan çalışmalar sonucunda MT sentezini artıran birçok etmen olduğu belirlenmiştir. Bu etmenler aşağıda sıralanmıştır (Aktay ve Söylemezoğlu, 2001).

- Metaller (Zn^{+2} , Cu^{+2} , Cd^{+2} , Hg^{+2} vb.),
- UV Radyasyon,
- Kimyasal maddeler (Parakuai, CCl_{43}),
- Alkilleyici maddeler,
- Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar (doksorubisin, cisplatin, bleomisin),
- İnflamasyon,
- Sitokinler (interleukin-1, interleukin-6, TNF-a: tümör nekroz faktör),
- Glukokortikoidler (deksametazon),
- Katekolaminler (epinefrin, norepinefrin),
- Forbol Esterleri,
- Adenozin,
- Bakteriyel Enfeksiyonlar,
- Fiziksel ve Kimyasal stresler (sıcak, soğuk, ekzersiz),
- Polipeptid Hormonlar (Anjiolensin-II, Glukagon).

Bazı bakteriler ağır metallerin homestazında etkili olan bakteriyel MT'leri içermektedir. *E. coli* dâhil olmak üzere birçok gram negatif bakteride Cd, Zn ve Co'ya karşı direnç sağlayan en iyi karakterize edilmiş metal akış sistemlerinden biri Czc dir. Metallere karşı

MT sentezleyen bazı bakteriler şunlardır: *Synechococcus* PCC 7942 (SmtA), *Anabaena* PCC7120 (SmtA), *Oscillatoria brevis* (BmtA), *P. aeruginosa* (BmtA) ve *Pseudomonas putida* (BmtA) (Turner vd., 1996).

1.10. Adsorpsiyon İzotermi

Adsorpsiyon; herhangi bir katı, sıvı veya gaz türünün, bir malzemenin yüzeyinde kütlesine göre daha yüksek konsantrasyonda bulunmasına denir. Adsorban, yüzeyinde adsorpsiyonun gerçekleştiği maddedir. Adsorban yüzeyinde, adsorbe edilen madde ise adsorbat olarak adlandırılır (Pengfei, 2016). Adsorpsiyon prosesinde, sulu fazda çözünen metal iyonlarının konsantrasyonu ile biyosorbana bağlanan metal iyonlarının konsantrasyonu arasında bir denge kurulur. İzoterm, adsorbat ile adsorban arasındaki etkileşimi karakterize etmek için kullanılır. Böylece, adsorpsiyon ortamındaki adsorbat konsantrasyonu ile her iki faz dengedeyken katı fazda adsorbe edilen adsorbat arasındaki ilişkiyi açıklar (Öztürk vd., 2011). Adsorpsiyon izotermi, sabit sıcaklıkta adsorpsiyon işlemi bir denge durumuna ulaştığında adsorpsiyon moleküllerinin sıvı faz ile katı faz arasında nasıl dağıldığını gösterir (Ertugay ve Malkoç, 2014). Adsorpsiyon, bir katı yüzeyinde kirleticilerin tutulması iken biyosorpsiyon ise biyolojik bir madde yüzeyine kirleticilerin bağlanmasıdır. Kirleticiler adsorbana aktif ve pasif olmak üzere iki farklı şekilde tutulmaktadır. Aktif tutulmada, kirleticilerin hücre içinde biriktirilmesi gerçekleşirken, pasif tutulmada ise kirleticilerin biyosorbent yüzeyinde bulunan aktif bölgelere bağlanır (Vergili, 2006; Hatay, 2006). Adsorpsiyonun bir arıtma yöntemi olarak kullanılabilirliğinin belirlenmesinde adsorpsiyon izotermi önemli rol oynamaktadır. Metallerin biyosorbentlere bağlanması, adsorpsiyon izotermine uymaktadır. İzotermi denklemleri en yaygın olarak kullanılan Langmuir ve Freundlich izotermi denklemleridir (Kılıç, 2004). Alt başlıklarda bu izotermi denklemleri hakkında detaylı bilgi verilmiştir.

1.10.1. Langmuir İzotermi

Langmuir izoterminde yüzeyde adsorplanan moleküller tek tabaka halinde adsorplanır. Adsorpsiyon, adsorbatın başlangıçtaki konsantrasyonuna ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Langmuir izoterminin dayandığı varsayımlar; adsorbat yüzeyinin her tarafında adsorpsiyon enerjisinin aynı olduğu, yer yer yüzeyde boşluklar olduğu, yüzeyde tutunan moleküller arasında etkileşme olmadığı ve desorpsiyon hızı adsorbat yüzeyine

bağlanan madde konsantrasyonu bağlı olarak değişmesidir (Şencan, 2006). Langmuir izotermi aşağıdaki denklem ile ifade edilmektedir.

$$C_e/q_e = (1/K_L q_m) + (C_e/q_m) \quad (1)$$

q_e = Denge anında adsorplanan madde miktarı (mg/g adsorban),

q_m = Adsorbentin maksimum adsorplama kapasitesi (mg/g),

K_L = Langmuir adsorpsiyon sabiti,

C_e : Denge durumunda adsorplanmadan kalan madde konsantrasyonunu (mg/L).

Bu eşitliğe göre C_e değerlerine karşılık C_e/q_e grafiği çizilerek doğrunun eğiminden q_m , kayma değerinden ise K_L sabiti hesaplanabilir (Maleki vd., 2015). Ayrıca uygun alanın ve adsorbanın gözenekliliği, K_L sabiti ile ilişkilendirilebilir, bu da daha yüksek adsorpsiyon kapasitesinin geniş yüzey alanına ve gözenek hacmine bağlı olduğu anlamına gelir (Al-Ghouti ve Daana, 2020). Heterojen sistemlerde ise langmuir izoterminin dengeye ulaştığını tespit etmek için R_L değerinin hesaplanması gereklidir. Genellikle ayrışma faktörü veya denge parametresi olarak adlandırılan boyutsuz bir katsayı olan R_L , Langmuir sabitine dayalı olarak türetilebilir ve aşağıdaki denklem ile belirlenebilir.

$$R_L = 1/(1 + K_L C_0) \quad (2)$$

K_L : Langmuir sabiti (L/mg)

C_0 : Başlangıçtaki madde konsantrasyonu (mg/L)

R_L değeri, adsorpsiyonun uygun olup olmadığının belirlenmesini sağlar. Eğer $R_L > 1$ ise uygun olmayan, $R_L = 1$ ise lineer, $0 < R_L < 1$ arasında ise uygun, $R_L = 0$ ise tersinmez anlamına gelir (Al-Ghouti ve Daana, 2020).

1.10.2. Freundlich İzotermi

Freundlich adsorpsiyon izoterm modeli, tersinir ve ideal olmayan adsorpsiyon sürecini tanımlar. Freundlich modelinde, Langmuir izoterminden farklı olarak tek tabaka oluşumu ile sınırlı olmayıp, çok tabakalı adsorpsiyon uygulanması mümkündür. Bu izoterm modelinde, adsorpsiyon ısı ve afinitelerinin heterojen yüzey üzerinde düzgün bir şekilde dağılmasına gerek yoktur. Freundlich izoterm modeli, aktif bölgelerin ve aktif bölgelerin enerjilerinin üstel dağılımının yanı sıra yüzeyin heterojenliğini tanımlar. Genel olarak, ideal adsorpsiyon gösteren sistemler Langmuir modeline uyan sistemlerdir. Adsorbanın yüzeyinin homojen olmaması ve adsorplanmış moleküller arasında meydana gelen etkileşimler sonucu Langmuir denkleminde sapmalar olur. İdeal olmayan sistemler, Freundlich izotermi gibi bazı ampirik izotermilere uyabilirler (Al-Ghouti ve Daana, 2020). Aşağıda Freundlich izotermi tanımlandığı denklem verilmiştir.

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e \quad (3)$$

q_e : Denge anında adsorbe edilen madde miktarı (mg/g)

K_F : Adsorpsiyon kapasitesini veren bir sabit.

n : Adsorpsiyon yoğunluğunu veren bir sabit.

C_e : Denge durumunda çözeltide kalan madde miktarı (mg/L)

Çizilen izoterm grafiği yardımıyla, K_F ve n sabitleri hesaplanabilmektedir. K_F değeri doğrunun eksenini kesme noktası, n ise eğimidir, $1 < n < 10$ ise etkili bir adsorpsiyon olduğu anlamına gelir (Aytan, 2010).

1.11. Adsorpsiyon Kinetiği

Adsorpsiyon kinetiğinde, adsorbatın derişiminin zamana göre nasıl değiştiği bulunur. Böylece etkin adsorbat-adsorbanın temas süresi tespit edilir (Savcı, 2010).

Adsorpsiyon prosesi 4 temel basamakta gerçekleşmektedir:

1. Gaz ya da sıvı fazda bulunan adsorbat (kirletici), adsorbanı (biyosorbent) kapsayan bir film tabakası sınırına doğru difüze olur (bulk solution transport). Bu basamak,

adsorpsiyon düzeneğinde belirli bir hareketlilik (karıştırma) olduğu için çoğunlukla ihmal edilir.

2. Film tabakasına gelen adsorbat buradaki durgun kısımdan geçerek adsorbanın gözeneklerine doğru ilerler (film kütle transferi/sınır tabaka difüzyonu).
3. Sonra adsorbanın gözenek boşluklarında hareket ederek adsorpsiyonun meydana geleceği yüzeye doğru ilerler (parçacık içi difüzyon).
4. En son olarak, adsorbatın adsorbanın gözenek yüzeyine tutunması meydana gelir (sorpsiyon).

İlk ve son basamak genellikle ihmal edilebilir. Hız sınırlayıcı basamaklar 2. ve 3. basamaklardır (Savcı, 2010).

Birinci derece Lagergren eşitliği:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t \quad (4)$$

Yalancı ikinci dereceden kinetik eşitliği:

$$t/q_t = (1/k_2 \cdot q_{eq}^2) + (1/q_{eq})t$$

k_1 : Lagergren adsorpsiyon hız sabiti (dakika⁻¹)

k_2 : Yalancı ikinci dereceden adsorpsiyon hız sabiti (g/mg.dakika)

q_e : Denge anında adsorbe edilen madde miktarı (mg/g)

q_{eq} : Hesaplanan, adsorbe edilen madde miktarı (mg/g)

q_t : Herhangi bir t zamandaki adsorbe edilen madde miktarı (mg/g)'dır.

Birinci derece Lagergren kinetiği için $\ln(q_e - q_t)$ 'ye karşılık t grafiği, yalancı ikinci dereceden kinetik için ise t/q_t değerlerine karşılık t grafiği çizilerek k_1 , k_2 ve q_e değerleri hesaplanabilir (Savcı, 2010).

1.12. Adsorpsiyon Termodinamiği

Termodinamik parametreler, adsorpsiyon prosesinin kendiliğinden veya dışardan enerji alarak gerçekleşme durumunun tespit edilmesini sağlar. Termodinamiksel yönden adsorpsiyon prosesinin incelenmesi, bu prosesin uygulanabilirliğini belirlemek açısından oldukça önemlidir. Gibbs serbest enerjisi (ΔG), Entalpi değişimi (ΔH) ve entropi değişimi (ΔS) değerleri aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanır.

$$\Delta H = \Delta G + T\Delta S \quad (5)$$

Burada,

ΔG : Gibbs serbest enerjisi (kJ/mol)

ΔH : Entalpi değişimi (kJ/mol)

ΔS : Entropi değişimi (kJ/molK)

T: Mutlak sıcaklık (Kelvin)

Ayrıca Gibbs serbest enerjisi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanabilir.

$$\Delta G = -RT \ln K_c \quad (6)$$

Burada;

R: Gaz sabiti (8,314 J/molK)

T: Sıcaklık (Kelvin)

K_c : Dağılma Katsayısıdır.

$$K_c = C_a / C_e \quad (7)$$

C_a : Adsorban tarafından tutulan madde konsantrasyonu (mg/L)

C_e : Arıtım sonrasında çözeltide kalan madde konsantrasyonu (mg/L)

Entropi (ΔS) ve entalpi (ΔH) hesabında kullanılan formül

$$\ln K_c = (\Delta S/R) - (\Delta H/RT) \quad (8)$$

ΔS ve ΔH ise $1/T$ 'ye karşı $\ln K_c$ grafiği çizilerek eğimden ΔH ve kesim noktası kayma değerinden ΔS değerleri hesaplanabilir (Nollet vd., 2003).

1.13. Literatür Araştırması

1.13.1. Sulardan Krom ve Kurşun Giderimine Yönelik Çalışmalar

Cr ve Pb biyoremediasyonunda yabancı bakteri türleri kullanılarak yapılmış olan çalışmalar aşağıda verilmiştir.

Guo ve ark (2010) tarafından Cd hiperakümülatörü *Solanum nigrum* L. (Köpek üzümü) bitkisinden çoklu metal dirençli bir endofitik bakteri *Bacillus sp.* L14 (EB L14) izole edilmiştir. Çalışmada suşun, Cd(II), Pb(II), Cu(II) ve Cr(VI) ağır metal iyonlarının sentetik çözeltilerinin biyoremediasyonu araştırılmıştır. LB ortamında suşun MİK değerlerini; Cu(II) 10 mM; Cd(II) 2 mM; Cr(VI) 12 mM; Pb(II) 4 mM; Zn(II) 5 mM olarak belirlenmiştir. EB L14 suşuna, bu metaller 10 mg/L konsantrasyonunda ayrı ayrı (24 saat boyunca) uygulandıktan sonra, suşun metal iyonlarını alma kapasitelerini; Cd(II) % 75,8; Pb(II) % 80,5; Cu(II) % 21,3 olarak tespit edilmiştir. Ancak neredeyse hiç Cr alımı gözlemlenmemiştir. Hücre altı fraksiyonlama çalışmalarında, hücreler tarafından alınan Cd(II) ve Pb(II)'nin sırasıyla % 80,8'i ve % 76,5'i membran fraksiyonunda bulunurken, sitoplazmik fraksiyonda ise Cd(II) ve Pb(II) varlığı sırasıyla %5,5 ve %7,4 olarak bulunmuştur. Hücre duvarında ise toplam alımın sırasıyla %13,7 ve %16,1 olduğu bildirilmiştir.

Naik ve ark (2012) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, Mandovi Halicinden (Hindistan) izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* WI-1 suşunun SDS Page analizi sonucunda Pb'ye direncinin metalotiyonin bmtA (11 kDa) geninin varlığından kaynaklandığı tespit edilmiştir. Suşun Pb, Cd ve Hg için MİK değerleri sırasıyla 0,8 mM, 0,5 mM ve 0,03 mM olarak bulunmuştur. Atomik absorpsiyon analizi (AAS) sonucunda, bakteri hücresinin 26,5 mg Pb/g kuru ağırlığının hücre içi biyoakümülayonu olduğu saptanmıştır. Yeni keşfedilen bu suşun gelecekte Pb ile kirlenmiş ortamların temizlenmesi için önemli model bir mikroorganizma olabileceği ileri sürülmüştür.

Dadrasnia ve ark (2015), *Bacillus salmalaya* 139SI (*B. salmalaya*) izole ettikleri suşun sulu çözeltilerden Cr(VI) biyosorpsiyon potansiyelini araştırmışlardır. Çalışmada, yüzey sorpsiyonunun artan metal konsantrasyonu ile birlikte arttığını belirtmişlerdir. Bu

durumun nedeni olarak, hücre yüzey modifikasyonu ve koruma stratejisi olabileceğini ifade etmişlerdir. Bununla birlikte, Cr birikiminin *B. Salmalaya* 139SI izolatının detoksifikasyon mekanizmasının hücre içi birikimden ziyade, hücre duvarında meydana geldiğini rapor etmişlerdir.

Kumari ve ark (2016), tabakhane atıksuları ile kontamine olmuş topraktan izole ettikleri *Bacillus cereus* Cr1 suşunun serbest ve immobilize (hareketsizleştirilmiş) hücrelerini kullanarak tabakhane çıkış suyundan Cr(VI)'nın arıtımı (indirgenmesi) üzerindeki etkinliğini araştırmışlardır. Cr(VI) redüksiyonunun nerede olduğunu bulmak için kültür süpernatantında, hücre duvarı ve hücresiz fraksiyonlar olmak üzere üç fraksiyonun hepsinde toplam Cr ve Cr(VI) miktarlarını belirlemişlerdir. Suşa, 80 mg/L Cr(VI) uyguladıktan sonra kültür süpernatantında 4 mg/L Cr(VI) ve $75,8 \pm 0,2$ mg/L toplam Cr bulmuşlardır. Ancak, hücre duvarında Cr(VI) ve toplam Cr tespit edilemez iken, hücresiz fraksiyonda ise Cr(VI) bulunmazken, toplam Cr'u $0,2 \pm 0,1$ mg/L olarak belirlemişlerdir. Çalışmada, 48 saat sonunda serbest ve hareketsizleştirilmiş hücreler tarafından tabakhane atıksuyundan Cr gideriminin verimlerinin sırasıyla %73 ve %92 olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, Cr içeren atıksuyun arıtımında hareketsizleştirilmiş hücrelerin daha etkili olduğu saptanmıştır.

Sathishkumar ve arkadaşları (2017), *Pseudomonas stutzeri* L1 ve *Acinetobacter baumannii* L2 bakterileri ile Cr(VI)'nın daha az toksik Cr(III)'e indirgenmesindeki etkinliklerini araştırmışlardır. Cr(VI)'nın indirgenmesi üzerine pH (5-6-7-8-9-10), sıcaklık (27, 37 ve 60 °C) ve Cr konsantrasyonu (100–200-300-400-500-1000 mg/L) parametrelerinin etkisinin araştırıldığı çalışmada, her bir parametre için 24 saat inkübe edilmiştir. Çalışmada L1 ve L2 suşlarının varlığında, Cr(VI)'nın biyolojik indirgeme oranının sırasıyla % 40-97 ve % 84-99 arasında olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, L2 suşunun Cr(VI)'nın 1000 mg/L konsantrasyonuna maruz kalsa bile hayatta kalabildiğini ve Cr(VI)'nın bu toleransının çözünür enzim fraksiyonlarının aktivitesi ile bağlantılı olduğunu rapor etmişlerdir.

Karthik ve ark (2017) tarafından, tabakhane atıksuyu ile kontamine olan toprak örneğinden izole edilen yeni bir haloalkalifilik Cr(VI) toleranslı *Cellulosimicrobium funkei* AR8 suşunun kesikli deneylerde, farklı pH (5-9), sıcaklık (25–45 °C), NaCl (% 0-3) ve Cr(VI) konsantrasyonları (100-250 µg/mL) gibi parametrik koşulların Cr(VI)

indirgemesi üzerine etkisini araştırmışlardır. Suşun 1100 µg/mL Cr(VI) konsantrasyonunun olduğu ortamda büyüebildiğini belirtmişlerdir. Çalışmada, suşun 250 µg/ml Cr(VI) 120 saatin sonunda % 78,2 oranında indirgeyebildiği gözlemlenmiştir. Cr(VI)'nın tam olarak (%100) indirgenmesi, 100, 150 ve 200 µg/mL Cr(VI) konsantrasyonları için sırasıyla 40, 80 ve 120 saatte gerçekleşmiştir. Sonuçlar, Cr(VI) indirgenmesi için gereken sürenin, artan Cr(VI) konsantrasyonları ile giderek arttığını göstermektedir. Bunun nedeni olarak yüksek Cr(VI) konsantrasyonunun, suş üzerinde toksik baskı oluşturmaması ve büyüme fazını uzatarak ve tam indirgeme süresinin de önemli ölçüde uzamasına yol açmış olabileceğini bildirmişlerdir.

Pugazhendhi ve ark (2018), *Ralstonia solanacearum* KTSMBNL 13 suşunu ağır metalle kirlenmiş elektrokaplama sanayi toprağından izole etmişlerdir. Pb konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve temas süresi gibi Pb giderimini etkileyen faktörlerin etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak, 100 mg/L Pb başlangıç metal konsantrasyonu ile pH 6, 35 °C sıcaklıkta ve 26 saatlik temas süresinde maksimum Pb giderimine (%90) ulaşıldığını belirtmişlerdir.

Wu ve ark (2019) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, Cr(VI) dirençli bakteriler Chengdu'da (Çin) bulunan tabakhane atık bertaraf sahasından toplanan Cr(VI) kontamine topraktan izole edilmiştir. *Bacillus sp.* CRB-7 suşunun Cr(VI) MİK değeri 450 mg/L olarak belirlenmiştir. Kültür optimizasyon deneyleri sonunda, 120 mg/L Cr(VI), pH 7 ve 37 °C sıcaklıkta 48 saat sonunda tamamen indirgediği gözlemlenmiştir.

Zeng ve arkadaşları (2019) tarafından, *Oceanobacillus oncorhynchi* bakterisi Cr ile kirlenmiş topraktan izole edilmiştir. 72 saatlik inkübasyonun sonunda başlangıç 200 mg/L'lik Cr(VI) konsantrasyonunun % 74,2'sinin giderildiği tespit edilmiştir.

Göçenoğlu Sarıkaya (2019), *P. ostreatus* (mantar) biyokütlesini kullanılarak sulu çözeltilerden Cr(VI)'nin biyosorpsiyonunda biyosorbent olarak kullanım potansiyelini araştırmıştır. Biyosorpsiyon prosesinin, Freundlich izotermine uyduğunu ve ΔG değerinin negatif olması nedeniyle biyosorpsiyonun kendiliğinden gerçekleştiğini ileri sürmüştür.

Su ve ark (2020) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, Hg, Pb ve Cd stresi altında *Rhodobacter sphaeroides* SC01 suşunun metalleri giderme yeteneğini tahmin etmek için oksidatif hasar ve antioksidan savunma sistemi ile birleştirilerek metal iyonlarını giderme

mekanizmaları incelenmiştir. Çalışmada, en yüksek oranda (%98) Pb'nin giderildiğini ve Pb'nin SC01'in hücre yüzeyindeki hidroksil, amino ve fosfat gruplarına bağlanabildiğini ileri sürmüşlerdir. Bu sonuçlara dayanarak, SC01'in muhtemelen stresli koşullar altında antioksidan sistemi düzenleyerek ve Pb fosfat hidroksit çökeltilerinin oluşumuyla Pb'ye karşı yüksek dirence ve yüksek Pb giderme verimliliğine sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Tan ve ark (2020), atıksu arıtma tesisi çamurundan yüksek Cr(VI) toleransına sahip olan *Bacillus sp.* suşunu izole etmişlerdir. Suşun farklı konsantrasyonlardaki Cr(VI) giderim oranları sırasıyla; 150 mg/L'yi %89, 200 mg/L'yi %85 ve 300 mg/L'yi %43 oranında giderdiğini tespit etmişlerdir. Şuşun 300 mg/L üzerindeki Cr konsantrasyonlarında metal gideriminin azaldığı belirtilmiştir.

1.13.2.Rekombinant Bakteriler ile Metallerin Giderimine Yönelik Çalışmalar

Literatürde rekombinant bakteriler ile yapılmış olan çeşitli biyogiderim (biyoremediasyon ve biyosorpsiyon) çalışmaları mevcuttur. Bu çalışmalar ile ilgili detaylı bilgi aşağıda verilmiştir.

Chen ve Wilson (1997), *E. coli* Jm109 suşuna Hg taşıyıcı sistem ve MT genini eş zamanlı olarak eksprese etmişlerdir. Sonuç olarak rekombinant suşunun, kontrol suşuna göre Hg⁺² biriktirme kapasitesinin dört kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Valls ve ark (2000) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, ağır metal toleranslı *Ralstonia eutropha* suşuna fare metalotiyonini eksprese edilmiştir. Cd⁺² ile kirlenmiş toprağın *Ralstonia* ile aşılmasının, ağır metalin bütün bitkilerinin büyümesi üzerindeki toksik etkilerini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir.

Mauro ve Pazirandeh (2000) tarafından *E. coli* suşuna *Neurospora crassa* (kırmızı ekmek mantarı) MT (Mtt1) proteini 1'den 12'ye kadar tekrarlı olarak eksprese edilerek *E. coli*'nin Cd'yi bağlama kapasitesinin arttırılması amaçlanmıştır. Tekrarlı olarak eksprese edilen MT genleri arasında tek bir metal bağlama alanına sahip hücreye kıyasla 9 mer ifade eden hücrenin 6,5 kat daha fazla Cd'yi bağlarken, gen içermeyen kontrol *E. coli* suşuna göre Cd bağlama kapasitesinin 65 kat arttığı belirlenmiştir.

Deng ve Wilson (2001) tarafından yapılan çalışmada, eş zamanlı olarak Hg taşıma sistemi (MerP-MerT) ve GST ile füzyonlanmış bezelye metallothioneini (GST-MT) eksprese eden genetik olarak tasarlanmış bir *E. coli*, farklı metal iyonlarını içeren gerçek elektrolit atıksuyundan Hg^{+2} giderimi için kullanılmıştır. Rekombinant hücrelerin atıksudaki Hg'nin %99'undan fazlasını giderdiği tespit edilmiş ve biriken Hg miktarının 26,8 mg/g hücre kuru ağırlığı iken diğer metal iyonlarının (Na^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} , K^+) hiçbirinin sudan uzaklaştırılmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, rekombinant *E. coli*'nin Hg için yüksek bir afiniteye ve spesifik olarak giderme özelliğine sahip olduğunu göstermiştir.

Zhao ve ark (2005), Hg taşıma proteini (merT-merP) ve metallothionein ekspresyonu ile rekombinant *E. coli* Jm109 suşunun Hg metal iyonunu biyoakümülyasyon kapasitesini artırmıştır. Kontrol suşuna kıyasla LB ortamında, Hg^{+2} konsantrasyonu 7,4 mg/L'ye kadar olan yüksek konsantrasyonda rekombinant suşun büyüdüğü görülmüştür.

Kim ve ark (2005), sulu çözeltiden Cd'yi gidermek için bir manganez taşıma geni (mntA) (pZH3-5) ve GST ile füzyonlanmış maya MT (pMT) genlerini *E. coli* Jm109 suşuna klonlamışlardır. Ayrıca membran biyoreaktörde biyoakümülyasyon çalışmalarını yapmışlardır. Optimum şartlar altında (pH: 7, 37 °C ve OD 600: 0.5, 1,5 mM IPTG indüksiyonu), Cd birikimini 21,5 mol Cd/g kuru hücre olarak tespit etmişlerdir. Cd, üç farklı metalin (Cu^{+2} , Zn^{+2} ve Pb^{+2}) eşit konsantrasyonunu ihtiva eden bir çözelti içinde seçici olarak biriktirilmiştir, bu da toplam biriken metallerin %90'ından fazlasının Cd olduğu anlamına gelmektedir. Membran reaktör deneyinde ise, giriş çözeltisindeki 1 mg/L Cd'nin, çıkışta 0,2 mg/L'ye düşerek Cd'nin %80'inin sürekli olarak giderildiğini tespit etmişlerdir.

Deng ve ark (2007) tarafından, Cd taşıma sistemi ve GST ile füzyonlanmış bezelye metallothioneini (MT) *E. coli* Jm109 suşuna ayrı ayrı eksprese edilmiştir. Çalışmada sulu çözeltiden spesifik olarak Cd^{+2} biriktirebilen suşların elde edilmesi amaçlanmıştır. MT geni içeren *E. coli* suşunun (M4) Cd toksisitesine direnç gösterdiği ve kontrol suşuna göre Cd^{+2} alımının bir kattan daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Cu^{+2} , Pb^{+2} ve Zn^{+2} varlığı, M4 tarafından Cd^{+2} alımını önemli derecede inhibe ettiği, Ni^{+2} ve Mn^{+2} metallerinin ise Cd^{+2} biyoakümülyasyonunu yavaşça azalttığı bulunmuştur. Ayrıca çalışmada, EDTA'nın, Cd^{+2} bağlamasını olumsuz yönde etkilediği ileri sürülmüştür.

Raghu ve ark (2008) çalışmalarında, *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 (RP) ve *Novosphingobium aromaticivorans* F-199 (NA) 21 suşlarına ait NiCoT genlerini *E. coli* suşuna klonlayarak Ni ve Co metallerinin giderilmesini amaçlamışlardır. Çalışmada, %85 oranında Co gidermişlerdir.

Singh ve ark (2008) tarafından, *Fucus Vesiculosus* (kahverengi deniz yosunu)'dan As bağlayan metallothionein (fMT) geni *E. coli* suşuna eksprese edilmiştir. Geni taşıyan rekombinant *E. coli* suşunun kontrol suşuna göre, As(III) ve As(V)'ı sırasıyla 30 ve 26 kat daha yüksek oranda bağladığı tespit edilmiştir.

Su ve ark (2009), insan hepatik MT (hMT_IA) genini *E. coli*'ye eksprese ederek rekombinant suşun As(III) biyoakümülyasyon kapasitesi araştırılmışlardır. Çalışmada, As(III) giderimine Hg, Cd ve Zn metal iyonlarının etkisi de araştırılmıştır. Bu metal iyonlarının, As(III) metal iyonlarının biyoakümülyasyonunu inhibe ettiği sonucuna varılmıştır. Rekombinant *E. coli*'nin (pGHM) biyoakümülyasyon kapasitesinin (319,6 µg/g kuru hücre), kontrol suşundan (76,3 µg/g kuru hücreden) 4 kat daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir.

Patel ve ark (2010) tarafından yapılan çalışmada, *Caulobacter crescentus* suşuna hekzahistidin (6his) peptidi hücre yüzeyine eksprese edilerek sulu çözeltilerden Cd biyoremediasyonu araştırılmıştır. Çalışmada 15 mg/L Cd'nin rekombinant suşta 16 mg/g kuru hücre iken kontrol suşunda 11,6 mg/g kuru hücre olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, Cd'nin remediasyonunda etkili olduğu ve Pb, Cu, Ni gibi iki değerlikli metal iyonlarında gideriminde bir ajan olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir.

Deng ve Jia (2011), atıksudan Hg⁺²'nin biyoakümülyasyonunda fotosentetik bir bakteri olan *Rhodopseudomonas palustris* suşunun potansiyelini belirlemeyi amaçlamıştır. Eş zamanlı olarak Hg taşıma sistemini (MerP- MerT) ve atıksudan Hg giderimi için GST ile füzyonlanmış bezelye metallothioneini (GST-MT) suşa eksprese etmişlerdir. Sonuç olarak; rekombinant *R. Palustris* suşunun yabanıl suştan üç kattan (22 mg/g kuru hücreden 75 mg/g kuru hücreye çıkardığı) daha fazla Hg⁺² biriktirebildiği tespit edilmiştir. Ayrıca, Hg⁺² yüklü hücrelere EDTA muamelesi ile hücre yüzeyinde Hg⁺²'yi absorbe eden yabanıl tip *R. Palustris*'ten farklı olarak, rekombinant *R. palustris* tarafından bağlanan Hg⁺²'nin %80'den fazlasının hücrelere taşındığı kanıtlanmıştır. Hücre duvarlarında en çok Hg⁺²'yi biriktiren yabanıl tip *R. Palustris*'ten farklı olarak,

rekombinant *R. palustris*/pSUTP + pGPMT, hücre zarı yakınında Hg taşıma sistemini ifade ettikten sonra, %87 oranında Hg^{+2} 'yi hücrelere başarıyla taşıyabildiği sonucuna varılabileceği ifade edilmiştir.

Ruiz ve ark (2011) tarafından yapılan çalışmada, *E. coli* Jm109 suşuna fare mt1 geni ve polifosfat kinaz (ppk) geni ayrı ayrı eksprese edilmiştir. Mt1 geni içeren rekombinant bakteriye 120 μ M Hg uygulandıktan sonra %83,3 oranda (100 μ M Hg) Hg'yi biriktirdiği rapor edilmiştir.

Ma ve ark (2011) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *E. coli* BL21 (DE3) suşunun As(III) ve Cd(II) biyoakümülyasyon kapasitesini arttırmak için GST ile füzyonlanmış insana ait MT (hMT-1A) geni üst üste eksprese edilmiştir. Biyoakümülyasyon deneylerinde, *E. coli* (pGEX-MT), *E. coli* (pGEX-2MT), *E. coli* (pGEX-3MT), *E. coli* (pGEX-4MT) ve *E. coli* (pGEX-4T-1 kontrol) suşları kullanılmıştır. En yüksek biyoakümülyasyon kapasitesinin *E. coli* (pGEX-3MT) suşunda olduğunu ve *E. coli* (pGEX-MT) suşundan As(III) için 1,4 ve Cd için 1,8 kat daha fazla biyoakümülyasyon kapasitesi olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, MT içeriği arttıkça metal bağlama kapasitesinin artmadığı ve MT geninin belli bir limit değerden sonra metalleri daha fazla bağlayamadığı sonucuna varılmıştır.

Sauge-Merle ve ark (2012) tarafından yapılan çalışmada, *E. coli*'nin metal bağlama kapasitesini arttırmak için koyun MTII geni maltoz bağlayıcı protein (MBP) ile *E. coli*'nin sitoplazmasına ve periplazmasına füzyonlanmıştır. Sitoplazmada MBP-MT aşırı eksprese edilen suşta önemli miktarda Cd, As, Hg ve Zn biyoakümülyasyonu gözlenirken, MBP-MT periplazmada aşırı eksprese edildiğinde sadece Cu'nun daha yüksek seviyelere toplandığı görülmüştür. Sitoplazmada biriken Zn(II), Cd(II) ve As(III) seviyeleri, kontrol suşundan sırasıyla 5,5; 8,4 ve 55 kat daha yüksek iken, periplazmada bu seviyeler kontrol suşunun seviyelerinden sırasıyla 1; 3,1 ve 7,5 kat daha yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak, sitoplazmada yapılan giderimin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Biondo ve ark (2012) tarafından yapılan çalışmada, *Cupriavidus metallidurans* bakterisinin Pb^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Cd^{+2} , Mn^{+2} ve Ni^{+2} metal iyonlarına karşı olan direncini arttırmak ve biyoremediasyon kapasitesini geliştirmek için suşa sentetik EC20 ((Glu-Cys)₂₀Gly) fitoşelatin geni klonlanmıştır. Çalışmada, yabanıl tip hücrelerin adsorpsiyonunun 110,8 nmol Cd^{+2} /mg hücre kuru ağırlığı olduğu bulunmuştur.

Rekombinant suşun Zn^{+2} , Pb^{+2} , Cu^{+2} , Cd^{+2} , Ni^{+2} ve Mn^{+2} metal iyonlarının adsorpsiyon kapasitesi kontrol suşuna göre sırasıyla yaklaşık olarak %219, %210, % 6, %59, %45 ve % 31 fazla olduğu tespit edilmiştir. *C. metallidurans* (EC20) rekombinant bakterisinin metal birikimindeki en yüksek artış Pb için 547,5 nmol Pb^{+2} /mg kuru hücre ve Zn için $510,7 \pm 15,3$ nmol Zn^{+2} /mg kuru hücre olduğu, metal iyonlarının her ikisinin de yabancı tip suşa göre 3 kat daha fazla biriktiği belirlenmiştir.

Nguyen ve ark (2013) tarafından yapılan çalışmada, yüksek Pb bağlama kapasitesine sahip olan ThrAsnThrLeuSerAsnAsn (TNTLSNN) peptidi *E. coli* suşuna transforme edilmiştir. Çalışmada, rekombinant suşun Pb, Co, Ni ve Cu metalleri arasından seçici olarak Pb adsorpsiyonu araştırılmıştır. Rekombinant hücrenin, Pb ve Cu'yi hücre yüzeyinde bağlama kapasitesinin, yabancı *E. coli* hücresine (kontrol grubu) göre 4,5 kat daha fazla olduğunu ve 0,2 mM Pb'nin %80'den fazlasını 30 dakikada bağladığı rapor edilmiştir. Rekombinant hücrenin Pb adsorpsiyonunun, Langmuir izoterm modeline uygun olduğunu ve maksimum Pb adsorpsiyon kapasitesinin (q_{max}) 526 μ mol/g kuru hücre olduğu belirtilmiştir.

He ve ark (2014), *S. henanense* tatlı su yengecinin MT genini SUMO füzyon proteini ile stabil hale getirmişlerdir. Çalışmada mutant suşların Zn, Cu ve Cd'ye olan toleranslarını ve birikim kapasitelerini arttırmak için SUMO-MT'den, SUMO-MTt1 ve SUMO-MTt2 olmak üzere iki mutant suşları oluşturulmuştur. Çalışmada, bu metallere olan tolerans ve biyoakümülyasyon kapasiteleri sırasıyla, SUMO-MTt1>SUMO-MTt2>SUMO-MT olarak belirlenmiştir.

Adam ve ark (2014) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *E. coli*'ye insan MT3 genini klonlandıktan sonra kontrol suşu ile Cd ve Pb direnç kapasitesine olan etkisi araştırılmıştır. Çalışmada, Cd için kontrol ve MT3 geni klonlanmış *E. coli* suşlarının LC50 değerleri sırasıyla; 39,2 μ M ve 95,5 μ M iken Pb için sırasıyla; 352,5 μ M ve 207 μ M olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, artan Cd konsantrasyonlarının rekombinant *E. coli* suşunun toleransını artırırken, artan Pb konsantrasyonlarının rekombinant suşun toleransının azaldığı ileri sürülmüştür. Bu durum, Cd ve Pb'nin MT3 geni ile etkileşim mekanizmalarının farklı olmasına bağlanmıştır.

Chaturvedi ve Archana (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, *Deinococcus radiodurans* R1'in metal toleransını geliştirmek için bir fitoşelatin analogu (EC20) ve

siyanobakteriyel *Synechococcus* metallothionein (MT) geni (smtA kodlayan sentetik bir gen) olmak üzere iki metal bağlayıcı peptidin ekspresyonu yapılmıştır. Çalışmada 2,5 µM Cd uygulandığında, EC20 içeren rekombinant suşun, kontrol suşundan yaklaşık olarak 1,5 kat daha fazla, 5 µM Cd uygulandığında ise, SmtA içeren rekombinant suşun 2,5 kat fazla Cd biriktirdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, SmtA rekombinantının, EC20 rekombinantına göre Cd'ye karşı 2,5 kat daha fazla dirençli olduğu ileri sürülmüştür.

Liang ve ark (2015) tarafından yapılan çalışmada, atıksuda Hg'yi gidermek için *E. coli* BL21 suşuna P16S-g10-merT-merP-merB1-merB2-ppk-rpsT sentetik operonu transforme edilmesi ile atıksudaki Hg'nin %43,7 oranında giderildiği gözlemlenmiştir.

Gogada ve ark (2015) tarafından Co'nun radyoaktif sülardan giderimi için *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 (RP) ve *Novosphingobium aromaticivorans* F-199 (NA)'un bakteriyel Ni/Co taşıyıcı (NiCoT) genleri *Deinococcus radiodurans* suşuna eksprese edilmiştir. Bu rekombinant suşun %60 oranında giderim yaptığı rapor edilmiştir.

Drewniak ve ark (2015), bakteri türlerinin arseniti (As(III)) oksitleyebilme ve direnç kapasitesini arttırmak için iki rekombinant plazmiti (pAIO1 ve pARS1) genetik olarak tasarlamışlardır. *Sinorhizobium sp.* M14, *E. coli* Top10, *Agrobacterium tumefaciens* LBA288, *Pseudomonas sp.* OS20R, *Brevundimonas sp.* GZS11R ve *Stenotrophomonas sp.* LM24 suşlarına rekombinant plazmitler transforme edilmiştir. Çalışmada, pAIO1 plazmidini barındıran tüm suşların As(III) oksitleyebildiği ve As(III)'ü As(V)'e tam oksidasyonunun 60–120 saatlik kültürasyondan sonra sabit büyüme fazında olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, rekombinant suşların plazmit pARS1 varlığında As(III)'e karşı (20 mM'a kadar) dirençli olduğu ileri sürülmüştür.

Maruthamuthu ve ark (2015) çalışmalarında, ZraS/ZraR iki bileşenli hücre dışı Pb ve Zn algılama ve giderim sistemini *E. coli* hücresine transforme etmişlerdir. 1 mM Pb rekombinant bakteriye uygulandığında, hücre yüzeyinde 487 µmol Pb/g kuru hücre adsorbe edildiğini ve ortamdaki Pb'nin %48,6 oranında giderildiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca rekombinant bakteriye Cu, Zn, Co ve Ni dahil olmak üzere çeşitli metalleri içeren yapay atıksuyu uygulamışlardır. Sonuç olarak, atıksuda en yüksek oranda adsorbe edilen metalin %85,3'lük oranla Pb olduğunu ve 1 gr kuru hücre başına 427 µmol Pb'yi bağladığını belirtmişlerdir.

He ve ark (2018) tarafından yapılan çalışmada, *Serratia sp.* S2 suşundaki ChrA, ChrB ve ChrAB olmak üzere üç farklı Cr(VI) direnç geni, *E.coli* BL21 suşuna transforme edilerek Cr(VI) absorpsiyonu ve Cr(VI) alım mekanizmaları araştırılmıştır. Suşlara uygulanan 25-50-75-100 mg/L Cr(VI) konsantrasyonlarına en dirençli suş *Serratia sp.* S2 olarak bulunmuştur. Rekombinant türler arasında ise en etkili ChrAB, ikinci sırada ChrA ve son sırada ChrB olduğu rapor edilmiştir. Toplam Cr'nin hücre içi giderimi için elde edilen veriler çok düşük bulunmuştur. Cr giderim kapasiteleri sırasıyla; *Serratia sp.* S2 > ChrAB ≈ ChrA > ChrB > kontrol şeklinde tespit edilmiştir. Sonuç olarak, *E. coli* BL21'e göre ChrA ve ChrAB genleri klonlanan bakterilerin, Cr(VI)'ya karşı yüksek direnç gösterdiği ancak ChrB proteininin böyle bir kapasiteye sahip olmadığı tespit edilmiştir.

Shehata ve Yamazaki (2018) çalışmalarında *Cupriavidus metallidurans* CH34 suşundan Pb bağlayan PbrR genini ve *Synechococcus* suşundan SmtB MT genini, *E. coli*'ye eksprese etmişlerdir. Isı uygulayarak inaktif hale getirdikleri rekombinant *E. coli* (PbrR/SmtB-AT) biyosorbentini, 100 mg/L Pb içeren çözeltiye uygulandıktan 12 saat sonra %77 oranında Pb giderimi olduğunu ve 1 gr kuru hücre başına 31,8 mg Pb'nin giderildiğini tespit etmişlerdir. Isıya maruz bırakılan ve kontrol biyosorbentlerinin Pb biyosorpsiyon oranları arasında önemli bir fark olmadığını belirtmişlerdir.

Shahpiri ve Mohammadzadeh (2018), dört farklı pirinç MT (OsMT) izoformunu GST ile füzyonlayarak, As(III) biriktirme kapasiteleri üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak, GST-OsMT1 (6 sistein), GST-OsMT2 (8 sistein), GST-OsMT3 (4 sistein) ve GST-OsMT4 (3 sistein) rekombinant suşlarının, As(III) biriktirme kapasiteleri kontrol suşuna göre sırasıyla; 8; 5,6; 3 ve 1,1 kat daha fazla olduğu belirtmişlerdir.

Ma ve ark (2019) tarafından *Sinopotamon henanense* tatlı su yengecine ait olan MT geni *E. coli* bakterisine eksprese edilmiştir. Bu MT geni SUMO (diğer proteinleri değiştirebilen ve böylece stabilitelerini arttırabilen ubikuitin benzeri bir protein) füzyon proteini ile stabil hale getirilmiş ve MT geni birkaç kez üst üste (SUMO-MT, SUMO-2MT, SUMO-3MT) eksprese edilmiştir. Rekombinant *E. coli* suşunun Cu, Cd ve Zn metallerinin biyoakümüasyonu araştırılmıştır. Rekombinant *E. coli* suşlarının biyoakümüasyon kapasiteleri sırasıyla; SUMO-3MT > SUMO-2MT > SUMO-MT > kontrol şeklinde bulunmuştur. Üst üste üç kez MT geni füzyonlanmış suşun diğer suşlara göre daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Keshav ve ark (2019), *Cupriavidus metallidurans* CH34 suşunun pbrD genini *E. coli* BL21 (DE3) bakterisine eksprese etmişlerdir. Gen eksprese edilmiş *E. coli*'nin $Pb(NO_3)_2$ 'yi % 99,7 oranında giderdiğini saptamışlardır.

Yang ve ark (2019) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *S. henanense*'nin (tatlı su yengeci) MT geni *E. coli* suşuna eksprese edilmiştir ve Zn, Cd, Cu ve Pb metallerine karşı direnci araştırılmıştır. Cd-MT izoformunun monovalent metal iyonlarına karşı daha yüksek affiniteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, *Sinopotamon henanense* yengecinin MT geninin Cd'nin detoksifikasyonunda ve Zn homeostazının düzenlenmesinde önemli fizyolojik özelliklere sahip olduğu saptanmıştır.

Shahpiri ve Rahimi (2019) yapmış oldukları çalışmada, dört farklı pirinç MT (OsMT) izoformunu heterolog olarak eksprese eden *E. coli* hücreleri ile Cr(III) ve Cr(VI)'nın biyoakümüülasyonunu araştırmışlardır. Rekombinant OsMT1, OsMT2, OsMT3 ve OsMT4 hücrelerinin kontrol suşundan sırasıyla 6,5; 2,7; 5,5; ve 2,1 kat daha fazla Cr(III)'ü biriktirebildiğini saptamışlardır. Ayrıca, Cr(VI)'nın biyobirikiminin ise kontrol suşuna kıyasla bu dört farklı pirinç MT (OsMT) izoformunun sırasıyla 9, 3, 5 ve 3 kat daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. Sonuç olarak, diğer rekombinant türlere kıyasla OsMT1 suşunun daha etkili olduğunu ve bu geni içeren rekombinant bakterinin Cr(III)'ü kuru hücre başına 34 mg ve Cr(VI)'yı 21,4 mg biriktirdiğini bildirmişlerdir.

Li ve ark (2021) yaptıkları çalışmada, *S. henanense* tatlı su yengecinin MT genini eksprese eden *E. coli* hücresi elde etmişlerdir. SUMO-ShMT3 eksprese eden *E. coli*'nin maksimum Cd, Cu ve Zn biyobirikim sergilediğini ve ortalama seviyeleri $2,05 \pm 0,12$, $1,81 \pm 0,15$ veya $1,44 \pm 0,11$ $\mu\text{mol/g}$ kuru hücre olarak bulmuşlardır. SUMO-ShMT3 eksprese eden *E. coli* hücresinin, SUMO-ShMT eksprese eden *E. coli*'ye göre Cd, Cu ve Zn biyobirikiminde $1,86 \pm 0,02$; $1,71 \pm 0,03$ ve $2,13 \pm 0,02$ kat artış olduğunu rapor etmişlerdir.

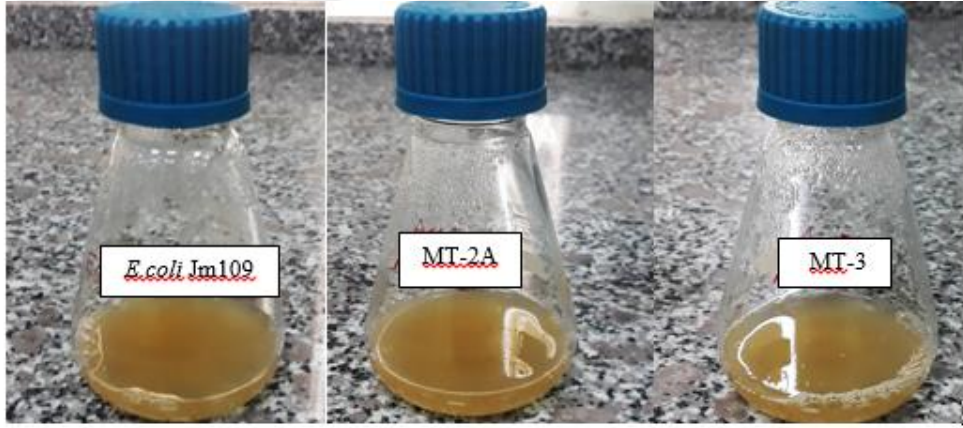
2. BÖLÜM

YÖNTEM VE MATERYAL

2. Materyal

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler

Tez çalışmasında, yabanıl *E. coli* Jm109 suşu (kontrol) ve *E. coli* Jm109 suşuna insan MT2A ve MT3 genlerinin klonlanması ile elde edilen rekombinant suşlar Cr ve Pb metallerinin biyolojik arıtımında kullanılmıştır. Alt başlıklarda deneylerde kullanılan kimyasallar ve cihazlar hakkında detaylı bilgiye yer verilmiştir.



Şekil 2.1. *E. coli* Jm109 ve rekombinantları

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Deneysel çalışmalarda, katı besiyeri olarak Luria bertani (LB) agar ve sıvı besiyeri olarak LB broth kullanılmıştır. Tablo 2.1 ve Tablo 2.2’de besiyeri bileşimleri ve oranları verilmiştir. Gerekli tartımlar yapıldıktan sonra besiyeri içerikleri saf suda çözülmüştür ve otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edildikten sonra kullanılmıştır.

Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan LB agar besiyeri bileşimi

LB Broth İçerik	g/L	Kimyasal Marka
Beef ekstrakt	10	Lab M
Pepton ekstrakt	10	Lab M
NaCl	3	Sigma
Agar	15	Sigma

Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan LB sıvı besiyeri bileşimi

LB Agar İçerik	g/L	Kimyasal Marka
Beef ekstrakt	10	Lab M
Pepton ekstrakt	10	Lab M
NaCl	3	Sigma

Rekombinat suşlar için yabancı suştan farklı olarak, kullanılan LB katı ve sıvı besiyerlerine amfisilin antibiyotiği (100 µg/mL) ilave edilmiştir.

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Metaller

Çalışmada, Kurşun nitrat ($Pb(NO_3)_2$) ve Potasyum dikromat ($K_2Cr_2O_7$) ağır metal tuzları kullanılmıştır. Kullanılan metal iyonlarının tuz formları ve molekül ağırlıkları Tablo 2.3'te gösterilmiştir.

Tablo 2.3. Metal tuzlarının kimyasal formülü ve molekül ağırlıkları

Metal isimleri	Metal moleküler ağırlığı (g/mol)	Tuz formunun kimyasal formülü	Tuz formunun moleküler ağırlığı (g/mol)	Marka
Kurşun nitrat	207,2	$Pb(NO_3)_2$	331,2	Merc
Potasyum dikromat	51,9	$K_2Cr_2O_7$	294,2	İsolab

2.1.4. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

Laboratuvar çalışmalarında kullanılan cihazların ve kimyasalların listesi Tablo 2. 4 ve Tablo 2.5'te verilmiştir.

Tablo 2.4. Deneylerde kullanılan cihazlar

Cihaz	Marka/Model
Çok amaçlı mikropilaka okuyucu	THERMO, VARIO SKAN FLASH
Hassas terazi (0,0001 G)	RADWAG
İnkübatör	JSR/ JSGI 150T
Orbital çalkalayıcı	Major Science
Otoklav	ALP-CLG-40M
Soğutmalı Santrifüj cihazı	Hermle- Z326K
Otomatik Pipetler (50-200-1000-5000 µL)	BRAND
Saf ve ultra saf su cihazı	SMP Minipure SUR M-UP-1013996
Isıtmalı manyetik karıştırıcı	WiseStir MSH-20A
Vorteks	BENCMARK BV1005
Steril düz tabanlı mikropilaklar	TPP 92096
0,45 µm çaplı filtre	İsolab
0,22 µm çaplı steril filtre	İsolab
15 mL steril falkon tüpler	İsolab
50 mL non-steril falkon tüpler	İsolab
Kapaklı cam erlenler (50 mL)	İsolab
Tek kullanımlık petri	İsolab
Steril şırınga (5-10 ml)	
Parafilm	İsolab
Bek alevi	
Yuvarlak uçlu metal öze	

Tablo 2.5. Deneylerde kullanılan kimyasallar

Kimyasal isimleri	Kimyasal formülü	Marka
Nitrik asit	HNO ₃	Merck
Sülfirik asit	H ₂ SO ₄	Merck
Aseton	C ₃ H ₆ O	Merck
1,5 Difenil karbazit	C ₆ H ₅ NHNHCONHNHC ₆ H ₅	Acros
Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂	Merck
Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	Sigma
Kalsiyum klorür	CaCl ₂	Merck
Amfisilin antibiyotiği	C ₁₆ H ₁₈ N ₃ NaO ₄ S	Sigma Aldrich
Glutaraldehit	C ₅ H ₈ O ₂	Alfa Aesar
Osmium tetraoksit solüsyon	OsO ₄	Roth
EcoRI	Restriksüyon enzimi	endonükleaz Thermo Scientific
NotI	Restriksüyon enzimi	endonükleaz Thermo Scientific
T4 DNA ligazı		
Qiagen QIAprep Spin Miniprep kiti		Qiagen
2,3,5 Trifeniltetrazoryum klorür (TTC)		Sigma
Gliserol		Merck

2.1.5. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

Krom stok çözeltisi: 5000 mg/L'lik Cr stok çözeltisi hazırlamak için 1,414 gr K₂Cr₂O₇ tartılıp, 100 mL saf suda çözölmüştür.

Kurşun stok çözeltisi: 5000 mg/L'lik Pb stok çözeltisi hazırlamak için 0,8 gr Pb(NO₃)₂ tartılıp 100 mL saf suda çözölmüştür.

Hazırlanan Cr ve Pb metal çözeltileri otoklavda steril edildikten sonra kullanılmıştır. Metal çözeltileri her deney öncesinde taze olarak hazırlanmıştır ve +4 °C’de 1 hafta boyunca muhafaza edilmiştir.

Amfisilin antibiyotik çözeltisi: 15 mL steril falkon tüpüne, amfisilinden 1 gr tartılıp 10 mL steril saf suda çözülerek steril ortamda hazırlanmıştır. Antibiyotik stok çözeltisinden LB agar ve LB broth besiyerleri otoklavda steril edikten ve yaklaşık olarak 50 °C’ye kadar soğutulduktan sonra steril koşullarda besiyerinde 100 µg/mL amfisilin olacak şekilde hazırlanmıştır.

1,5 Difenilkarbazit çözeltisi: 0,25 gr difenilkarbazit, 100 mL asetonda çözülerek hazırlanmıştır. Çözelti ışık geçirmez, amber şişede saklanmıştır. Çözelti kısa sürede bozulduğu için her kullanımdan önce taze hazırlanarak +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

0,2 N (0,1 M) Sülfürik asit (H₂SO₄) çözeltisi: Balon jojeye ilk olarak bir miktar saf su eklenmiştir. %95’lik H₂SO₄’ten 0,283 mL alınarak son hacim saf su ile 50 mL’ye tamamlanmıştır.

50 mM Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) çözeltisi: 9,306 gram EDTA, 500 mL balon jodede çözülerek son hacim saf su ile 500 mL’ye tamamlanmıştır.

HNO₃/H₂O₂ (v/v %50 HNO₃- w/v %30 H₂O₂) asit çözeltisi:

%50 HNO₃: İçinde bir miktar saf su içeren balon jojeye 192,3 mL %65’lik HNO₃’ten eklenmiş ve son hacim 250 mL’ye saf su ile tamamlanmıştır.

%30 H₂O₂: İçinde bir miktar saf su içeren balon jojeye %35’lik H₂O₂’ten 214,3 mL eklenmiş ve saf su ile son hacim 250 mL’ye tamamlanmıştır.

Son olarak bu iki asit çözeltisi 500 mL erlende karıştırılarak hücre içinde biriken metal miktarını belirlemek için yaptığımız kalıntı analizinin üçüncü ekstraksiyonunda kullanılmıştır. Çözelti ışık geçirmez, amber şişede saklanmıştır.

2,3,5 Trifeniltetrazolyum klorür çözeltisi: %0,1 2,3,5 Trifeniltetrazolyum klorür (TTC) saf suda çözüldükten sonra steril milipore şırınga (0,2 µm) filtreden süzüldükten sonra amber şişede karanlıkta ve + 4 °C’de muhafaza edilmiştir. Bu çözelti her kullanımdan önce taze olarak hazırlanmıştır.

2.2. Metot

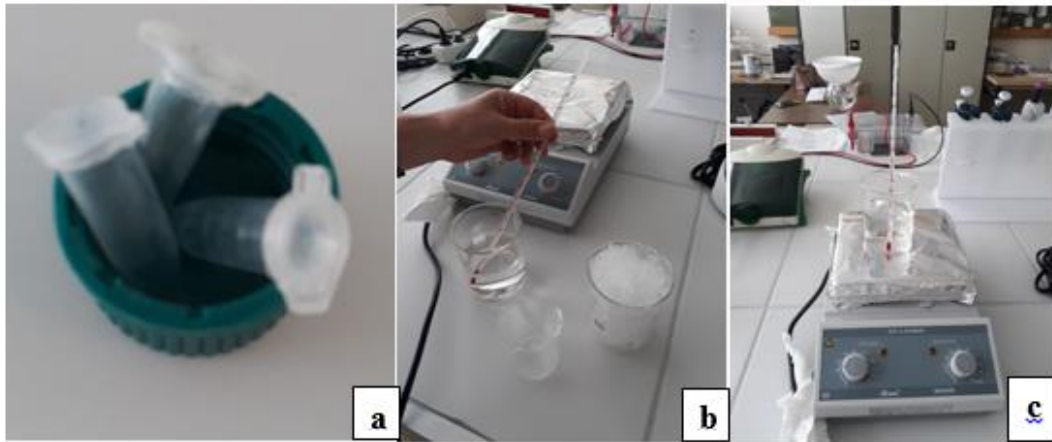
2.2.1. Gen Klonlama ve Bakteri Transformasyonu

MT2A (Gen bankası veri tabanı: NM_005953.5) ve MT3 (Gen bankası veri tabanı: NM_005954.4) CDS gen fragmanları ticari olarak Twist Bioscience şirketinden temin edilmiştir. DNA fragmanları ve pET21 plazmidi, EcoRI ve NotI restriksiyon enzimleri ile iki kez kesilmiş ve ligaz enzimi ile birbirine bağlanmıştır. Transformasyondan önce, *E. coli* Jm109 bakteri hücreleri CaCl_2 yöntemi kullanılarak kompetan (kompetan) hücre elde edilmiştir. Yani bakteri geni almaya hazır (geçirgen) hale getirilmiştir. Rekombinant pET21 plazmidi *E. coli* Jm109 hücrelerine transforme edilmiştir. Daha sonra genleri hücre içine alan rekombinant hücreleri seçmek için amfisilin, X-gal ve büyümeyi destekleyici IPTG içeren LB agara yayma ekim yapılmış ve 37 °C’de yaklaşık olarak 18 saat boyunca inkübe edilmiştir. Agara ilave edilen X-gal sayesinde, mavi/beyaz renk koloni oluşumuna göre geni taşıyan plazmidlerin seçilimi sağlanmıştır. Beyaz koloniler geni taşıyan plazmidleri içeren bakteriler olarak belirlenmiştir. Daha sonra plazmidler, kit protokolü Qiagen QIAprep Spin Miniprep Kiti (Kat no: 27104) kullanılarak beyaz ve büyük kolonilerden izole edilmiştir. Genleri doğrulamak için, izole edilmiş plazmidlerin sekanslama kütüphaneleri hazırlanmış ve Miseq platformu tarafından sekanslanmıştır. Şekil 2.2’de transformasyon işleminde kullanılan enzimler ve insan MT2A ve MT3 genleri gösterilmiştir. Şekil 2.3’te ise, pET-21 plazmidinin fiziki haritası gösterilmiştir (Addgene, 2022).



Şekil 2.2. Klonlamada kullanılan enzim ve genler: Restriksiyon endonükleaz enzimleri (a), Ligaz enzimi (b), MT2A ve MT3 insan genleri (c)

A590 nm 0,375'e ulaşana kadar büyütülmüştür. Kültür, iki adet 50 mL'lik erlene alınmış ve 10 dakika boyunca buz üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra, hücreler 10 dakika süreyle 4000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmış ve her pelet, buz üzerinde 5 mL sterilize edilmiş CaCl_2 (4mM) çözeltisi içerisinde yeniden süspanse edilmiştir. Hücreler, 5 dakika boyunca 2500 rpm'de santrifüjlenmiş ve süpernatant atılmıştır. Her pelet tekrar 2 mL buz üzerinde CaCl_2 (4mM) çözeltisi içinde yeniden süspanse edilmiştir. Santrifüjleme bir kez daha tekrarlanmıştır. Her pelet, 2 mL buz üzerinde, CaCl_2 (4mM) çözeltisi ile yeniden süspanse edilmiştir. Etkili bir transformasyon sağlamak için hücreler iki hafta boyunca $+4^\circ\text{C}$ 'de bekletilmiştir. Komponent *E. coli* Jm109 hücresine, gen taşıyan plazmid (ligasyon reaksiyon ürünleri) transforme edilmiştir. Steril 2 mL tüpe; 5 μL geni taşıyan plazmid ve 50 μL komponent *E. coli* Jm109 hücresi pipetlenmiş ve 30 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra hücreler, 42°C 'de 45 saniye şoklanmıştır. 200 μL LB sıvı besiyerine bu karışım alınmıştır. Hücreler 37°C 'de 45 dakika inkübe edildikten sonra hücreler, hızlı bir şekilde buz içeren erlene alınmış ve tüplere, ampisilin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), X-gal (mavi/beyaz koloni oluşumu için) (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ve IPTG (hücre büyümesi için 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) içeren LB sıvı besiyerinden eklenmiştir. Plakalar bir gece 37°C 'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, beyaz ve büyük koloniler (gen taşıyan rekombinant hücreler) seçilmiş ve 200 μL LB içeren steril tüplere alınmıştır. Bu kültür, %50 gliserol içeren steril tüplere alınmıştır. Bu hücreler gliserol stok ve plazmid izolasyonu yapmak için kullanılmıştır. Seçilen koloniler, klonlamanın doğrulanması için spesifik primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. Şekil 2.4'te ısı şoku metodu ile *E. coli* Jm109'a yapılan gen transformasyonuna ait görseller verilmiştir.



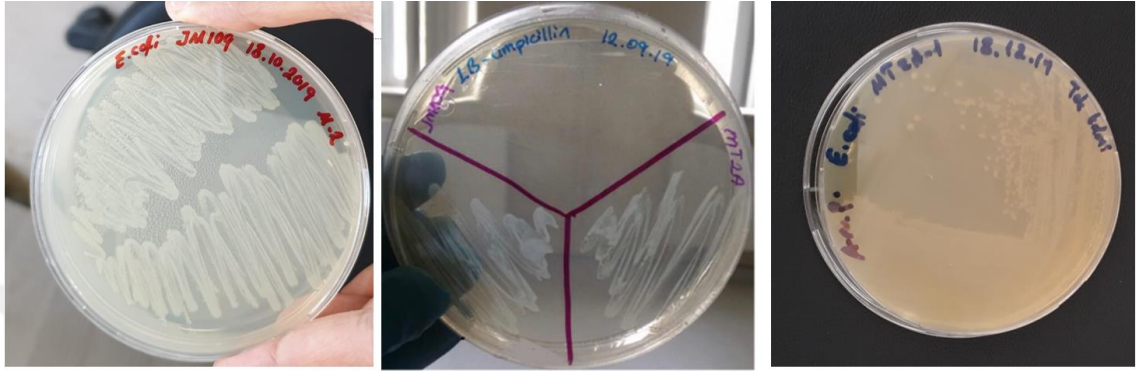
Şekil 2.4. Rekombinant plazmid (a), Isı şoku ile gen aktarımı için sıcaklığın 42°C 'ye ayarlanması (b-c)

2.2.1.3. Seçilen Kolonilerden Plazmid İzolasyonu

Plazmidler, Qiagen QIAprep Spin Miniprep Kiti (Kat no: 27104) protokolüne göre izole edilmiştir. Aşağıda plazmid DNA izolasyonunda kullanılan protokole yer verilmiştir (Özsait Selçuk, 2010).

1. 2 mL'lik bakteri kültürü, 14.000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
2. Süpernatant atıldı. Tüp ters çevrildi ve fazla ortamı uzaklaştırmak için bir kağıt havlu ile kurutulmuştur.
3. Toplanan pellete, kit içeriğinde bulunan 250 µL Tampon P1 (RNaz eklendi) eklenmiş ve görünür hücre kümeleri kaybolana kadar vortekslenmiştir.
4. Tüpe, 250 µL Tampon P2 eklenmiştir. Daha sonra tüp içeriği yavaşça dört kez ters-düz edilerek karıştırılmış, oda sıcaklığında yaklaşık 5 dakika inkübe edilmiştir.
5. 350 µL N3 tamponu ilave edilmiş ve tüp 4 kez ters çevrilerek karıştırılmıştır.
6. Numune tüpleri, 10 dakika boyunca 14.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
7. Temizlenen lizat dikkatlice spin kolonlara yüklenmiştir.
8. Kolon, kullanımdan önce alkol eklenen PE tamponu (750 µL) ile yıkanmış ve 1 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
9. Alta süzülen sıvı bölüm atılmış ve 1 dakika 14.000 rpm'de ek bir santrifüj ile uzaklaştırılmıştır.
10. Kolon yeni bir 1,5 mL'lik steril tüpe alınmıştır. Kolona bağlanan DNA'yı elde etmek amacı ile elüsyon tamponu (50µL) membranın tam ortasına gelecek şekilde yüklenmiştir.
11. Yıkama tamponunu tamamen uzaklaştırmak için 1 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
12. Kolon düzeneği çıkarılmış ve plazmid DNA, -20 °C'de saklanmıştır. Tüm santrifüjler oda sıcaklığında uygulanmıştır.

13. Eklenen genleri doğrulamak için, izole edilmiş plazmidler için sekanslama kütüphaneleri hazırlanmış ve 2x150 PE okumaları olarak Illumina Miseq platformu kullanılarak sekanslanmıştır. Şekil 2.5'te rekombinant hücrelerin katı besiyerinde kültüre edildikten sonraki görüntüleri verilmiştir.



Şekil 2.5. MT2A ve MT3 genleri klonlanan hücrelerin petrideki koloni görünümü

2.3. Gece Kültürlerinin (Overnight) Hazırlanması

+4 °C'de muhafaza edilen yabancıl *E. coli* JM109 suşu steril şartlar altında öze ile alınarak Bölüm 2.1.2'de anlatıldığı gibi hazırlanan LB broth (30 mL/100mL) içeren erlenlere inoküle edilmiştir. Rekombinant suşlar (MT2A ve MT3), yabancıl suştan farklı olarak amfisilin antibiyotiği (100 µg/mL) ilave edilmiş LB broth (30 mL/100mL) içeren erlenlere inoküle edilmiştir. Yabancıl ve rekombinant suşlar 37 °C'de ve 120 rpm'de çalkalamalı olarak bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda bakterilerin yoğunluğu OD:0,5'e ayarlanmıştır. MİK deneylerinde ve kalıntı analizlerinde bu kültürler kullanılmıştır. Şekil 2.6'da overnight kültür ve gliserol stokların hazırlanması ile ilgili görüntüler gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Overnight kültürlerin (a) ve gliserol stokların (b) hazırlanması

2.3.1. Bakteri Stoklarının Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan bakterilerin uzun süreli stokları steril %50 gliserol (v/v) (500 μ L) içeren eppendorf tüplerine, Bölüm 2.3.1’de anlatıldığı gibi hazırlanan overnight yabancıl ve rekombinant kültürlerden 500 μ L alınarak tüpe transfer edilmesi ile hazırlanmıştır ve -80 °C’de muhafaza edilmiştir. Gliserol stoklar altı ayda bir yenilenmiştir. Ancak çalışmalarımızda kullanılan *E. coli* Jm109 ve rekombinant MT2A ve MT3 bakterileri, Bölüm 2.1.2’ de anlatıldığı gibi hazırlanan LB agar içeren petrilere taze olarak üretilmiştir ve +4 °C’de muhafaza edilmiştir. Kültürleri korumak amacıyla 20 günde bir pasajlamaları yapılarak kültürlerin taze kalması sağlanmıştır. Deneyler boyunca taze stok kültürler kullanılmıştır.

2. 4. Metal Giderim Tayini

2. 4. 1. Metallerin Sulu Çözeltilerinin Hazırlanması

Cr ve Pb metallerinin 5000 mg/L derişimlerinde ana stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltiler, ağır metal bileşiklerinin tuz formlarının kimyasal formülleri dikkate alınarak hesaplamalar yapılmış, Bölüm 2.1.5’te anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Deneyde kullanılan ara metal konsantrasyonları, bu ana stok çözeltilerinin seyreltilerek kullanılmıştır.

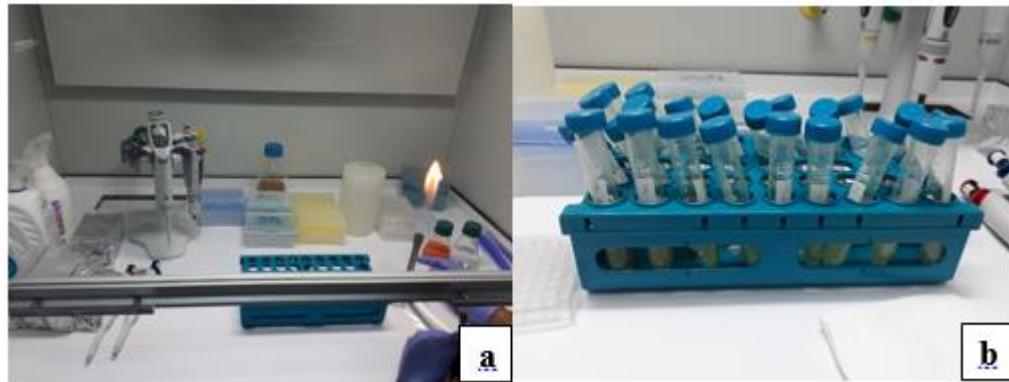
2.4.2. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK)

MİK; bir mikroorganizmanın üremesini durduran, en az düzeyde engelleyen metal konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. Mikroorganizmaların %90’ını inhibe eden

konsantrasyon da denir (Schwarz vd., 2010). Bölüm 2.3.1 başlığında anlatıldığı gibi overnight kültürler her üç bakteri türü için hazırlanmıştır.

Yapılan ön denemeler sonucunda, Cr metal iyonu için belirlenen konsantrasyon aralığı; 22,5-34-51-76-114-125-138-152-167-183-202 mg/L iken, Pb metal iyonu için belirlenen konsantrasyon aralığı; 50-100-200-400-600-800-1000-1250-1500-1750-2000 mg/L'dir.

Yabanıl *E. coli* Jm109 ve rekombinant (MT2A ve MT3) suşlarının MİK'lerini belirlemek için, belirlenen konsantrasyonlara göre hazırlanan metal çözeltileri, steril 15 mL'lik falkonlarda steril şartlarda hazırlanmıştır. Şekil 2.7'de ana stok metal çözeltilerinden ara stokların hazırlanışı gösterilmiştir.



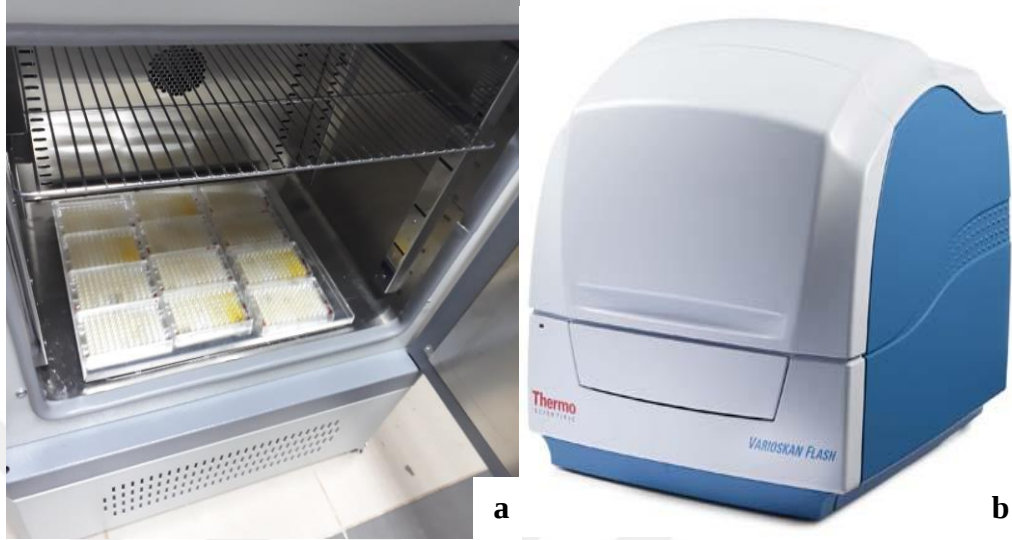
Şekil 2.7. Ağır metal konsantrasyonlarının hazırlanması: Stok çözeltilerinden seyreltme yapılması (a), Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan metal ara stokları (b)

MİK tayininde, üç farklı kontrol grubu kullanılmıştır. Bunlar;

- Blank çözeltisi: LB (sadece besiyeri içeren)
- Negatif kontrol: LB+metal çözelisi olarak hazırlanmıştır.
- Hücre kontrol: LB+ OD: 0,5'e ulaşmış bakteri hücresidir.

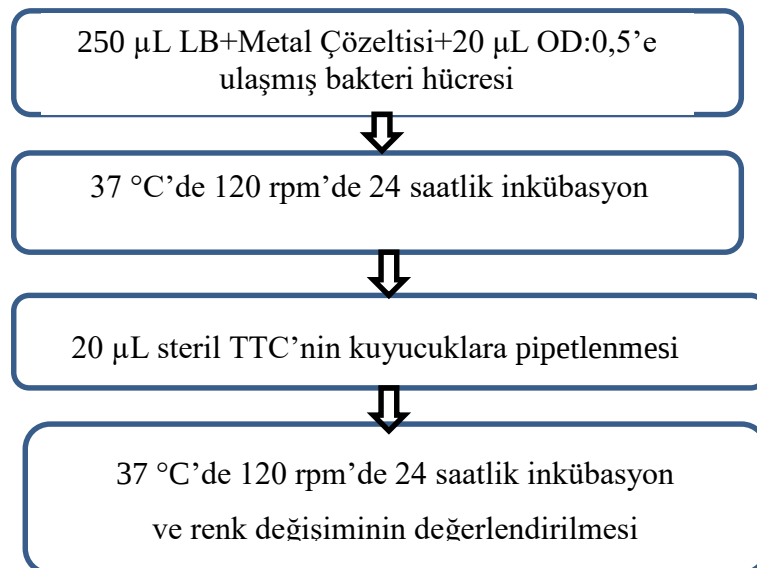
Mikroplaka okuyucu ile MİK tayininde, farklı konsantrasyonlardaki Cr ve Pb çözeltilerinden, mikro pipetle 250 μ L çekilerek 96 kuyucuklu mikroplaka (steril kapaklı flat-bottom 96 well plate) kuyucuklarına pipetlenmiştir. Daha sonra Cr ve Pb içeren kuyucuklara, 20 μ L OD₆₀₀: 0,5'e ulaşmış bakteri hücreleri pipetlenmiştir. Daha sonra plakalar, 37 °C'de 120 rpm'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 2.8 (a)). İnkübasyondan sonra, örneklerin biyokütle yoğunlukları 600 nm'de mikroplaka

okuyucuda (Thermo Scientific Varioskan Flash (Şekil 2.8 (b)) ölçülmüştür (Adam vd., 2014).



Şekil 2.8. MİK tayini: Çalkalamalı inkübatör (a), Mikroplaka okuyucu (b)

Metale maruz bırakılan hücrelerin biyokütle yoğunlukları ölçüldükten hemen sonra, filtreyle steril edilmiş %0,1'lik canlılık indikatörü olan steril TTC mikroplaka kuyucuklarına 20'er μL eklenmiştir ve 24 saat 120 rpm'de 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda mikrobiyal aktivite sonucu oluşan trifenil formazan kuyucuklara kırmızı renk verdiğiinden, rengin olmadığı en düşük konsantrasyon MİK olarak kaydedilmiştir (Ersoy Ömeroğlu, 2011). Deneyler, üç tekrarlı olarak yapılmıştır. MİK değerinin belirlenmesi için uygulanan işlem adımları aşağıda verilmiştir.



Şekil 2. 9’da 96 kuyucuklu mikrolaka dizaynı gösterilmiştir. Plakada, A satırı A2-A12 arası Cr ve Pb için kontrol grubudur. Bu kuyucuklarda sadece LB+ metal (Cr/Pb) çözeltisi bulunmaktadır. Her bir konsantrasyon için, üçerli tekrarlı olacak şekilde kuyucuklara pipetleme yapılmıştır.

	1 2 3	4 5 6	7 8 9	10 11 12								
A	A1:LB A2-A12 arasındaki kuyucuklarda Cr(VI)'lu besiyeri kontrol, küçük konsantrasyondan büyük konsantrasyona doğru birer kuyucuk											
B												
C	 20 mg/L Cr	 140 mg/L Cr	Metal kontrol									
D	 30 mg/L Cr	 150 mg/L Cr	Metal kontrol									
E	 50 mg/L Cr	 160 mg/L Cr	Metal kontrol									
F	 75 mg/L Cr	 180 mg/L Cr	Metal kontrol									
G	 100 mg/L Cr	 200 mg/L Cr	Metal kontrol									
H	 120 mg/L Cr	 LB+Hücre kontrol	Metal kontrol	 LB+Hücre kontrol								

Şekil 2.9. Cr MİK değerinin saptanması için kullanılan mikrolaka kuyucuk dizaynı

	1 2 3	4 5 6	7 8 9	10 11 12
A	A1:LB A2-A12 arasındaki kuyucuklarda Pb içeren besiyeri kontrol, düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru birer kuyucuk			
B				
C	 50 mg/L Pb	 1000 mg/L Pb	Metal kontrol	
D	 100 mg/L Pb	 1250 mg/L Pb	Metal kontrol	
E	 200 mg/L Pb	 1500 mg/L Pb	Metal kontrol	
F	 400 mg/L Pb	 1750 mg/L Pb	Metal kontrol	
G	 600 mg/L Pb	 2000 mg/L Pb	Metal kontrol	
H	 800 mg/L Pb	 LB+Hücre kontrol	Metal kontrol	 LB+Hücre kontrol

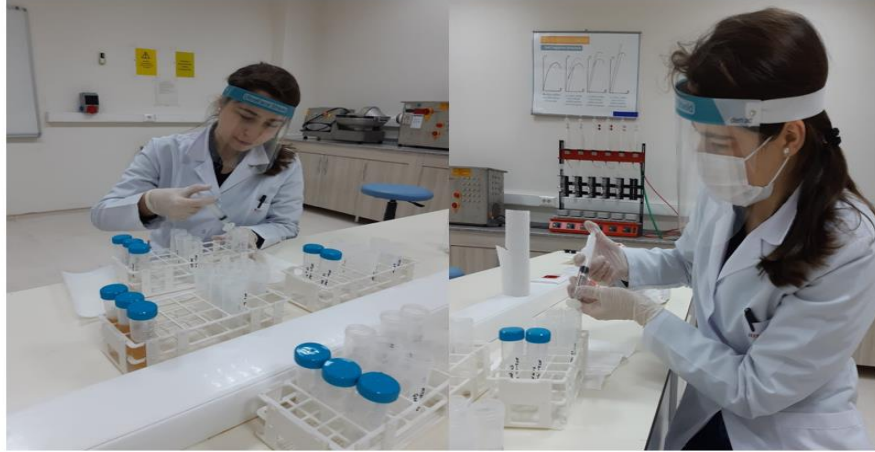
Şekil 2.10. Pb MİK değerinin saptanması için kullanılan mikrolaka kuyucuk dizaynı

2.5. Biyobirikim Deneyleri

Literatür araştırmaları sonucunda elde edilen bilgiler, SKKY’de belirtilen endüstrilerin Cr ve Pb deşarj limit değerleri ve bakterilerin Cr ve Pb için belirlenen MİK değerleri dikkate alınarak biyogiderim deneylerinde uygulanacak metal konsantrasyonları tespit edilmiştir. Bakterilere biyogiderim deneylerinde uygulanan Cr konsantrasyonları; 0,05-0,1-0,3-0,5-10-25-50 mg/L iken, Pb konsantrasyonları, 0,01-0,5-1-5-50-100 mg/L’dir. Kalıntı analizinde yabancı *E. coli* Jm109, MT2A ve MT3 gece kültürleri Bölüm 2.2.1’de anlatıldığı şekilde hazırlandı. Overnight kültürler, OD₆₀₀: 0,5 yoğunluğa geldikten sonra, 50 mL LB sıvı besiyeri içeren 100 mL’lik erlenlere 170’er µL kültürler aşılanmıştır. Daha sonra her bir erlenin Cr konsantrasyonları 0,05-0,1-0,3-0,5-10-25-50 mg/L olacak şekilde hazırlanmıştır. Pb konsantrasyonları ise 0,01-0,5-1-5-50-100 mg/L olarak ayarlanmıştır. Erlenler, 37 °C’de 150 rpm çalkalanarak 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bakterilerin Cr ve Pb alma kapasitelerini belirlemek için 24 saatlik inkübasyondan sonra erlenlerden örnek alınarak ICP-MS cihazında ölçülmüştür. Deneyler üç paralelli olarak gerçekleştirilmiştir. Besiyerinde kalan metal miktarı, hücre yüzeyinde tutulan metal miktarı ve hücre içine alınan metal miktarı olmak üzere her bir numune için 3 farklı ICP-MS kalıntı analizi yapılarak hem Cr hem de Pb konsantrasyonları ayrı ayrı tespit edilmiştir (Shamim vd., 2014).

2.5.1. Besiyerinde Birikim

Besiyeri ortamında kalan metal miktarının tespiti için, metal uygulanan hücrelerden 24 saat sonunda örnekler alınmıştır. Vortekslenerek homojen hale getirilen örnekler, steril bir tüpe aktarılarak +4 °C’de 10000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Çöken pellet bir sonraki deney için +4 °C’de muhafaza edilmiştir. Üstte kalan süpernatant, 0,45 mikrometre (µm) por çapına sahip filtreden süzülerek filtrattaki ağır metal miktarı (Cr ve Pb) 1/100 oranında dilüsyon sonrasında ICP-MS ile tespit edilmiştir.



Şekil 2.11. Santrifüj sonrasında örneklerin şırınga filtreden süzülmesi

2.5.2. Hücre Yüzeyinde Birikim

Hücre dışındaki metal birikiminin belirlenmesinde; bir önceki aşamada santrifüj işlemi sonrasında çökelen pelletlerin üzerine, 10 mL 50 mM EDTA çözeltisi eklenerek 2500 devirde 3 dakika vortekslenmiştir. Bu şekilde hücre yüzeyine bağlanan metallerin desorbsiyonu sağlanmıştır. Pellet, bir saat EDTA ile oda sıcaklığında muamele edilerek metallere bağlanması sağlanmıştır. Daha sonra +4 °C’de 10000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet, hücre içinde metal birikimini tayin etmek için +4 °C’de saklanmıştır. Üstte kalan sıvı kısım, 0,45 µm por çapına sahip filtreden süzülerek filtrattaki ağır metal iyonu miktarı 1/100 oranında dilüsyon sonrasında ICP-MS’de tespit edilmiştir.



Şekil 2.12. Hücre yüzeyinde metal birikimi çalışmaları

2.5.3. Hücre İçinde Birikim

Hücre içine alınan metal birikiminin belirlenmesinde bir önceki aşamada santrifüj sonrasında dibe çöken pelletin üzerine 5 mL HNO₃/H₂O₂ (v/v %50 HNO₃- w/v %30 H₂O₂) asit çözeltisi ilave edilmiştir. Asit ilave edilen pellet, 2500 devirde 3 dakika vortekslenmiştir ve oda sıcaklığında bir gece muamele edilerek hücre içine giren metal iyonu miktarının tespit edilmesi sağlanmıştır. Daha sonra 10000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant, 0,45 µm por çapına sahip filtreden süzülerek filtrattaki metal miktarı 1/100 oranında dilüsyon sonrasında ICP-MS cihazında tespit edilmiştir. Ağır metal giderimi yüzde olarak aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır (Anusha vd., 2020).

$$\% \text{ Metal giderimi: } ((C_o - C_s) / C_o) * 100 \quad (9)$$

C_o: Başlangıç metal konsantrasyonu (mg/L)

C_s: Arıtma sonrasındaki metal konsantrasyonu (mg/L)

2.6. Difenilkarbazit Yöntemi ile Cr(VI) Tayini

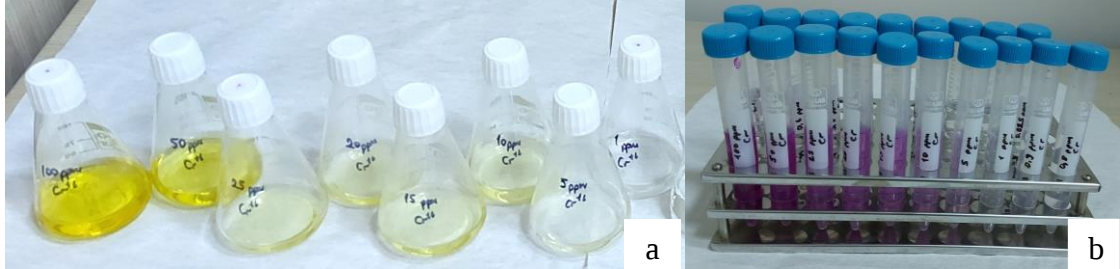
Cr(VI)'nın Cr(III)'e indirgenmesi spektrofotometrik olarak 1,5 difenilkarbazit metodu ile tayin edilmiştir (Thacker vd., 2006). Biyogiderim deneylerinde Cr giderimi için hazırlanan numunelerin süpernatant örnekleri +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Bu numuneler Cr(VI)'nın indirgenmesini yani giderimini tespit etmek için de bu deneyde kullanılmıştır. 200 µL süpernatant falkon tüpüne pipetlendikten sonra üzerine 330 µL 6M H₂SO₄ ilave edilmiştir. Bu karışıma, 400 µL difenilkarbazit eklenmiştir. Son hacim, 10 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan numuneler, menekşe moru rengi oluşana kadar oda sıcaklığında 5-10 dakika bekletildikten sonra ölçüm yapılmıştır (Şekil 2.13). Bilinen konsantrasyondaki standart Cr(VI) çözeltileri (0-50 mg/L) hazırlanmıştır. Bu numunelerden örnekler alınarak 540 nm dalga boyunda mikroparka cihazında okuma yapılmıştır. Elde edilen absorbans değerleri kaydedilerek kalibrasyon eğrisi çizilmiştir ve bu grafiğe göre numunelerdeki Cr(VI) miktarı hesaplanmıştır (Şekil 2.14).

Cr(VI) indirgenmesi yüzde olarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

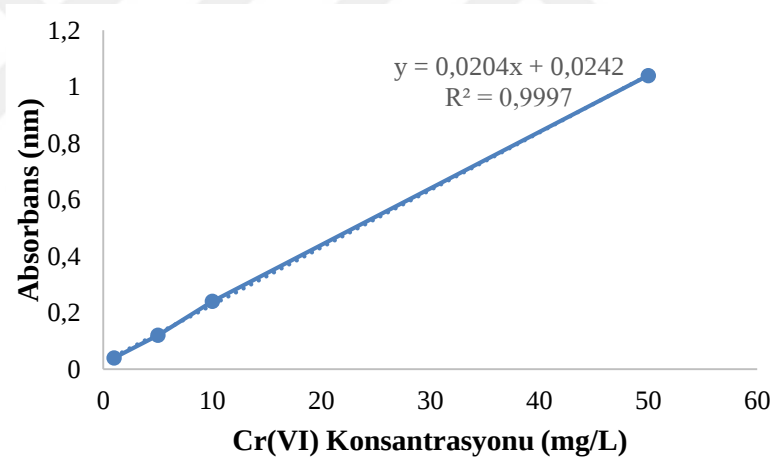
$$\% \text{ Cr(VI) indirgenmesi: } ((C_o - C_s) / C_o) * 100 \quad (10)$$

C_0 : Başlangıç Cr(VI) konsantrasyonu mg/L

C_s : Arıtma sonrası (indirgeme sonrası) Cr(VI) konsantrasyonu mg/L



Şekil 2.13. Difenilkarbazit metodu: Cr(VI) standart çözeltilerinin hazırlanması (a), Standart çözeltileri difenilkarbazit eklendikten sonraki menekşe moru renk oluşumu (b)



Şekil 2.14. Cr(VI) kalibrasyon eğrisi

2.7. Krom Kaplama Tesisi Atıksuyundan Cr ve Pb Biyogiderimi

Tez çalışması kapsamında, *E. coli* Jm109, MT2A ve MT3 suşlarının, gerçek atıksudan Cr ve Pb giderim kapasitelerini tayin etmek amacıyla, Kayseri Organize Sanayi Bölgesinde (KOSB) faaliyet gösteren dört farklı krom kaplama tesisinden atıksu örnekleri alınmıştır. KOSB’de çok sayıda krom kaplama endüstrisi bulunurken, sadece Pb endüstrisi olan bir tesis olmaması nedeniyle, hem Cr hem de Pb içeren krom kaplama endüstrilerinin atıksuları çalışmada tercih edilmiştir. Şekil 2.15’te dört farklı krom kaplama tesisinden alınan atıksu numuneleri gösterilmiştir.



Şekil 2.15. KOSB Krom kaplama tesisi atıksu numuneleri

Öncelikle bu atıksuların karakterizasyonları (pH, iletkenlik, AKM, KOİ, metal konsantrasyonları vb.) gerekli analizler yapılarak belirlenmiştir (Tablo 2.6). 4 tesisten alınan atıksular bakterilere uygulanmadan önce, membran manifold düzeneği kullanılarak süzölmüştür (Şekil 2.16). Atıksuların asidik pH'ya sahip olması nedeniyle (yaklaşık olarak 2), pH değeri bakterilere uygulanmadan önce NaOH ile 7'ye ayarlanmıştır. Daha sonra atıksular steril şartlar altında 0,22 µm por gözenekli steril şırınga filtreden geçirilerek steril edilmiştir ve deneyler tamamlanana kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

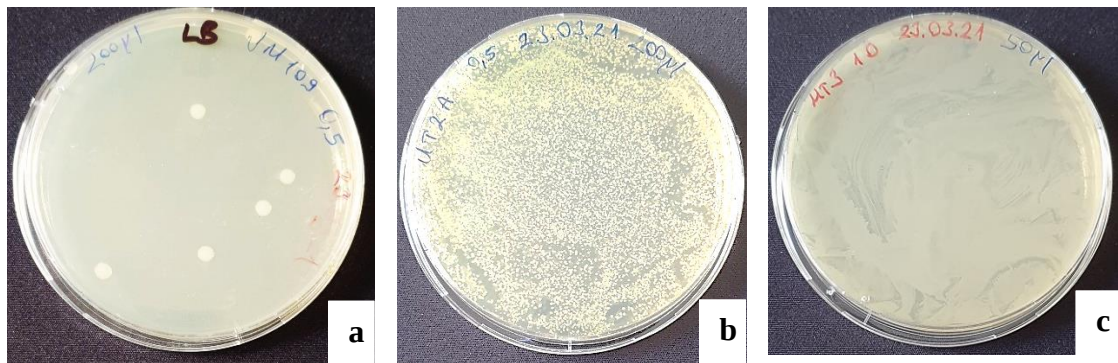


Şekil 2.16. Manifold düzeneği

Tablo 2.6. KOSB Krom kaplama tesislerinin atıksu karakterizasyonu

Elementler	Tesisler			
	1	2	3	4
pH	2,3	2,5	2,4	2,1
EC ($\mu\text{S/cm}$)	2780	1314	5990	3380
KOİ (mg/L)	608	223	1094	309
AKM (mg/L)	30	122	78,5	322
Al (mg/L)	0,41	0,45	1,72	1,8
Toplam Cr (mg/L)	222,4	22	146	2,31
Cr(VI) (mg/L)	0,12	0,4	0,10	0,08
Fe (mg/L)	3,3	59	59,1	80,4
Ni (mg/L)	93	0,31	0,10	8,14
Cu (mg/L)	23	0,13	0,57	1
Zn (mg/L)	208,3	20,34	1134	163
As (mg/L)	0,12	0,05	0,05	0,01
Cd (mg/L)	-	-	0,04	-
Hg (mg/L)	-	-	-	-
Pb (mg/L)	0,06	0,41	0	0,02

Steril edilen dört farklı atıksu, 3 bakteri türüne ayrı ayrı uygulanmıştır. Atıksular bakterilere uygulandıktan 24 saat sonra, hücreler LB agara ekilerek canlı koloniler tespit edilmiştir. Şekil 2.17’de bakterilere ikinci krom kaplama tesisi atıksuyu uygulandıktan 24 saat sonra koloni görünümü gösterilmiştir.



Şekil 2.17. İkinci krom kaplama tesisi atıksuyunun hücrelere uygulandıktan 24 saat sonraki koloni görünümü: *E. coli* Jm109 (a), MT2A (b), MT3 (c)

Şekil 2.17'ye bakıldığında, üç bakteri kültürünün ikinci krom kaplama tesisi atıksuyunda büyüdüğü görülürken diğer tesislerin atıksularında istenilen şekilde koloni oluşumları gözlemlenmemiştir. Çalışmada bu tesisin atıksu karakterizasyonunun genel olarak krom kaplama tesisi atıksularını yansıtmaması ve diğer krom kaplama tesislerinin atıksularına kıyasla, daha yüksek konsantrasyonda Pb içermesi nedeniyle kullanılmıştır.

2.7.1. Krom Kaplama Tesisi Atıksuyunun Biyolojik Arıtımı

Overnight *E. coli* Jm109, MT2A ve MT3 kültürleri, OD 600:0, 5 yoğunluğa ulaştıktan sonra, 50 mL krom kaplama tesisi atıksuyunu içeren 100 mL'lik erlenlere 200'er µl inoküle edilmiş ve 37 °C'de, 120 rpm çalkalamalı olarak 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kültürlerden örnekler alınarak 6000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant, 0,45 µm gözenekli şırınga filtreden geçirildikten sonra numunelerdeki metal kalıntısı ICP-MS cihazı ile tayin edilmiştir. Hücrelerin Cr ve Pb giderim kapasitesini tespit etmek için santrifüj sonrasında çöken pellet üzerine EDTA (5 ml) eklenerek 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Örnekler, 0,45 µm gözenek çapındaki filtreden geçirildikten sonra örneklerdeki Cr ve Pb kalıntısı ICP-MS ile ölçülmüştür. Bu deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

2.8. Biyosorpsiyon Deneyleri

Biyosorpsiyon deneyleri, toplam Cr gideriminde ve Cr(VI) indirgenmesinde en etkili tür olan MT2A ve Pb gideriminde en etkili tür olan MT3 için yapılmıştır. Ölü MT2A ve MT3 bakteri biyokütlelerini hazırlamak için hücreler 500 mL'lik erlenlerde 100 µg/mL amfisilin içeren LB besiyerinde (24 saat, 37 °C ve 150 rpm) kültürlenmiştir. Ardından, üstel büyüme fazına kadar büyütülen hücreler 6000 rpm'de 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Dipte kalan pellet birkaç defa saf su ile yıkanmış, daha sonra pelletlere 0,1 M HCl 1 saat boyunca uygulanmıştır. Pellet, 80 °C'de 24 saat etüvde kurutularak ölü biyokütle elde edilmiştir (Srinath vd., 2002). Kurutulan biyokütle, havanda toz haline getirilerek elekten geçirilmiştir. Hazırlanan biyosorbentler, farklı konsantrasyonlarda Cr (50-100-150-200-225-250 mg/L) ve Pb (50-100-150-200 mg/L) içeren 100 mL'lik çözeltilere ilave edilmiştir. Bu karışımlar, 25 °C'de 2 saat boyunca 150 rpm'de çalkalanmıştır. Deneyler 3 paralelli olarak yapılmıştır. Ortamdan belirli zaman aralıklarında numuneler alınarak 6000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra şırınga filtreden süzölmüştür. Örneklerdeki Cr ve Pb miktarları ICP-MS ile ölçülmüştür. Yüzde Cr ve Pb giderim

oranları, başlık 2.5.3'te verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır. Kuru hücre başına tutulan Cr ve Pb miktarları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$q_e = ((C_o - C_s) * V) / m \quad (11)$$

q_e : Denge anında adsorbe edilen metal miktarı (mg metal/g kuru biyokütle)

C_o : Başlangıç metal konsantrasyonu (mg/L)

C_s : Arıtma sonrası metal konsantrasyonu (mg/L)

V : Çözelti hacmi (L)

M : Kuru hücre ağırlığı (g).

2.9. Desorpsiyon ve Yeniden Kullanım Prosedürü

Biyosorpsiyondan sonra, biyokütlelerdeki Cr ve Pb'yi uzaklaştırmak ve biyokütlenin tekrar kullanımını sağlamak için desorpsiyon işlemi yapılmıştır. Her biyosorpsiyon deneyinden sonra biyokütleler santrifüj edilerek alınmış ve saf su ile 3 kere yıkanmıştır. Desorpsiyon için biyokütlelere 1 saat boyunca 0,1 M HCl çözeltisi uygulanarak rejenere edilmiştir. İnkübasyondan sonra reaksiyon karışımı santrifüj edilmiş ve süpernatanttaki metal miktarı ICP-MS ile tayin edilmiştir. Ayrıca desorbe edilmiş bakteri kütlelerini içeren pelet, saf su ile yıkanarak 60 °C'de 24 saat boyunca kurutulmuştur. Elde edilen biyokütlenin, metal giderim verimliliğini değerlendirmek için adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü 5 defa tekrarlanmıştır. Aşağıdaki formül kullanılarak desorpsiyon oranı hesaplanmıştır (Kahraman, 2012).

$$\text{Desorpsiyon oranı} = A / B * 100 \quad (12)$$

A: Desorbe olan metal miktarı

B: Biyosorbent üzerinde tutulan metal miktarı

2.10. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) ve Taramalı Geçirimli Elektron Mikroskobu (STEM) Analizleri

OD 600: 0,5 yoğunluğa ulaşan *E. coli* Jm109, MT2A ve MT3 hücreleri, metal içermeyen ve metal içeren 50 mL LB sıvı besiyerine %1 oranda ekilerek 120 rpm, 37 °C'de 24 saat

inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, besiyerlerinden alınan örnekler 4500 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında üst faz atılarak elde edilen pellet, fosfat tamponu ile (PBS) ile üç kez yıkanmıştır. Daha sonra pellet, 4 °C’de 4 saat boyunca %2,5 Glutaraldehit ile fikse edilmiştir. Bu süre sonunda santrifüj yapılmıştır. Dibe çöken pellet tekrar PBS ile iki kere yıkandıktan sonra, osmium tetraoksit ile 2 saat boyunca fikse edilmiştir. Fiksasyondan sonra pellet santrifüj edilmiştir ve pellet artan alkol konsantrasyonlarında %15, 30, 60, 90 ve 100 (v/v) dehidre edilmiştir (Kumari vd., 2016; Sharma ve Shukla, 2021). Sabitlenen hücreler lam üzerine periferik yayılarak 2-3 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra, altın paladyum kaplama cihazı ile kaplanmıştır. Bakterilerin, Cr ve Pb’ye maruz kalması sonucunda hücre üzerindeki etkilerini ve hücre etkileşimleri Adıyaman Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı bünyesinde bulunan ZEISS & EVO marka LS 10 taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmiştir. Ayrıca çalışmada, enerji dağıtımli X-ışını analizörü (Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi, EDS) ile hücrelerin görüntüsü çekilerek o bölgelerdeki elementlerin dağılımları belirlenmiştir. STEM analizinde ise numuneler, SEM analizinde uygulanan prosedüre göre hazırlanmıştır. STEM görüntüleri sadece toplam Cr gideriminde ve Cr(VI) indirgenmesinde en etkili tür olan MT2A’nın kontrolü ve Cr uygulanan örnekleri için çekilmiştir. Pb gideriminde en yüksek kapasitede giderim yapan türün MT3 olması nedeniyle; bu türün kontrolü ve Pb uygulanan örneklerinin STEM görüntüleri alınmıştır. Numunelerin STEM görüntüleri, LEO 440 Computer Controlled Digital marka taramalı elektron mikroskobu ile Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinden hizmet alımı yapılarak çekilmiştir.

2.11. Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometre (FTIR) analizi

Bakteriler; proteinler, lipitler ve polisakkaritler gibi bileşenlerden oluşur ve ağır metallere maruz kaldıklarında, metalleri bağlamak için bağlanma bölgelerini geliştirirler (Anusha vd., 2020; Sharma ve Shukla, 2021). FTIR spektroskopisi, bakteri hücre duvarının kimyasal ve moleküler yapısındaki değişiklikleri gösteren bir analiz yöntemidir (Chatterjee vd., 2011). SEM ve STEM analizlerinde olduğu gibi Cr için MT2A ve Pb için MT3 türlerinin FTIR spektrum analizi yapılmıştır. Kontrol örneklerinde hücreler, LB sıvı besiyeri içeren 100 mL’lik erlenlere % 1 oranında inoküle edilmiştir. 25 mg/L Cr içeren LB sıvı besiyerine MT2A hücresi ekilerek hazırlanmıştır. Pb uygulanan örnek için ise, 100 mg/L Pb içeren LB sıvı besiyerine MT3 suşu inoküle edilmiştir. Kontrol ve metal

uygulanan örneklerin hepsi 150 rpm’de çalkalanarak 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra örnekler, 5000 rpm’de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Dibe çöken pelletler, PBS tamponu (0,1 M, pH: 7,2) ile iki kez yıkandıktan sonra liyofilize edilmiştir (Karthik vd., 2017). FTIR analizleri Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi bünyesinde bulunan FT-IR spektrometresinde (Perkin Elmer, 400 FT-IR/FT-FIR spektrofotometre spotlight 400) 400 cm⁻¹ ile 4000 cm⁻¹ dalga boyları arasında analiz edilmiştir.

2.12. Verilerin İstatistiksel Analizi

Deneyisel sonuçların istatistiksel analizi SPSS 22 kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki farklar, tek yönlü bir varyans analizi (ANOVA) ile test edilmiştir. Suşlar arasındaki farklılıkların önemi Student t testi ile belirlenmiştir. $p \leq 0.05$ ’teki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3. BÖLÜM

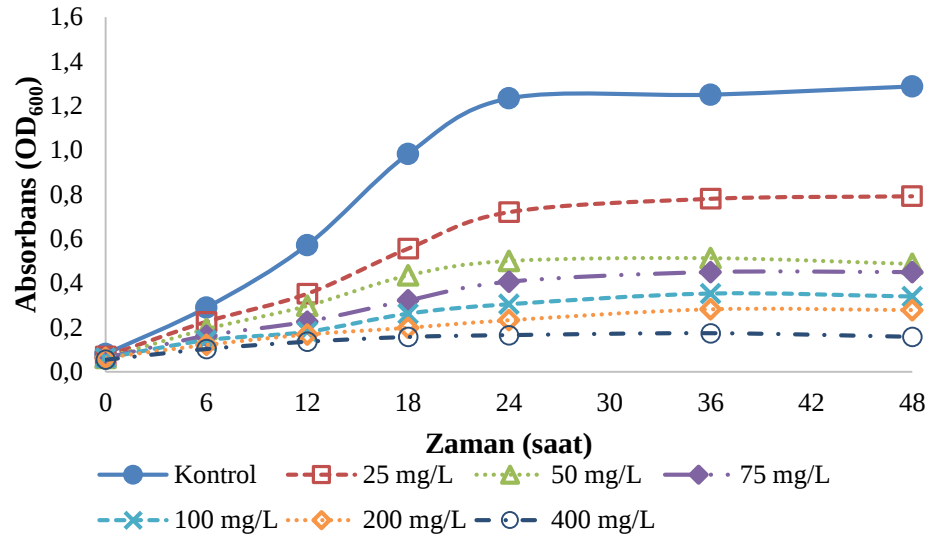
BULGULAR

Çalışmada toplam Cr, Cr(VI) ve Pb'nin sulu çözeltilerden ve krom kaplama tesisi atıksuyundan yabanıl *E. coli* Jm109 ve rekombinant MT2A ve MT3 suşları kullanılarak biyogiderimleri araştırılmıştır. Alt başlıklarda yapılan çalışmaların sonuçları detaylı olarak verilmiştir.

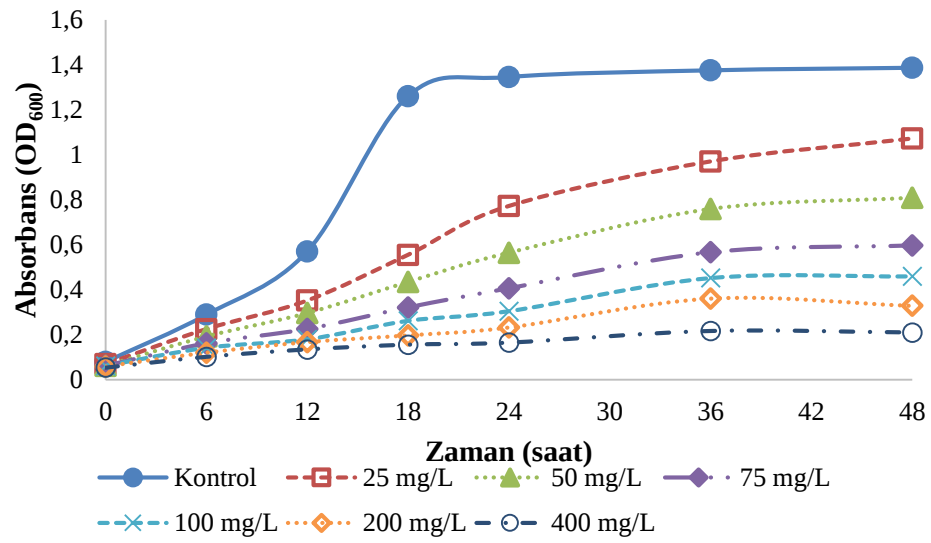
3.1. Hücrelerin Büyümesine Cr ve Pb'nin Etkisi

3.1.1. Hücrelerin Büyümesine Cr'nin Etkisi

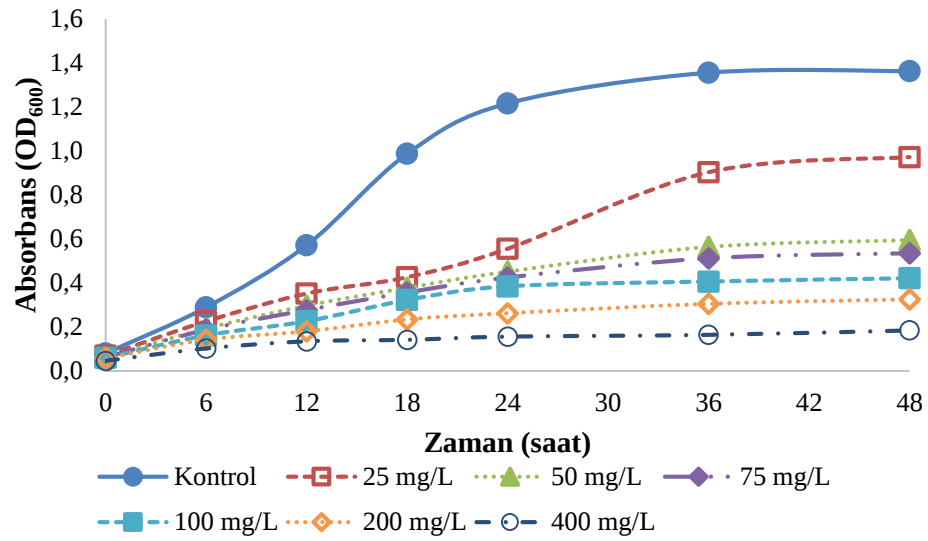
Cr'nin hücrelerin büyümesi üzerindeki etkilerini tespit etmek için farklı Cr konsantrasyonları (0-25-50-75-100-200-400 mg/L) hücrelere 24 saat boyunca uygulanmıştır. Erlenlerden belirli aralıklarda örnekler alınarak 600 nm dalga boyunda hücre yoğunlukları ölçülmüştür. Cr uygulanan tüm hücrelerin kontrol gruplarına (Cr uygulanmayan) kıyasla, hücre yoğunluklarında azalmalar olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.1- 3.3). *E. coli* Jm109, MT2A ve MT3 türlerinde 24. saate kadar büyümenin devam ettiği, 36. saatten sonra büyüme oranlarının azaldığı ve hücrelerin doyuma ulaştığı tespit edilmiştir. Artan Cr konsantrasyonları ile birlikte hücreler üzerindeki toksik etkinin arttığı ve buna bağlı olarak hücrelerin büyümesinde azalmalar olduğu görülmüştür. Cr'ye maruz bırakılan türler arasında hücre büyümesi büyükten küçüğe doğru şu şekilde sıralanabilir: MT2A, MT3, *E. coli* Jm109. Sonuç olarak, Cr'ye karşı en yüksek toleranslı suş MT2A iken, en hassas suş *E. coli* Jm109 olarak belirlenmiştir. Hücre büyümesindeki azalma miktarları, hücrelerin Cr MİK değerlerinin tespit edilmesinde dikkate alınmıştır.



Şekil 3.1. Farklı konsantrasyonlarda Cr uygulanan *E. coli* Jm109'un büyüme eğrisi



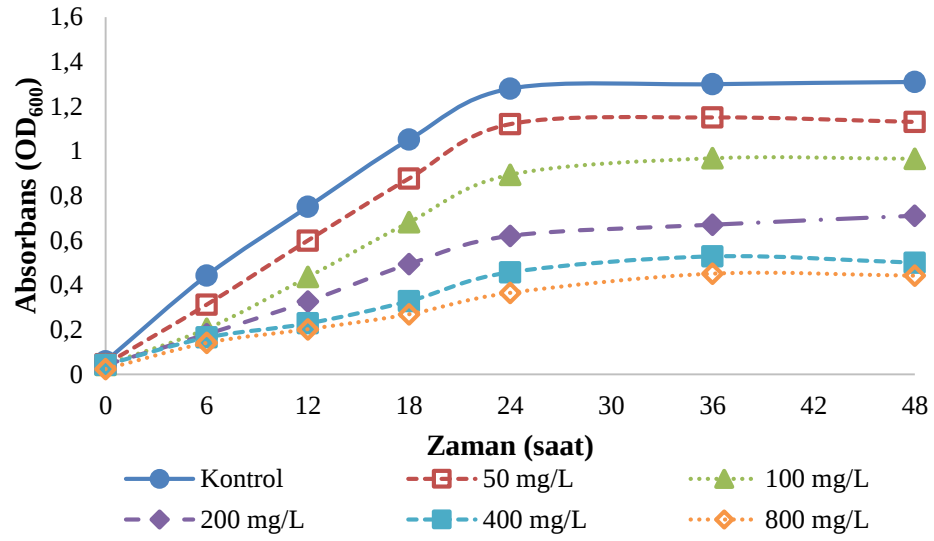
Şekil 3.2. Farklı konsantrasyonlarda Cr uygulanan MT2A'nın büyüme eğrisi



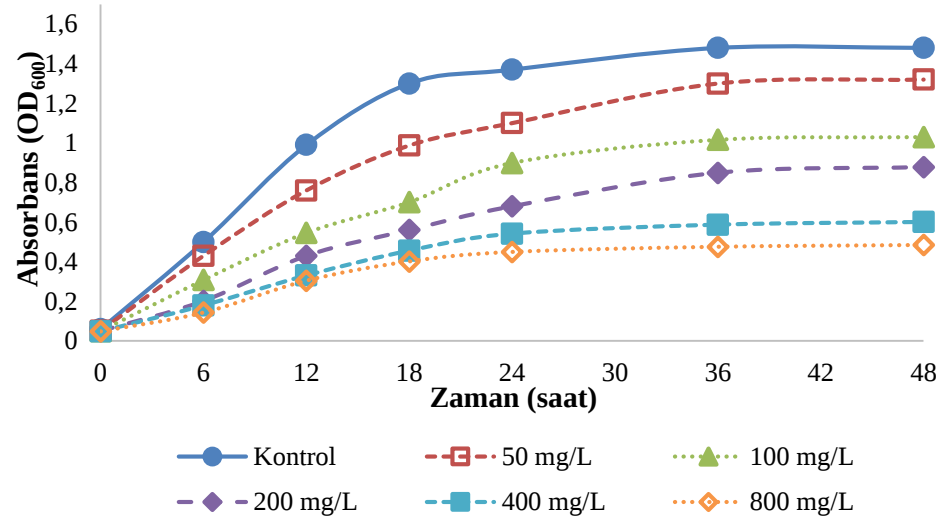
Şekil 3.3. Farklı konsantrasyonlarda Cr uygulanan MT3'ün büyüme eğrisi

3.1.2. Hücrelerin Büyümesine Pb'nin Etkisi

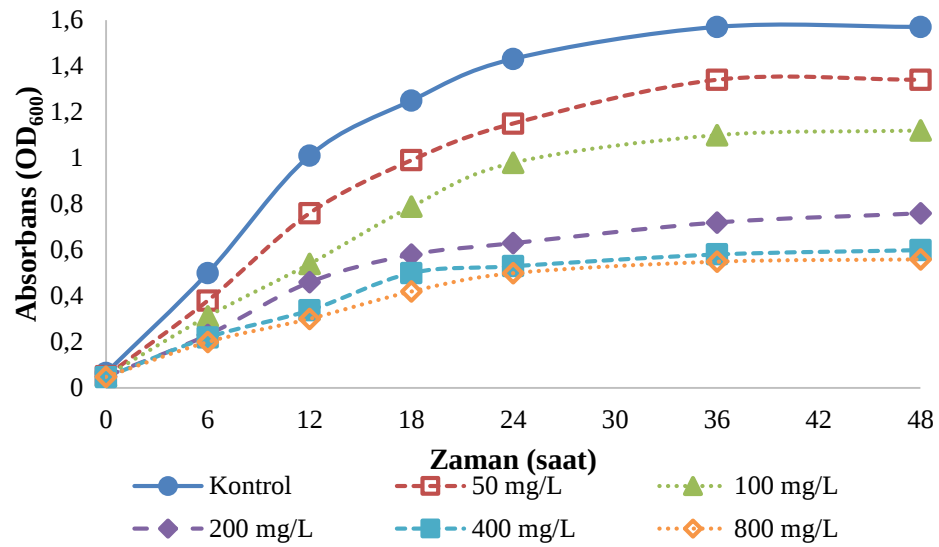
Pb'nin hücrelerin büyümesi üzerindeki etkilerini tespit etmek için farklı Pb konsantrasyonları (0-50-100-200-400-800 mg/L) hücrelere 24 saat boyunca uygulanmıştır. Belirli zaman aralıklarında erlenlerden örnekler alınarak 600 nm dalga boyundaki hücre yoğunlukları ölçülmüştür. Pb uygulanan tüm hücrelerin, kontrol gruplarına (Pb uygulanmayan) göre hücre yoğunluklarında azalmalar olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.4-3.6). Tüm bakteri türlerinde 24. saate kadar hücre yoğunluklarında artış olduğu *E. coli* Jm109'un 24. saatten itibaren neredeyse hiç büyümenin olmadığı, durağan faza girdiği gözlemlenmiştir. MT2A ve MT3 kontrol gruplarında maksimum hücre sayısına, 36. saatte ulaşılmıştır. Artan Pb konsantrasyonlarında tüm hücrelerin büyüme oranlarının azaldığı saptanmıştır. Özellikle 24 saat sonunda tüm hücrelerde büyüme oranında önemli bir artış olmadığı belirlenmiştir. Sonuç olarak Pb'nin, hücreleri strese sokarak büyümenin durağan faza ulaşmasını geciktirerek hücre büyümesini yavaşlattığı gözlemlenmiştir. Pb'ye karşı en hassas olan tür *E. coli* Jm109 iken, en dayanıklı olan tür MT3 olarak belirlenmiştir. Büyüme oranlarındaki azalma miktarı hücrelerin Pb MİK değerlerinin tespit edilmesinde dikkate alınmıştır.



Şekil 3.4. Farklı konsantrasyonlarda Pb uygulanan *E. coli* Jm109'un büyüme eğrisi



Şekil 3.5. Farklı konsantrasyonlarda Pb uygulanan MT2A'nın büyüme eğrisi



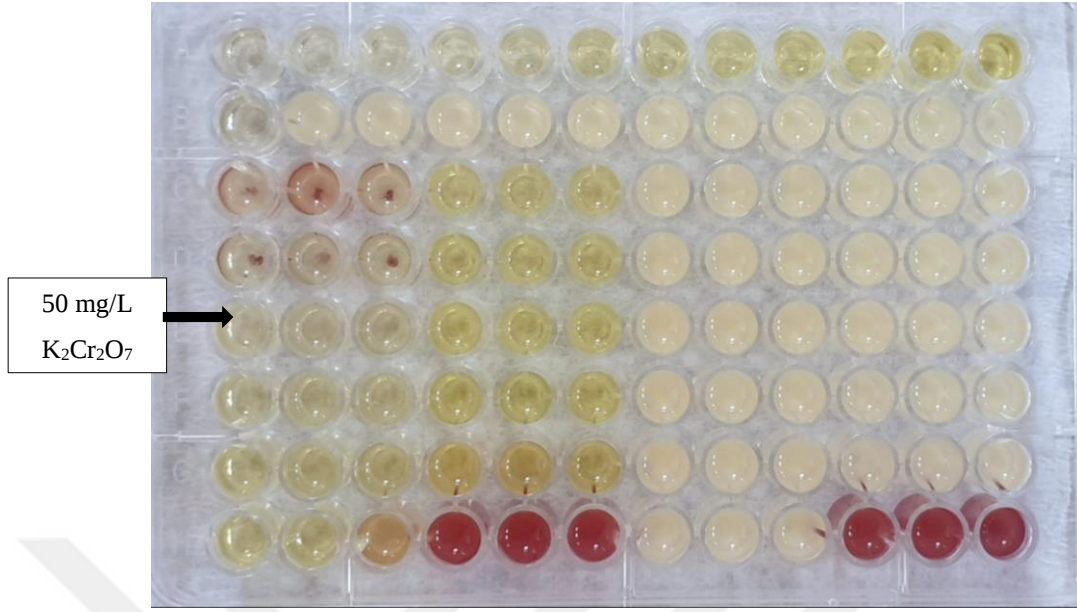
Şekil 3.6. Farklı konsantrasyonlarda Pb uygulanan MT3'ün büyüme eğrisi

3.1.3. Bakterilerin Cr ve Pb MİK Değerlerinin Belirlenmesi

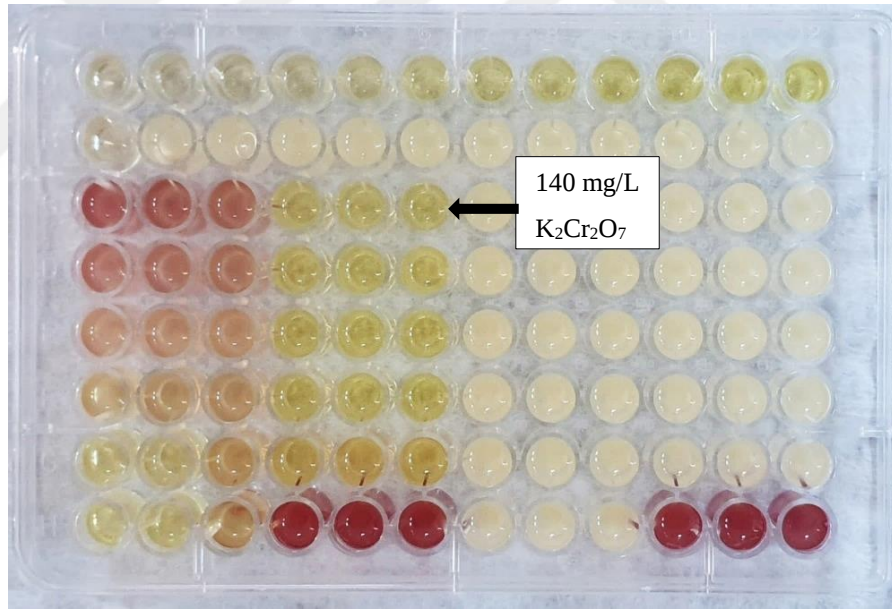
E. coli Jm109, MT2A ve MT3 suşlarına, farklı konsantrasyonlarda (0-20-30-50-75-100-120-140-150-160-180-200 mg/L) Cr içeren LB sıvı besiyeri 24 saat boyunca uygulanarak MİK değerleri saptanmıştır. Ayrıca hücelere, farklı Pb konsantrasyonlarını (0-50-100-200-400-600-800-1000-1250-1500-1750-2000 mg/L) içeren LB sıvı besiyeri 24 saat boyunca uygulanmıştır. MİK değerleri, metal uygulaması sonrasında hücre yoğunluğundaki değişim ve metal uygulaması sonrasında canlı hücrelerin varlığında renk değişimine dayanan TTC analizi sonuçlarına göre belirlenmiştir. TTC analizi sonunda canlı hücre bulunan mikropilaya kuyucuklarında renk kırmızıya dönerken, canlı hücrelerin olmadığı kuyucuklarda renk değişimi görülmemiştir. Rengin kaybolduğu ilk konsantrasyon MİK olarak belirlenmiştir. TTC analizi sonunda hücrelerin mikropilaya görüntüleri Şekil 3.7– 3.12’de gösterilmiştir. Yapılan deneyler sonunda, hücrelerin Cr MİK değerleri 50 mg/L ve üzerinde bulunurken, Pb MİK’leri 1000 mg/L ve üzerinde bulunmuştur. Tablo 3. 1’de hücrelerin MİK değerleri verilmiştir.

Tablo 3.1. Bakterilerin Cr ve Pb MİK değerleri

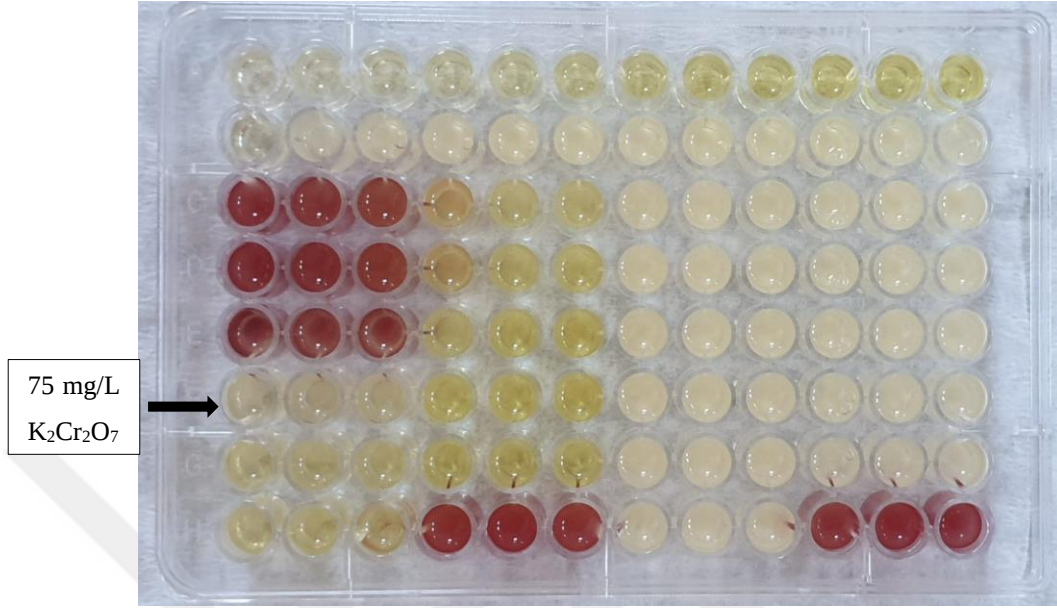
Bakteriler	Cr (mg/L)	Pb (mg/L)
<i>E. coli</i> Jm109	50	1000
MT2A	140	1750
MT3	75	2000



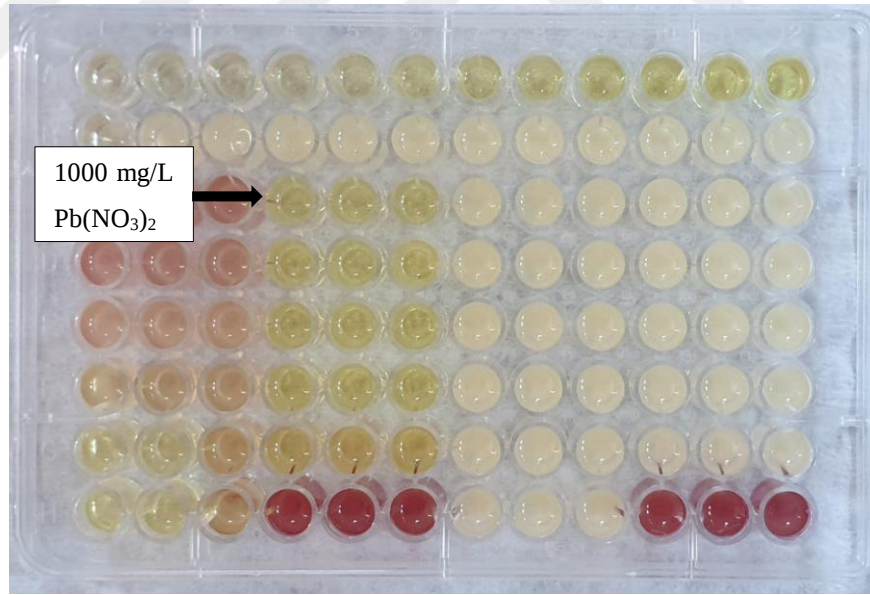
Şekil 3.7. Cr uygulanan *E. coli* Jm109 suşunun mikrolaka görüntüsü



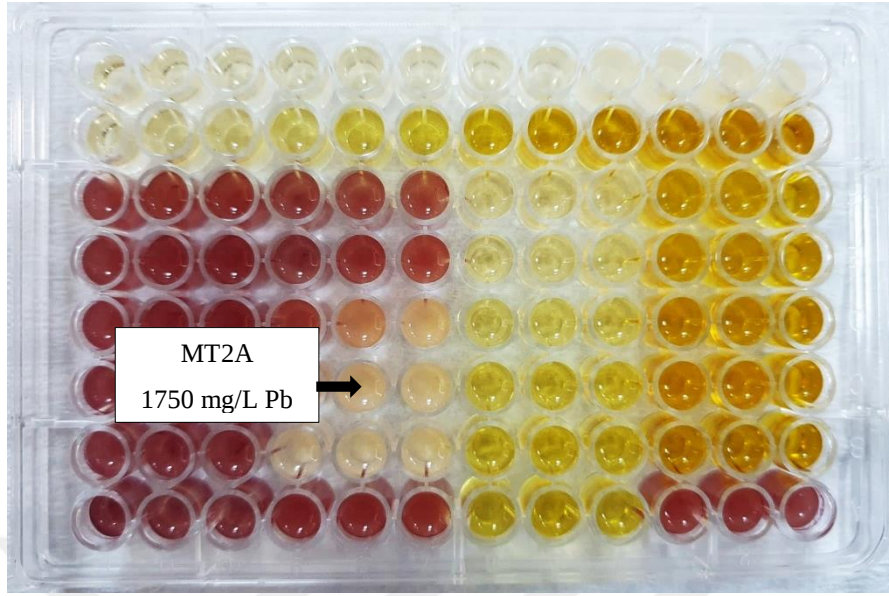
Şekil 3.8. Cr uygulanan MT2A suşunun mikrolaka görüntüsü



Şekil 3.9. Cr uygulanan MT3 suşunun mikrolaka görüntüsü



Şekil 3.10. Pb uygulanan *E. coli* Jm109 suşunun mikrolaka görüntüsü



Şekil 3.11. Pb uygulanan MT2A suşunun mikrolaka görüntüsü

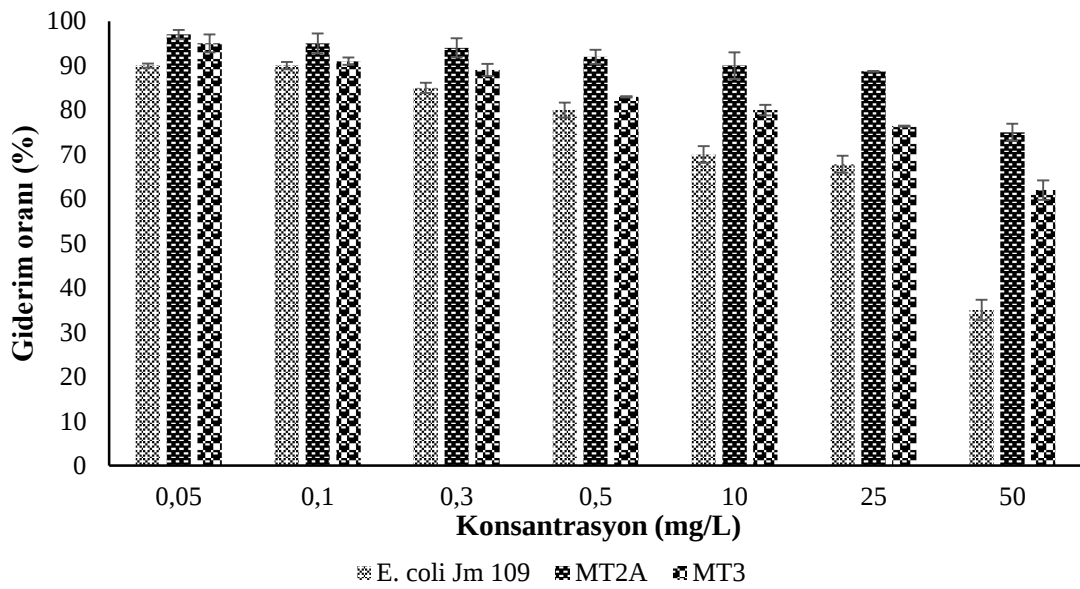


Şekil 3.12. Pb uygulanan MT3 suşunun mikrolaka görüntüsü

3.2. Biyogiderim Sonuçları

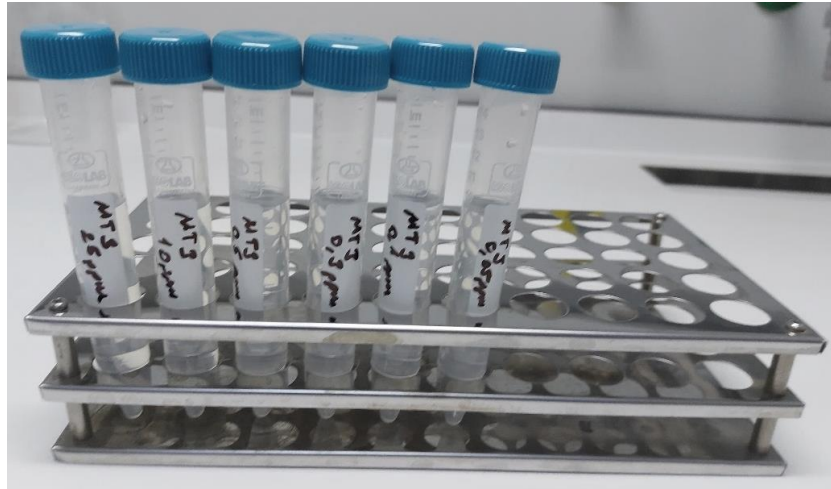
3.2.1. Hücrelerin Cr Biyogiderim ve Cr(VI) İndirgeme Oranları

Hücrelerin, sulu çözeltilerden toplam Cr giderim oranları Şekil 3.13'te gösterilmiştir. 0,05-0,1-0,3-0,5-10-25-50 mg/L konsantrasyonlarında Cr içeren LB sıvı besiyerinden *E. coli* Jm109'un toplam Cr giderim oranları sırasıyla %90, %90, %85, %80, %70, %68 ve %35'tir. Bu oranlar MT2A türü için; %97, %95, %94, %92, %90, %89 ve %75 iken, MT3 için %95, %91, %89, %83, %80, %76 ve %62 olarak bulunmuştur (Şekil 3. 13).



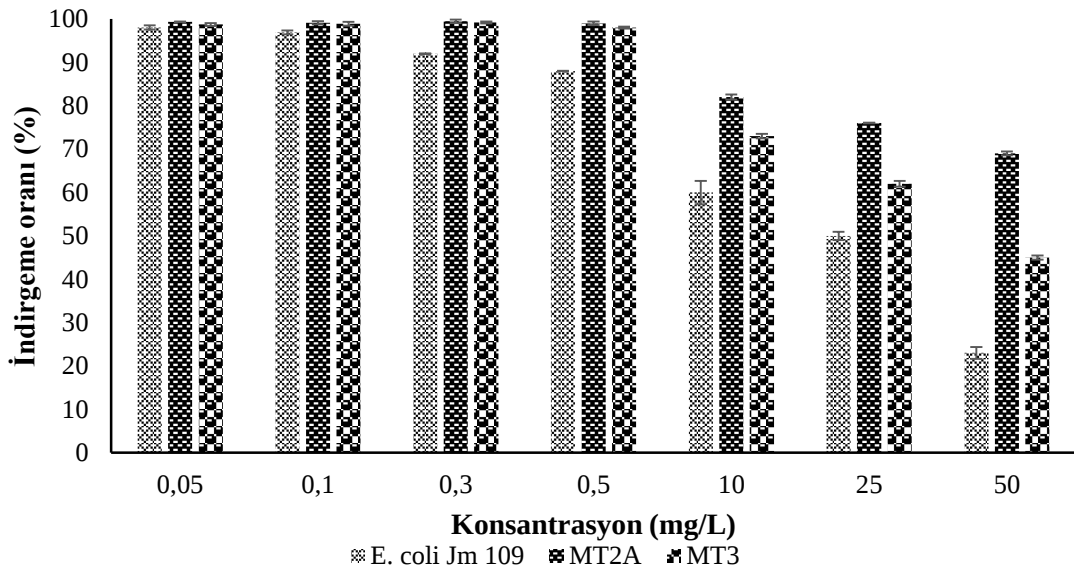
Şekil 3.13. Hücrelerin sulu çözeltilerden Cr giderim oranları

MT2A'nın 0,5 mg/L, 10 mg/L, 25 mg/L ve 50 mg/L konsantrasyonları için toplam Cr giderimleri oranları *E. coli* Jm109 suşu ile kıyaslandığında yaklaşık olarak 1,2; 1,3; 1,3 ve 2,2 kat daha fazla bulunmuştur. Bu Cr konsantrasyonları için MT3'ün *E. coli* Jm109 suşuna kıyasla 1; 1,2; 1 ve 1,7 kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Numunelerdeki Cr(VI) miktarını tespit etmek amacıyla, numunelere difenilkarbazit metoduyla tayin edilmiştir (Başlık 2.6'da anlatılan metot kullanılmıştır). Difenilkarbazit metodu uygulanan örneklerde, Cr(VI) varlığında menekşe moru renk oluşmaktadır. Numunelere bu analiz uygulandıktan sonra renk değişimi incelenmiştir (Şekil 3.14). Şekilde görüldüğü üzere özellikle düşük Cr(VI) konsantrasyonlarında, ortamda Cr(VI) varlığının göstergesi olan menekşe moru rengin oluşmadığı görülmüştür. Ancak daha yüksek Cr(VI) konsantrasyonundaki örneklerde çok açık pembe rengin oluştuğu tespit edilmiştir.



Şekil 3.14. Numunelere difenilkarbazit çözeltisi eklendikten sonraki renk oluşumu

Şekil 3.15'te hücrelerin Cr(VI) indirgeme oranları verilmiştir. Hücrelerin Cr(VI) indirgeme oranları ile Cr giderim oranlarının birbirine yakın olduğu tespit edilmiştir. Artan konsantrasyonlarında Cr(VI) (0,05-0,1-0,3-0,5-10-25-50 mg/L) içeren LB sıvı besiyerinden *E. coli* Jm109'un Cr(VI) indirgeme oranları sırasıyla %98, %97, %92, %88, %60, %50 ve %23'dür. Bu oranlar MT2A türü için %99, %99, %99, %99, %82, %76 ve %69 iken, MT3 için %99, %99, %99, %98, %73, %62 ve %45'dir (Şekil 3.15).



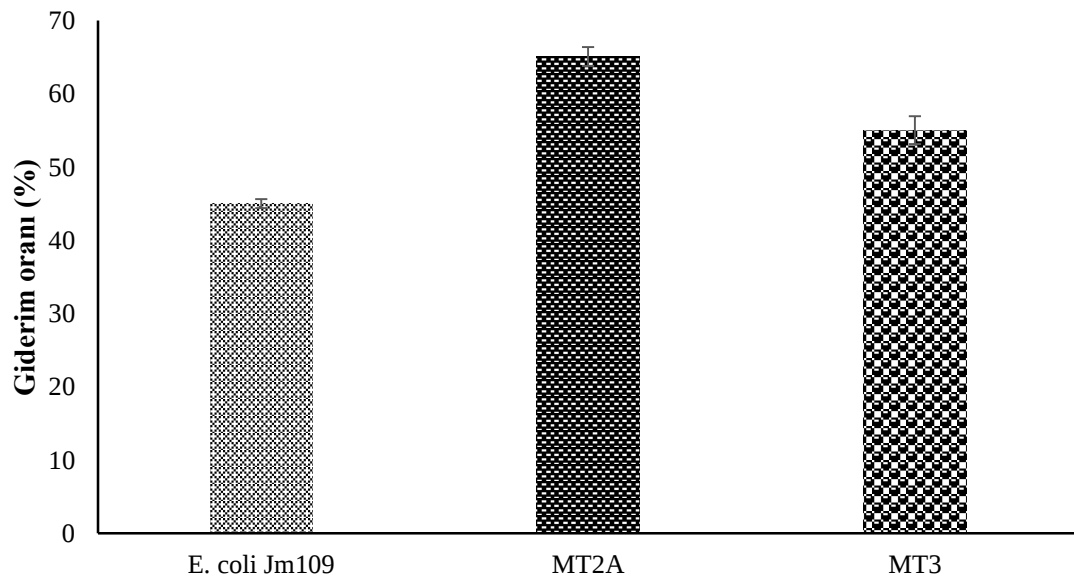
Şekil 3.15. Hücrelerin Sulu Çözeltilerden Cr(VI) İndirgeme Oranları

0,5 mg/L, 10 mg/L, 25 mg/L ve 50 mg/L Cr(VI) konsantrasyonları için MT2A'nın *E. coli* Jm109'a kıyasla, Cr(VI) indirgeme oranları 1,1; 1,4; 1,5 ve 3 kat daha yüksek iken, MT3

türünün 1,1; 1,2; 1,2 ve 1,9 kat daha yüksek olduğu bulunmuştur. Düşük Cr(VI) konsantrasyonlarında (0,05-0,1-0,5 mg/L) tüm türlerin, Cr(VI) indirgeme oranlarının birbirine çok yakın olduğu tespit edilmiştir. MT2A ve MT3 suşlarının 0,05-0,1-0,5 mg/L Cr(VI) konsantrasyonlarının neredeyse %100'ünü Cr(III)'e indirgediği gözlemlenmiştir. Ayrıca, MT2A ve MT3 rekombinantlarının, *E. coli* Jm109'a göre tüm Cr(VI) konsantrasyonları için Cr(VI) indirgeme oranları daha yüksek bulunmuştur. Cr konsantrasyonuna bağlı olarak tüm hücrelerde, toplam Cr giderim ve Cr(VI) indirgeme oranlarında azalmalar olduğu gözlemlenmiştir. Sonuçlardan anlaşıldığı üzere, hem toplam Cr gideriminde hem de Cr(VI) indirgenmesinde MT2A'nın diğer türlere kıyasla daha etkili olduğu saptanmıştır. Özellikle 10 mg/L Cr konsantrasyonundan itibaren, toplam Cr giderimi ve Cr(VI)'nin indirgenmesinde belirgin bir şekilde rekombinant MT2A ve MT3 suşlarının *E. coli* Jm109'a kıyasla daha yüksek kapasiteye sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.13-3.15). Ancak, Cr konsantrasyonunun artışına bağlı olarak hücrelerin toplam Cr giderim ve Cr(VI) indirgeme oranlarında azalmalar olduğu görülmüştür. Bu durum, artan Cr konsantrasyonları ile birlikte Cr'nin hücreler üzerinde toksik etkisinin artmasından kaynaklanmaktadır.

3.2.2. Hücrelerin Krom Kaplama Atıksuyundan Cr Biyogiderim Oranları

Hücrelerin krom kaplama tesisi atıksuyundan Cr giderim oranları Şekil 3.16'da verilmiştir.

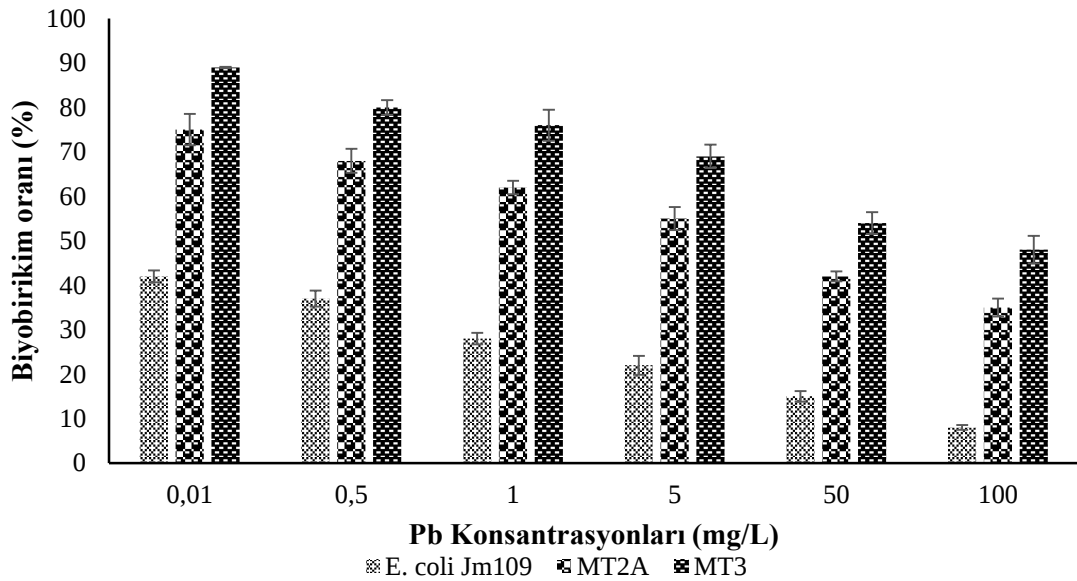


Şekil 3.16. Hücrelerin krom kaplama tesisi atıksuyundan Cr giderim oranları

Hücrelerin krom kaplama tesisi atıksuyundan Cr giderim oranları ile sulu çözeltilerden Cr giderim ve indirgenme oranlarının birbirine benzediği tespit edilmiştir. Krom kaplama tesisi atıksuyunu giderim oranları MT2A, MT3 ve *E. coli* Jm109 suşları için sırasıyla %65, %55 ve %45 olarak bulunmuştur.

3.2.3. Pb Biyogiderim Oranları

Hücrelerin, sulu çözeltilerden Pb giderim oranları Şekil 3.17’de gösterilmiştir. 0,01-0,5-1-5-50-100 mg/L konsantrasyonlarında Pb içeren LB sıvı besiyerinden *E. coli* Jm109’un Pb giderim oranlarının sırasıyla %42, %37, %28, %22, %15 ve %8 olduğu tespit edilmiştir. Bu oranlar MT2A türü için %75, %68, %62, %55, %42 ve %35 iken, MT3 için %89, %80, %76, %69, %54 ve %48 olarak bulunmuştur (Şekil 3.17). Hücrelerin, Pb’nin düşük konsantrasyonlarında (0,01-0,5-1 mg/L) giderim oranlarının yüksek Pb konsantrasyonlarına göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Pb’nin yüksek konsantrasyonlarında hücreler üzerindeki toksik etkisinin artması nedeniyle giderim oranlarının her üç bakteri türü için de azaldığı tespit edilmiştir. Sulu çözeltilerden Pb giderim oranı en yüksek olan suş MT3 olarak belirlenmiştir. Pb’nin tüm konsantrasyonları için giderim oranları büyükten küçüğe doğru şu şekilde sıralanabilir: MT3, MT2A, *E. coli* Jm109.

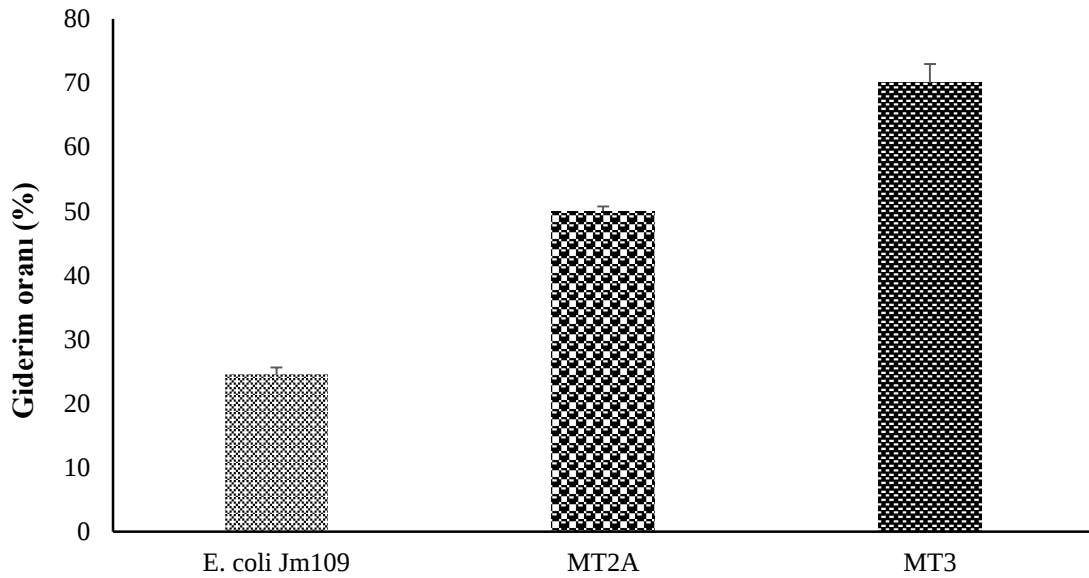


Şekil 3.17. Hücrelerin sulu çözeltilerden Pb giderim oranları

Hücrelerin en yüksek Pb konsantrasyonundaki (100 mg/L) Pb giderim oranları; MT3 > MT2A > *E. coli* Jm109 olarak sıralanabilir.

3.2.4. Hücrelerin Krom Kaplama Atıksuyundan Pb Biyogiderim Oranları

Hücrelerin, sulu çözeltilerden Pb giderim oranlarına benzer sonuçlar krom kaplama tesisi atıksuyundan Pb giderimi için de tespit edilmiştir. Şekil 3.18’de hücrelerin krom kaplama tesisi atıksuyundan Pb giderim oranları verilmiştir.



Şekil 3.18. Hücrelerin krom kaplama tesisi atıksuyundan Pb giderim oranları

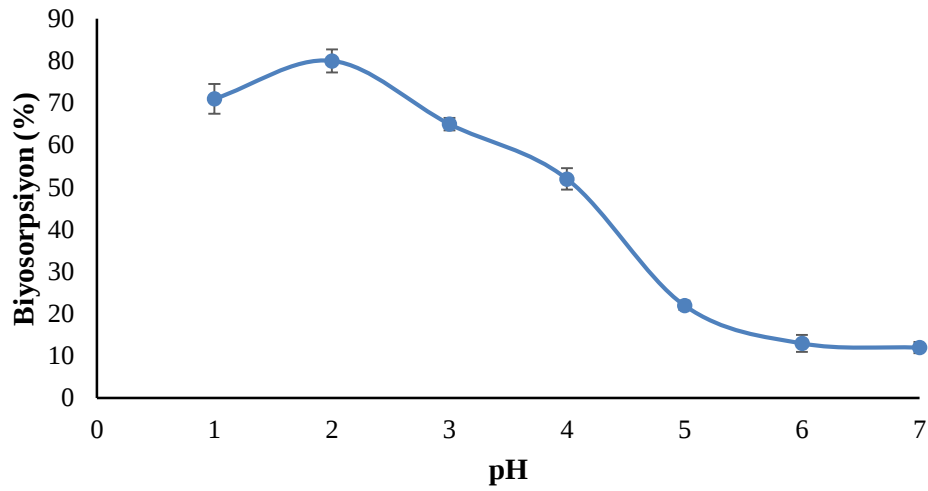
Hücrelerin krom kaplama tesisi atıksuyundan Pb giderim oranları MT3 türünde %70, MT2A türünde %50 ve *E. coli* Jm109’da %25 bulunmuştur.

3.3. Biyosorpsiyon Sonuçları

MT2A biyosorbentinin Cr biyosorpsiyon kapasitesi üzerine pH, sıcaklık, temas süresi, biyosorbent konsantrasyonu ve Cr konsantrasyonları gibi değişkenlerin etkisi araştırılmıştır. Deneyler 3 paralelli olarak yapılmıştır. Bu deneyler, literatür araştırmaları dikkate alınarak 100 ml hacimde, 100 mg/L Cr konsantrasyonunda ve 0,1 g biyosorbent kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. Cr Biyosorpsiyon Verimine pH'nın Etkisi

Cr biyosorpsiyonu üzerine pH'nın etkisini incelemek için farklı pH değerleri (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) derişik H_2SO_4 ve NaOH çözeltileri kullanılarak ayarlanmıştır. Deney 100 ml hacimde, 100 mg/L Cr başlangıç konsantrasyonunda, 25 °C'de ve 0,1 g biyosorbent kullanılarak 1 saat boyunca, 120 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. Cr'nin MT2A tarafından giderim verimine pH'nın etkisi Şekil 3.19'da verilmiştir.

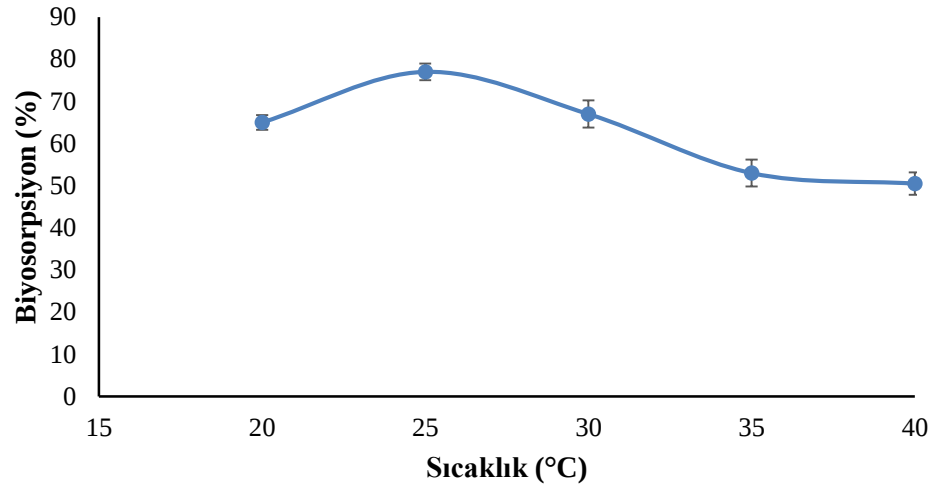


Şekil 3.19. MT2A biyosorbentinin pH'ya bağlı Cr biyosorpsiyonu

Şekil 3.19 incelendiğinde en yüksek Cr biyosorpsiyon kapasitesinin pH 2'de %80 oranında olduğu görülmüştür. Ancak artan pH ile bu oran yaklaşık olarak 8 kat azalmıştır. Özellikle pH 3'ten itibaren biyosorpsiyon oranlarının azalmaya başladığı, pH 5'ten itibaren ise biyosorpsiyonun sabit kaldığı gözlemlenmiştir. Metal iyonları ve fenolik hidroksil fonksiyonel grupları arasındaki koordinasyon bağları ve biyokütle yüzeyindeki diğer iyon değişebilen kısımlar hafif asidik çözeltide (pH 3-5) oldukça zayıf olduğundan, sorpsiyon kapasitesinin artan pH ile azalmasına neden olur (Argun vd., 2007).

3.3.2. Cr Biyosorpsiyon Verimine Sıcaklığın Etkisi

Cr biyosorpsiyonu üzerine sıcaklığın etkisini incelemek için deney farklı sıcaklıklar (20, 25, 30, 35, 40 °C) altında, 100 ml hacimde, 100 mg/L Cr başlangıç konsantrasyonunda, pH 2'de ve 0,1 g biyosorbent kullanılarak 1 saat boyunca, 120 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. Cr'nin MT2A tarafından giderim verimine sıcaklığın etkisinin sonuçları Şekil 3.20'de verilmiştir.

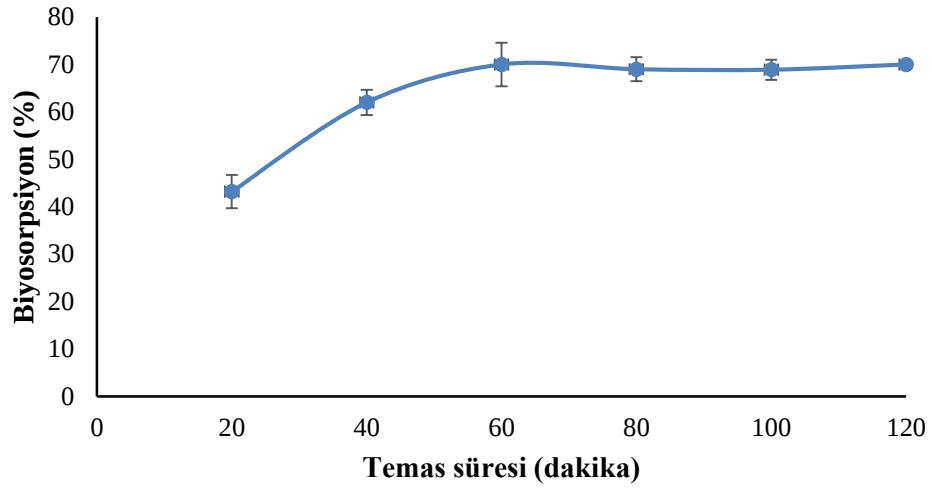


Şekil 3.20. MT2A biyosorbentinin sıcaklığa bağlı Cr biyosorpsiyonu

Şekil 3.20 incelendiğinde, biyosorpsiyon verimliliğinin 25 °C’de maksimum olduğu sıcaklık artışı ile birlikte azaldığı görülmüştür. Sıcaklığın 20 °C’den 25 °C’ye çıkarılmasıyla, biyosorpsiyon veriminin arttığı tespit edilmiştir. Cr biyosorpsiyon oranları 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C ve 40 °C için sırasıyla, %65, %77, %67, %53 ve %51 bulunmuştur. 25 °C’de Cr biyosorpsiyonu en yüksek seviyeye ulaşmıştır ve sıcaklık artışı ile birlikte giderim oranı giderek azalmıştır.

3.3.3. Cr Biyosorpsiyon Verimine Temas Süresinin Etkisi

Cr biyosorpsiyonu üzerine temas süresinin etkisini incelemek için deney farklı temas sürelerinde (20, 40, 60, 80, 100, 120 dakika), 100 ml hacimde, 100 mg/L Cr başlangıç konsantrasyonunda, pH 2’de, 25 °C’de ve 0,1 g biyosorbent kullanılarak 120 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. MT2A’nın Cr biyosorpsiyon verimine temas süresinin etkisinin sonuçları Şekil 3.21’ de verilmiştir.

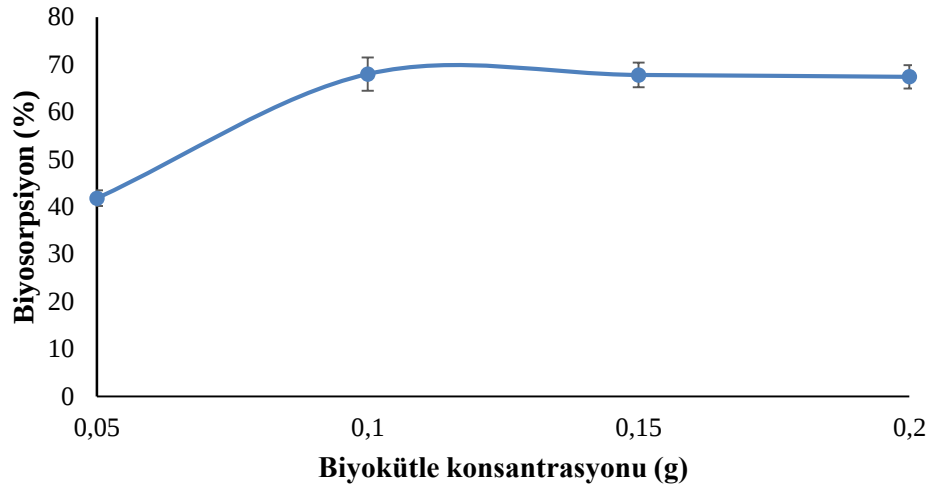


Şekil 3.21. MT2A biyosorbentinin zamana bağlı Cr biyosorpsiyonu

Cr biyosorpsiyonunun 40. dakikaya kadar lineer olarak arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.21). 60. dakikada maksimum biyosorpsiyon kapasitesine ulaşıldığı tespit edilmiştir. Zamanla MT2A'nın hücre yüzeyindeki fonksiyonel grupların Cr'yi bağlayarak doyuma ulaştığı ve 60. dakikadan sonra sabitlenerek dengeye ulaştığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.21). Daha uzun temas sürelerinde (80-100-120 dakika), Cr biyosorpsiyonun da kayda değer değişiklikler olmamıştır. Bu nedenle Cr biyosorpsiyonun da optimum temas süresi 60 dakika (%70) olarak belirlenmiştir.

3.3.4. Cr Biyosorpsiyon Verimine Biyosorbent Konsantrasyonunun Etkisi

Cr biyosorpsiyonu üzerine biyosorbent konsantrasyonunun etkisini incelemek için deney farklı biyosorbent konsantrasyonlarında (0,05, 0,1, 0,15, 0,2 g), 100 ml hacimde, 100 mg/L Cr başlangıç konsantrasyonunda, pH 2'de, 25 °C'de ve 120 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. Biyosorbent konsantrasyonunun Cr biyosorpsiyonu üzerindeki etkisi Şekil 3.22'de verilmiştir.

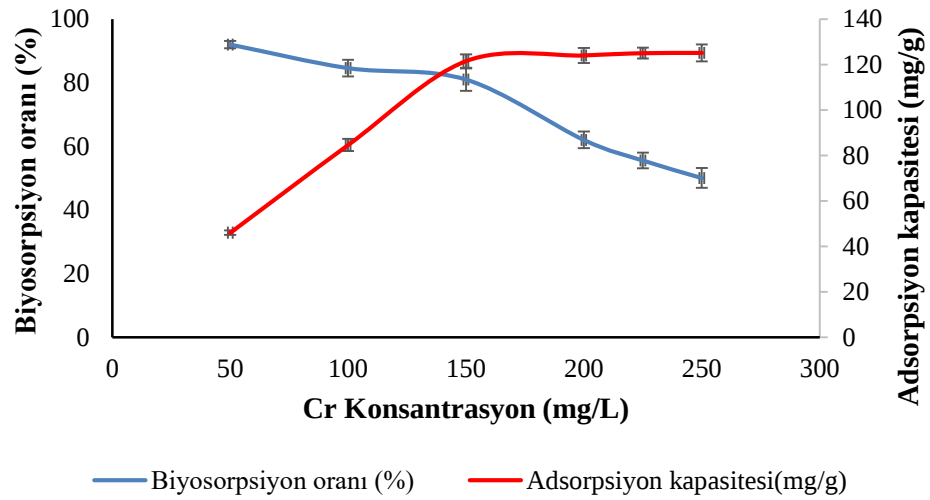


Şekil 3.22. MT2A biyosorbent konsantrasyonuna bağlı Cr biyosorpsiyonu

Cr biyosorpsiyon verimi, biyosorbent konsantrasyonunun 0,05 g'dan 0,1 g'a çıkarıldığında %42'den %68'e artmıştır. Biyosorbent konsantrasyonundaki bu artış, biyosorbentin yüzey alanını ve aktif bölgelerinin sayısını artırarak Cr'nin biyosorpsiyonunun artmasına neden olmuştur. Ancak 0,1 g'dan daha yüksek biyosorbent konsantrasyonlarında biyosorpsiyonun neredeyse hiç değişmediği görülmüştür (Şekil 3.22). Bu durum adsorpsiyonun denge eğiliminde olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, optimum MT2A biyosorbent konsantrasyonu 0,1 g olarak belirlenmiştir.

3.3.5. Cr Biyosorpsiyon Verimine Başlangıç Cr Konsantrasyonunun Etkisi

Cr biyosorpsiyonu üzerine başlangıç Cr konsantrasyonunun etkisini incelemek için deney, belirlenen 6 farklı Cr konsantrasyonunda (50, 100, 150, 200, 225, 250 mg/L), 0,1 g biyosorbent kullanılarak, pH 2'de, 25 °C'de ve 1 saat boyunca 120 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. Başlangıç Cr konsantrasyonunun, Cr biyosorpsiyonu ve adsorpsiyonu üzerindeki etkisi Şekil 3.23'te gösterilmiştir.



Şekil 3.23. MT2A biyosorbentinin Cr konsantrasyonuna bağlı Cr biyosorpsiyonu

Şekil 3.23 incelendiğinde, başlangıç Cr konsantrasyonlarının artmasıyla birlikte Cr biyosorpsiyon oranının kademeli olarak azaldığı ancak adsorpsiyon kapasitesinin arttığı tespit edilmiştir. MT2A biyokütlesinin 50, 100, 150, 200 ve 250 mg/L Cr için biyosorpsiyon oranları sırasıyla; %92, %85, %81, %62, %56 ve %50 bulunmuştur. Başlangıç Cr konsantrasyonunun artmasıyla birlikte Cr biyosorpsiyon oranının azaldığı tespit edilmiştir. Adsorpsiyon kapasitesinin ise 50, 100, 150, 200 ve 250 mg/L Cr için sırasıyla; , 46±1 mg Cr/g biyokütle, 84,6±3 mg Cr/g biyokütle, 121,5±3 mg Cr/g biyokütle, 124±2 mg Cr/g biyokütle, 124,9±2 mg Cr/g biyokütle ve 125,1±3 mg Cr/g biyokütle olarak bulunmuştur (Şekil 3.23).

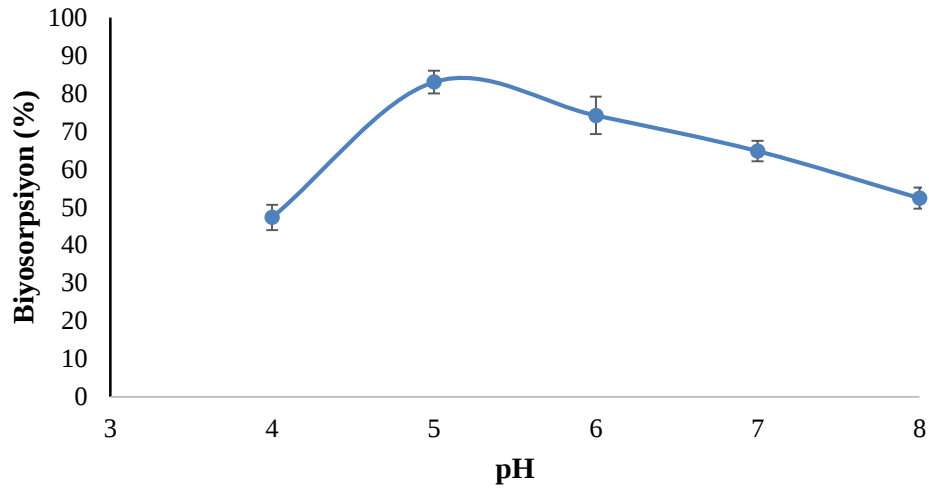
3.4. Pb Biyosorpsiyonu

MT3 biyosorbentinin Pb biyosorpsiyon kapasitesi üzerine pH, sıcaklık, temas süresi, biyosorbent konsantrasyonu ve Pb konsantrasyonları gibi değişkenlerin etkisi araştırılmıştır. Deneyler 3 paralelli olarak yapılmıştır. Bu deneylerde literatür araştırmaları dikkate alınarak 100 ml hacimde, 100 mg/L Pb konsantrasyonunda ve 0,2 g biyosorbent kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.4.1. Pb Biyosorpsiyon Verimine pH'nın Etkisi

MT3 tarafından farklı pH koşulları (4, 5, 6, 7) derişik H₂SO₄ ve NaOH çözeltileri kullanılarak ayarlanmıştır. Deney 100 ml hacimde, 0,2 g biyosorbent konsantrasyonunda,

30 °C’de ve 120 dakika boyunca 120 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. pH’nın Pb biyosorpsiyonu üzerindeki etkisi Şekil 3.24’te verilmiştir.

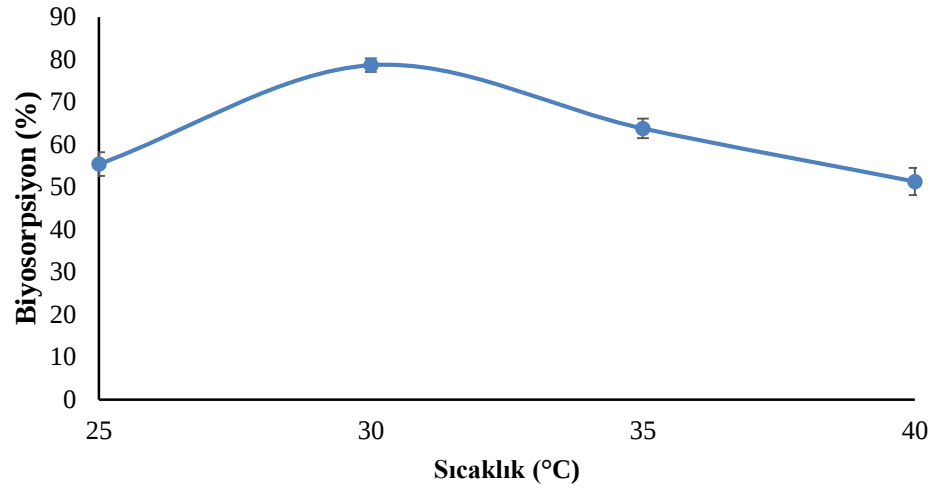


Şekil 3.24. MT3 biyosorbent pH’ya bağlı Pb biyosorpsiyonu

Katyonik Pb iyonlarının negatif yüklü hücre yüzeyi fonksiyonel gruplarına bağlanma afinitesi, çözelti pH’sına güçlü bir şekilde bağlıdır (Mohapatra ve Panda, 2017). Çalışmada pH seviyesi 4’ten 5’e çıkarıldığında Pb biyosorpsiyon oranının %47’ten %83’e çıktığı gözlemlenmiştir. Ayrıca çözelti pH’sının alkali aralığa çıkarılmasıyla, Pb biyosorpsiyonunun azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.24). Pb biyosorpsiyonu, çeşitli pH aralıklarında sırasıyla %47 (pH 4), %52 (pH 8), %65 (pH 7), %74 (pH 6), %83 (pH 5) olarak bulunmuştur. MT3 suşunun en düşük Pb biyosorpsiyon verimliliği, pH 4’te iken maksimum Pb biyosorpsiyonu pH 5’te tespit edilmiştir.

3.4.2. Pb Biyosorpsiyon Verimine Sıcaklığın Etkisi

Pb biyosorpsiyonu üzerine sıcaklığın etkisini incelemek için deney farklı sıcaklıklar (25, 30, 35, 40 °C) altında, 100 ml hacimde, 100 mg/L Pb konsantrasyonunda, pH 5’te ve 0,2 g biyosorbent kullanılarak 120 dakika boyunca 120 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. Pb’nin MT3 tarafından giderim verimine sıcaklığın etkisi Şekil 3.25’te verilmiştir.

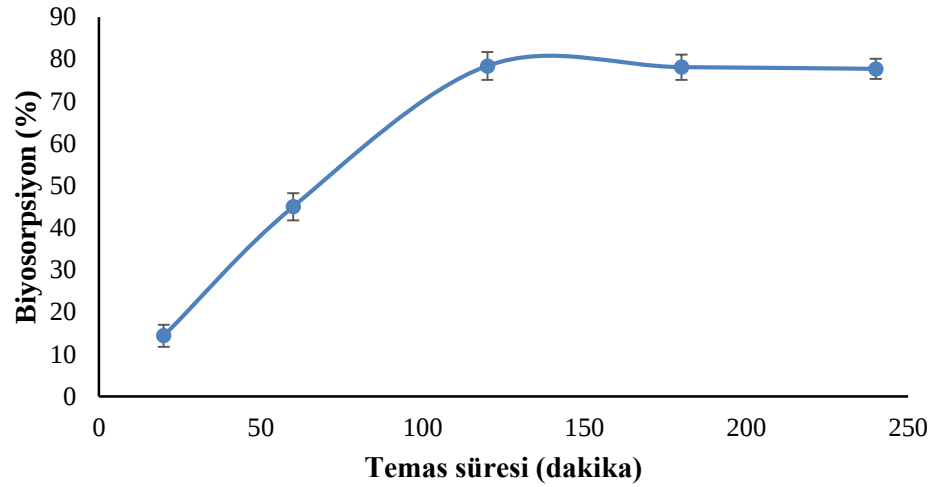


Şekil 3.25. MT3 biyosorbent sıcaklığa bağlı Pb biyosorpsiyonu

Çalışmada en yüksek Pb biyosorpsiyonunun, 30 °C’de %79 oranında olduğu tespit edilmiştir. Sıcaklık arttıkça (35 ve 40 °C) Pb biyosorpsiyonunun azaldığı gözlemlenmiştir. Tüm sıcaklıklarda Pb biyosorpsiyonu sırasıyla %51 (40 °C), %55 (25 °C), %64 (35 °C), %79 (30 °C) bulunmuştur (Şekil 3.25). Sonuç olarak, MT3’ün 30 °C’den düşük ve yüksek sıcaklıklarda adsorpsiyon kapasitesinin azaldığı tespit edilmiştir.

3.4.3. Pb Biyosorpsiyon Verimine Temas Süresinin Etkisi

Pb biyosorpsiyonu üzerine temas süresinin etkisini incelemek için deney 100 ml hacimde, 100 mg/L Pb konsantrasyonunda, pH 5’te, 0,2 g biyosorbent ve 120 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. Çalışma ortamından belirlenen aralıklarda (0-20-60-120-180-240 dakika) numuneler alınarak analiz edilmiştir. Pb’nin MT3 tarafından giderim verimine temas süresinin etkisi Şekil 3.26’da verilmiştir.

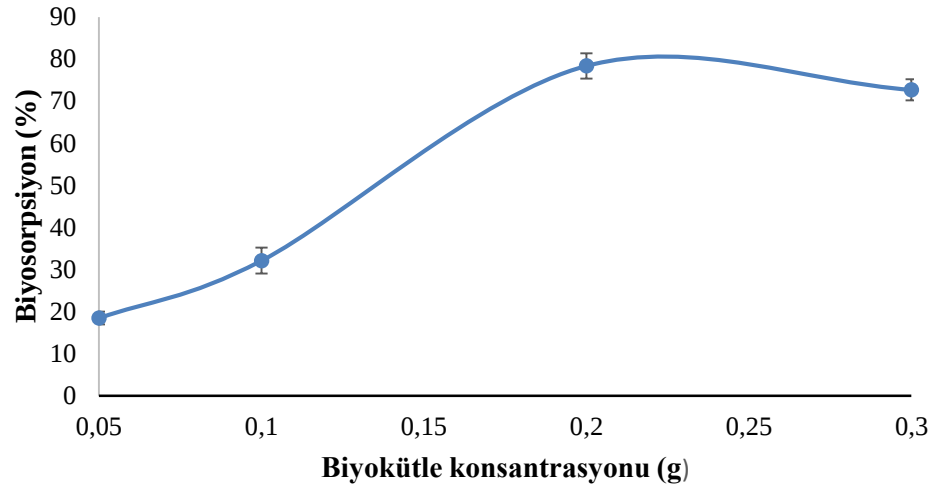


Şekil 3.26. MT3 biyosorbentinin temas süresine bağlı Pb biyosorpsiyonu

Çalışmada ilk 120 dakikada Pb biyosorpsiyonunun lineer olarak arttığı, daha sonra bu artışın azaldığı ve sabitlendiği görülmüştür (Şekil 3.26). Pb biyosorpsiyonu farklı temas sürelerine göre sıralanırsa, %14 (20 dakika sonunda), %45 (60 dakika sonunda), yaklaşık %78 (120-180 ve 240 dakika sonunda) olarak bulunmuştur (Şekil 3.26). Pb biyosorpsiyon oranının 120 dakikadan sonra azaldığı, 180. ve 240. dakika sonunda değişmediği ve dengeye ulaştığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, Pb biyosorpsiyonu için en uygun denge süresi 120 dakika olarak belirlenmiştir.

3.4.4. Pb Biyosorpsiyon Verimine Biyosorbent Konsantrasyonunun Etkisi

Pb biyosorpsiyonu üzerine biyosorbent konsantrasyonunun etkisini incelemek için deney 100 ml hacimde, 100 mg/L Pb konsantrasyonunda, pH 5'te ve farklı biyosorbent konsantrasyonları (0,05-0,1-0,2-0,3 g) kullanılarak 120 dakika boyunca 120 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. Pb'nin MT3 tarafından giderim verimine biyosorbent konsantrasyonunun etkisi Şekil 3.27'de verilmiştir.

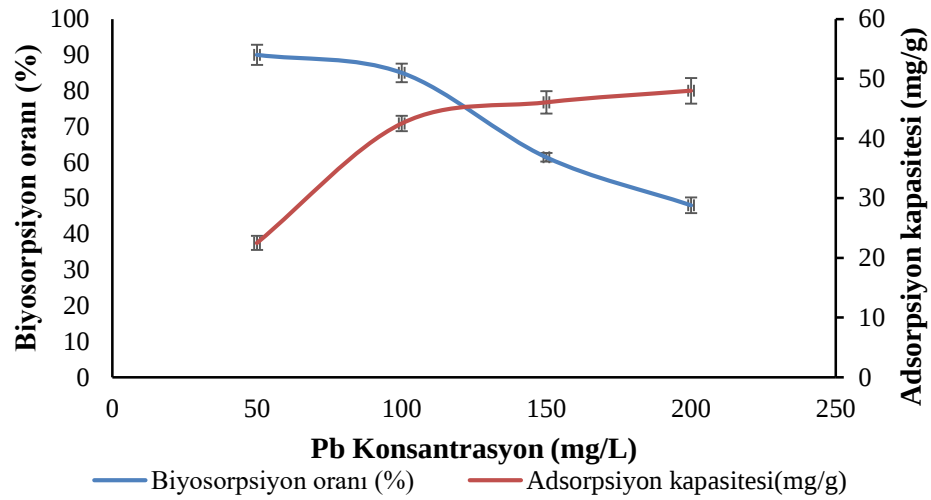


Şekil 3.27. MT3 biyosorbent konsantrasyonuna bağlı Pb biyosorpsiyonu

Biyosorbent konsantrasyonu 0,05 ila 0,2 g arasında değiştiğinde, biyosorpsiyon oranının %19'dan %78'e kadar kademeli olarak arttığı tespit edilmiştir (Şekil 3.27). Başlangıçta, bağlanmamış yüzey ligandlarının daha fazla olması nedeniyle, biyosorbent konsantrasyonundaki bir artışla adsorpsiyon oranı (0,2 g biyosorbent eklendiğinde %78'e kadar) önemli ölçüde artmıştır (Ren vd., 2015). 0,2 g biyosorbent konsantrasyonundan sonra biyosorpsiyon hızının neredeyse hiç değişmediği, sabit kaldığı görülmüştür. 0,3 g biyosorbent uygulandığında Pb biyosorpsiyonun %73 düştüğü tespit edilmiştir. Bu nedenle optimum biyosorbent konsantrasyonu 0,2 g olarak belirlenmiştir.

3.4.5. Pb Biyosorpsiyon Verimine Başlangıç Pb Konsantrasyonunun Etkisi

Bu çalışmada, Pb konsantrasyonunun Pb biyosorpsiyonu ve adsorpsiyonu üzerindeki etkisini araştırmak için farklı başlangıç konsantrasyonları (50-200 mg/L) uygulanarak biyosorpsiyon deneyleri yapılmıştır. Deney şartları: pH 5, sıcaklık 30 °C, 0,2 g biyosorbent eklenerek ve 120 dakika olarak ayarlanmıştır. Şekil 3.28'de MT3 biyosorbentinin Pb konsantrasyonuna bağlı olarak Pb biyosorpsiyonundaki ve Pb adsorpsiyonundaki değişim verilmiştir.



Şekil 3.28. MT3 biyosorbentinin Pb konsantrasyonuna bağlı Pb biyosorpsiyonu

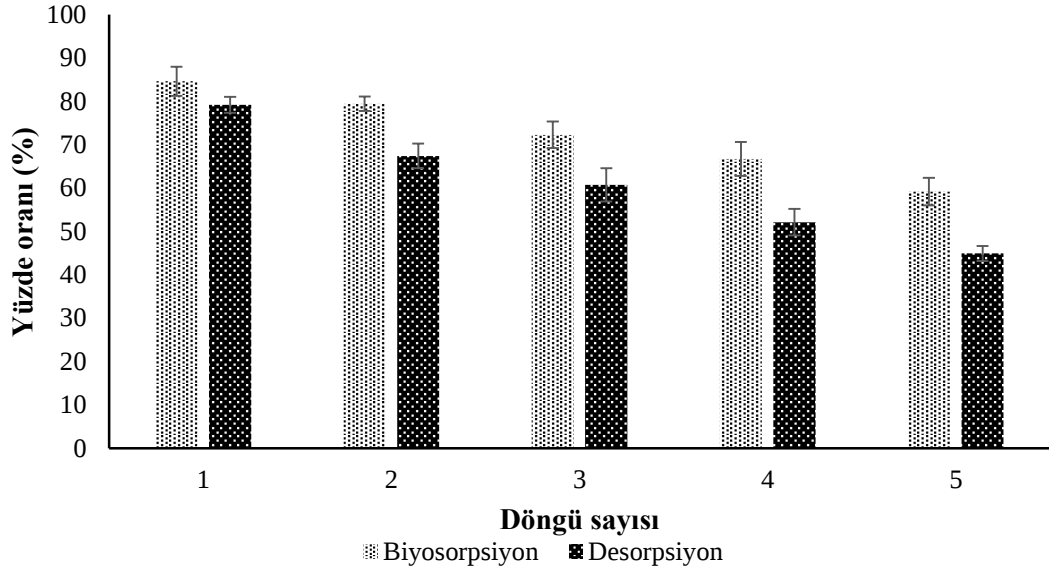
Düşük metal konsantrasyonlarında, metal konsantrasyonunun biyokütlenin yüzey alanına oranının düşük olması nedeniyle, artan metal konsantrasyonları doğrusal olarak adsorpsiyon kapasitesini arttırmaktadır. Bu artış metal konsantrasyonundan bağımsızdır. Ancak yüksek metal konsantrasyonları uygulandığında, biyokütlede bulunan metal bağlama bölgelerinin sayısı, metal konsantrasyonuna göre azalır. Bu nedenle, yüksek konsantrasyonlardaki metallerin adsorpsiyon kapasitesi metal konsantrasyonuna bağlıdır (Tunalı vd., 2006). Şekil 3.28 incelendiğinde; Pb'nin başlangıç konsantrasyonu arttıkça, Pb biyosorpsiyonunun azaldığı görülmüştür. Biyosorpsiyon oranları 50, 100, 150 ve 200 mg/L Pb için sırasıyla, %90, %85, %61 ve %48 olarak bulunmuştur. Pb adsorpsiyon kapasitesinin ise düşük Pb konsantrasyonlarında lineer olarak arttığı, belli bir limit değerden sonra dengeye ulaştığı gözlemlenmiştir. Ancak MT3 biyosorbentinin metal bağlayıcı aktif bölgelerinin Pb'ye doymuş hale gelmesi sonucunda (yaklaşık 100 mg/L Pb'de) dengeye ulaştığı tespit edilmiştir. Pb adsorpsiyon kapasitesi 50, 100, 150 ve 200 mg/L Pb için sırasıyla; 22,5±1 mg/g, 42,5±1 mg/g, 46±2 mg/g ve 48±2 mg/g olarak belirlenmiştir.

3.5. Biyosorbentlerin Tekrar Kullanılabilirliği ve Desorpsiyon Oranları

3.5.1. Cr Desorpsiyonu ve Biyosorbentin Tekrar Kullanılabilirliği

Biyosorbentin yeniden kullanılabilirliğini değerlendirmek için biyosorpsiyon deneyi 5 döngüde kullanılmıştır. Şekil 3.29'da Cr'nin biyosorpsiyon ve desorpsiyon oranları

verilmiştir. 5 döngüden sonra, biyosorbentin biyosorpsiyon verimliliğinde bir azalma olduğu tespit edilmiştir.

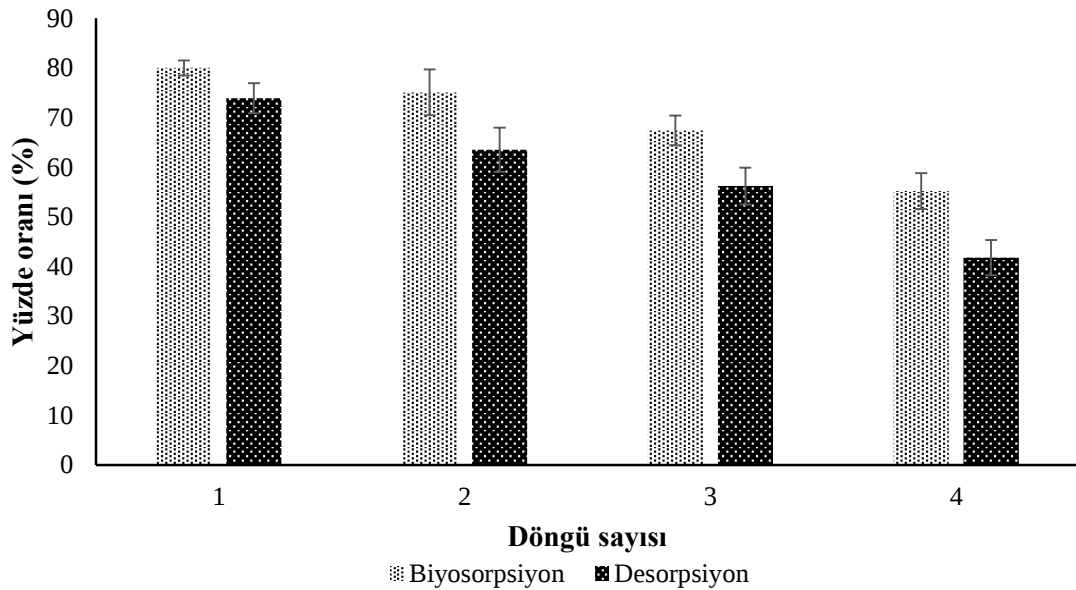


Şekil 3.29. MT2A'nın döngü sayısına göre Cr biyosorpsiyon ve desorpsiyon oranları

HCl, ağır metal ve adsorbanın bağlanma bölgeleri arasındaki etkileşim kuvvetlerini etkileyerek Cr'nin desorpsiyonuna yardımcı olur. Bu çalışmada, MT2A biyosorbentini rejenere etmek için HCl çözeltisi kullanılmıştır. Sonuçlara göre, MT2A'nın biyosorpsiyon kapasitesinin ilk döngüden son döngüye kadar sırasıyla %84,6'dan %59,2'ye azaldığı tespit edilmiştir. Biyosorbentin HCl ile rejenere edildikten sonra yeniden kullanımı ile birlikte biyosorpsiyon oranında azalmalar olduğu ve en fazla 5 döngüde verimli olarak kullanılabileceği saptanmıştır. Özellikle üçüncü döngüden itibaren biyosorpsiyon ve desorpsiyon oranlarında önemli ölçüde azalmalar olduğu belirlenmiştir.

3.5.2. Pb Desorpsiyonu ve Biyosorbentinin Tekrar Kullanılabilirliği

MT3 biyokütlesinin yeniden kullanılabilirliğini değerlendirmek için biyosorpsiyon deneyi 4 döngü boyunca rejenere edildikten sonra tekrar kullanılmıştır. Deney sonuçları Şekil 3.30'da verilmiştir.



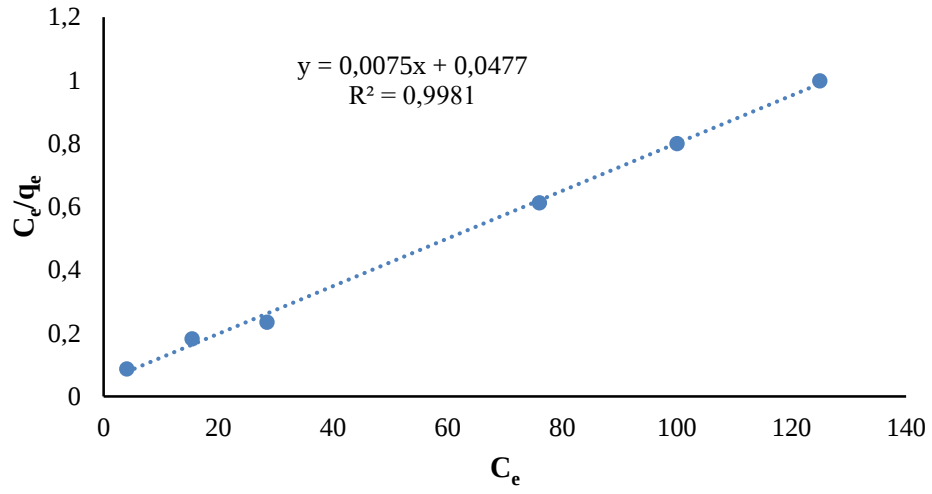
Şekil 3.30. MT3'ün döngü sayısına göre Pb biyosorpsiyon ve desorpsiyon oranları

Şekil 3.30 incelendiğinde, MT3 biyosorbentinin 4 döngü boyunca Pb'yi biyosorbe edebildiği belirlenmiştir. MT3 biyosorbentine bağlanan Pb'nin ilk döngüde yaklaşık olarak %74'ünün desorbe edilebildiği bulunmuştur. Ancak döngü sayısı arttıkça hem biyosorpsiyon hem de desorpsiyon oranlarında azalmalar olduğu görülmüştür (Şekil 3.30). İlk döngüdeki biyosorpsiyon ve desorpsiyon oranları %80 ve %74 iken son döngüde %55,2 ve %42'ye düştüğü bulunmuştur.

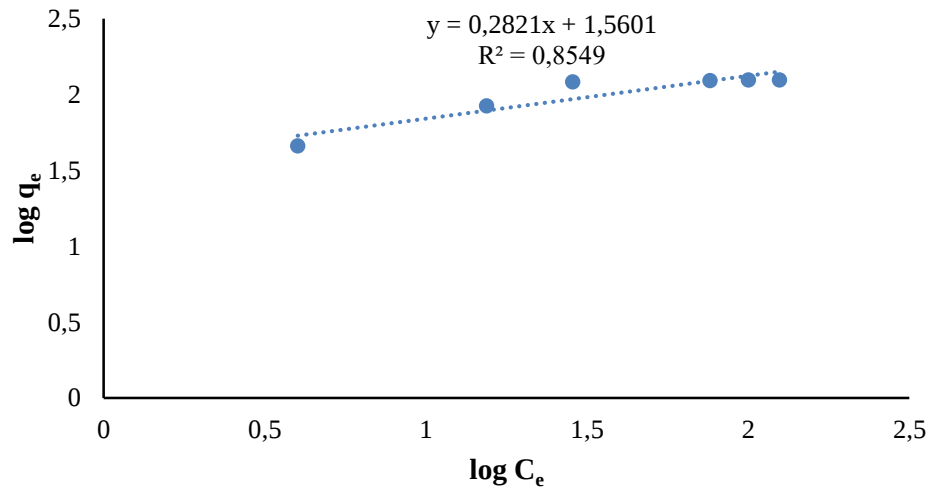
3.6. Hücrelerin Adsorpsiyon Eğrileri

3.6.1. Cr Adsorpsiyon İzoterm Eğrileri

Bu çalışmada, yaygın olarak kullanılan izoterm modellerinden Langmuir ve Freundlich izoterm modelleri kullanılmıştır. Adsorpsiyon izotermi, matematiksel olarak biyosorbentin maksimum kapasitelerinin, yüzey özelliklerinin ve biyosorbent katsayılarının belirlenmesi amacıyla kullanılır. Denge biyosorpsiyon izotermi, biyosorpsiyon sürecinin mekanizmalarının anlaşılması için en önemli verilerden biridir. Bu nedenle MT2A biyosorbentinin, Cr'nin 50-250 mg/L aralığındaki konsantrasyonlarına göre çizilen Langmuir ve Freundlich izoterm eğrileri Şekil 3.31-3.32'de verilmiştir. Bu izoterm eğrilerine göre elde edilen veriler Tablo 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.31. MT2A'nın Cr için Langmuir izoterm eğrisi



Şekil 3.32. MT2A'nın Cr için Freundlich izoterm eğrisi

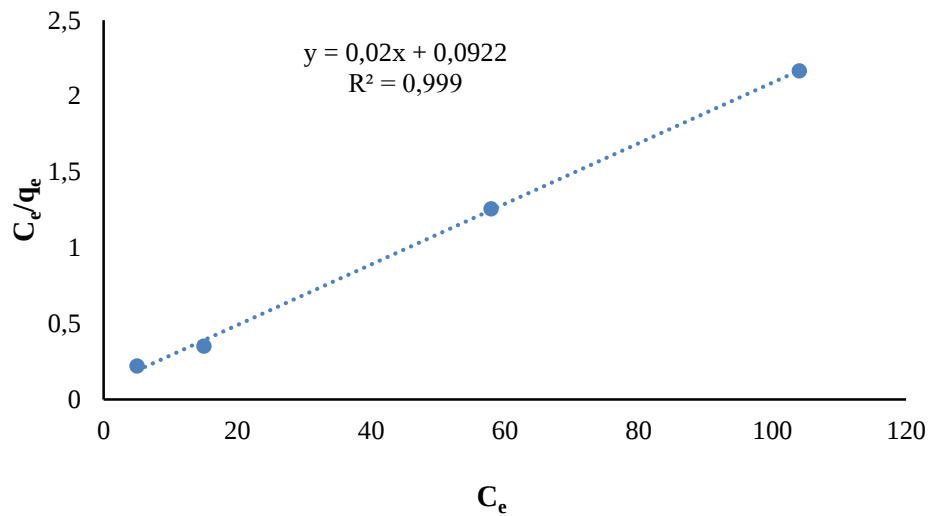
Tablo 3.2. MT2A'nın Cr için izoterm modelleri katsayıları

Langmuir			Freundlich			
K_L	q_m (mg/g)	R^2	K_F	$1/n$	n	R^2
0,157	133,3	0,99	36,3	3,5	0,28	0,85

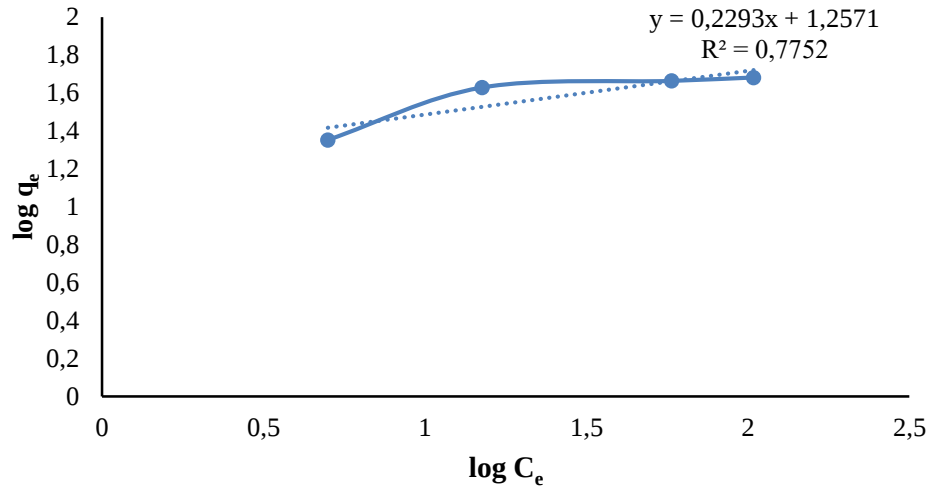
Tablo 3.2 incelendiğinde, Cr'nin MT2A tarafından adsorpsiyonunda kullanılan Langmuir ve Freundlich izoterm modellerindeki korelasyon değerleri (R^2) sırasıyla; 0,99 ve 0,85 olarak bulunmuştur. Langmuir izoterm modelindeki R^2 değerinin 1'e daha yakın olması, Cr adsorpsiyonunun bu izoterm modeline daha uygun olduğu anlamına gelir. Cr'nin çizilen Freundlich izoterm grafiği yardımıyla, adsorpsiyon yoğunluğunu temsil eden n değeri 3,5 hesaplanmıştır. Bu değer, $1 < n < 10$ arasında olduğu için Cr'nin adsorpsiyonunun bu izoterm modeline de elverişli olabileceği tespit edilmiştir (Aytan, 2010).

3.6.2. Pb Adsorpsiyon İzoterm Eğrileri

MT3 biyosorbentinin farklı Pb konsantrasyonlarına (50-200 mg/L) göre çizilen Langmuir ve Freundlich izoterm eğrileri Şekil 3.33-3.34'te verilmiştir. Bu izoterm eğrilerine göre elde edilen veriler Tablo 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.33. MT3'ün Pb için Langmuir izoterm eğrisi



Şekil 3.34. MT3'ün Pb için Freundlich izoterm eğrisi

Tablo 3.3. MT3'ün Pb için Langmuir ve Freundlich izoterm modellerinin katsayıları

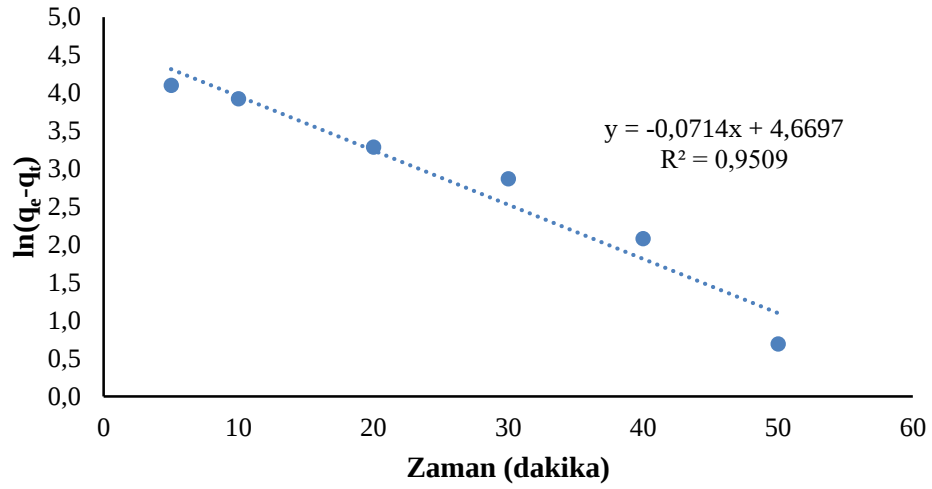
Langmuir			Freundlich			
K_L	q_m (mg/g)	R^2	K_F	$1/n$	n	R^2
0,22	50	0,99	18,1	0,23	4,36	0,77

Tablo 3.3 incelendiğinde, MT3'ün Pb biyosorpsiyonunun Langmuir ve Freundlich izoterm modellerindeki R^2 değerlerinin sırasıyla 0,99 ve 0,77 olduğu görülmektedir. Langmuir izotermine korelasyon değerinin 1'e daha yakın olması nedeniyle, Pb'nin MT3 ile adsorpsiyonunun Langmuir izoterm modeline daha elverişli olduğu tarafımızca saptanmıştır.

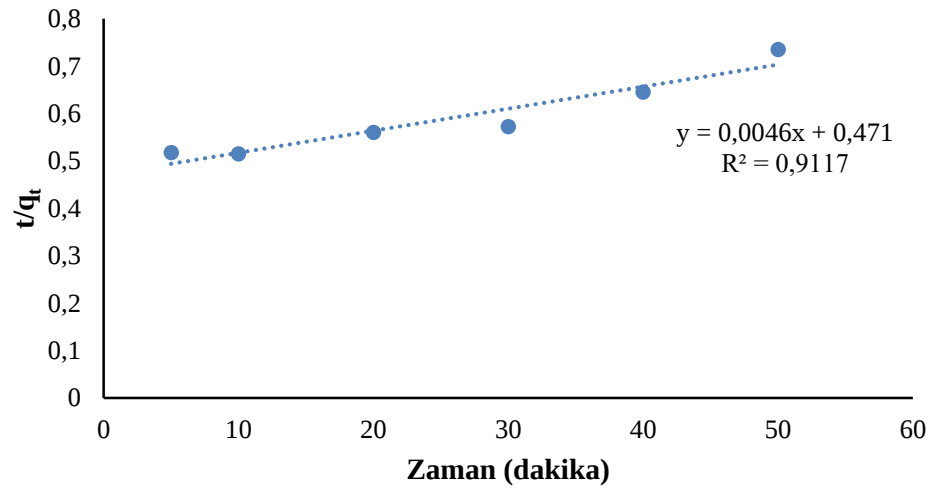
3.7. Biyosorpsiyon Kinetikleri

3.7.1. Cr Biyosorpsiyon Kinetikleri

Farklı temas süreleri boyunca Cr adsorpsiyon prosesinin mekanizması ve hız kontrol adımları, adsorpsiyon kinetik modelleri ile incelenmiştir. Adsorpsiyon mekanizmasını incelemek için yalancı birinci dereceden ve yalancı ikinci dereceden kinetik modeller kullanılmıştır ve bu modellere göre çizilen grafikler Şekil 3.35-3.36'da gösterilmiştir. Bu kinetik eğrilere göre elde edilen veriler Tablo 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.35. Cr'nin yalancı birinci dereceden kinetik modeli



Şekil 3.36. Cr'nin yalancı ikinci dereceden kinetik modeli

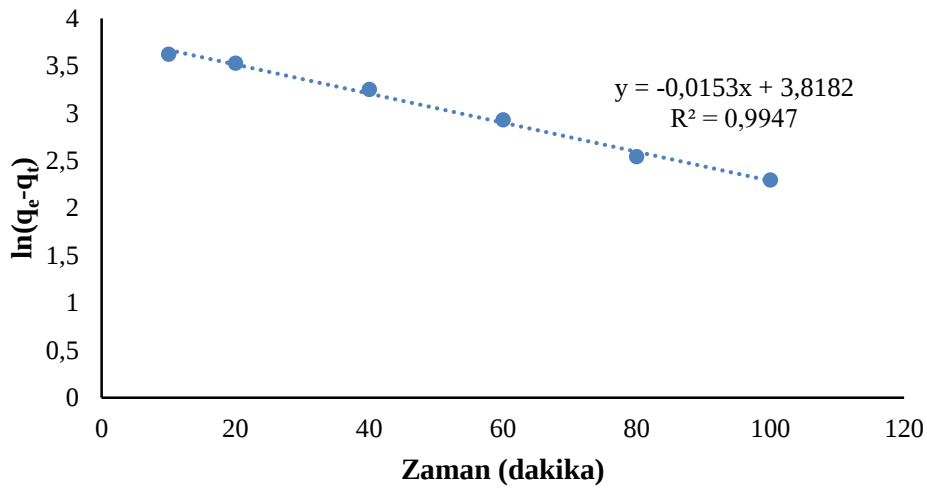
Tablo 3.4. Yalancı birinci mertebeden ve yalancı ikinci mertebeden reaksiyon kinetik sabitleri

C_0 (mg/L)	Deneyssel q_m (mg/g)	Yalancı Birinci Dereceden Kinetik			Yalancı İkinci Dereceden Kinetik		
		k_1 (g/mg dak.)	q_e (mg/L)	R^2	k_2 (g/mg dak.)	q_e (mg/L)	R^2
100	84,6	0,07	107	0,95	$5,62 \times 10^{-5}$	200	0,77

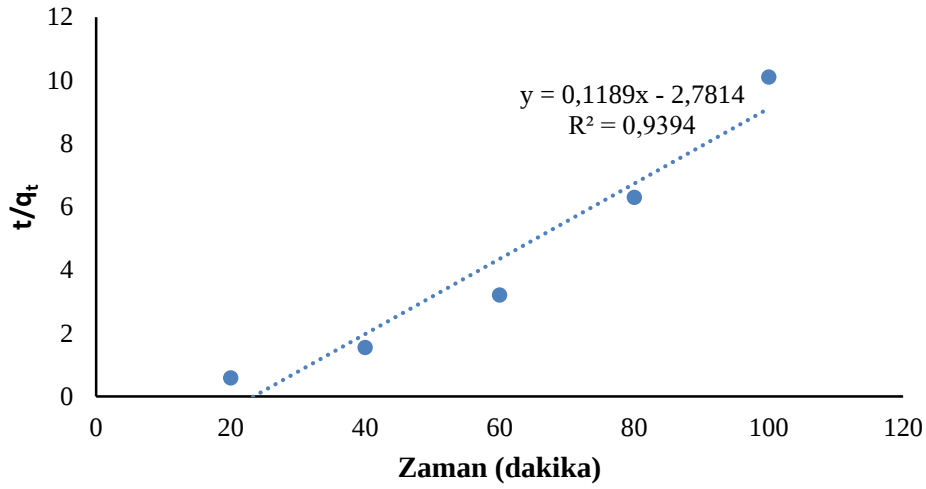
Cr'nin MT2A biyokütlesine adsorpsiyon kinetiğini belirlemek için yalancı birinci dereceden ve yalancı ikinci dereceden kinetik modelleri kullanılmıştır. Kinetik modeller uygulandıktan sonra elde edilen sonuçlar Tablo 3.4'te verilmiştir. Sonuçlara göre R^2 değeri yalancı birinci dereceden kinetikte 0,95 iken yalancı ikinci dereceden kinetikte 0,77 bulunmuştur. Cr için yalancı birinci dereceden kinetik modelin, yalancı ikinci dereceden modele göre daha uygun olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca deneysel Cr biyosorpsiyon kapasitesi (125,1 mg/g) ile yalancı birinci dereceden kinetiğe göre hesaplanan maksimum biyosorpsiyon kapasitesi (107 mg/g) birbirine yakın bulunmuştur. Bu sonuçlara göre Cr adsorpsiyonu için en açıklayıcı kinetik modelin yalancı birinci dereceden kinetik model olduğu tespit edilmiştir.

3.7.2. Pb Biyosorpsiyon Kinetikleri

Farklı temas süreleri boyunca Pb'nin adsorpsiyon prosesinin mekanizması ve hız kontrol adımları adsorpsiyon kinetik modelleri ile incelenmiştir. Adsorpsiyon mekanizmasını incelemek için yalancı birinci dereceden ve yalancı ikinci dereceden kinetik modeller için eğriler çizilmiştir (Şekil 3.37-3.38). Bu modellerden elde edilen sonuçlar Tablo 3.5'te verilmiştir.



Şekil 3.37. Pb'nin yalancı birinci dereceden kinetik modeli



Şekil 3.38. Pb'nin yalancı ikinci dereceden kinetik modeli

Tablo 3.5. Yalancı birinci mertebeden ve yalancı ikinci mertebeden reaksiyon kinetik sabitleri

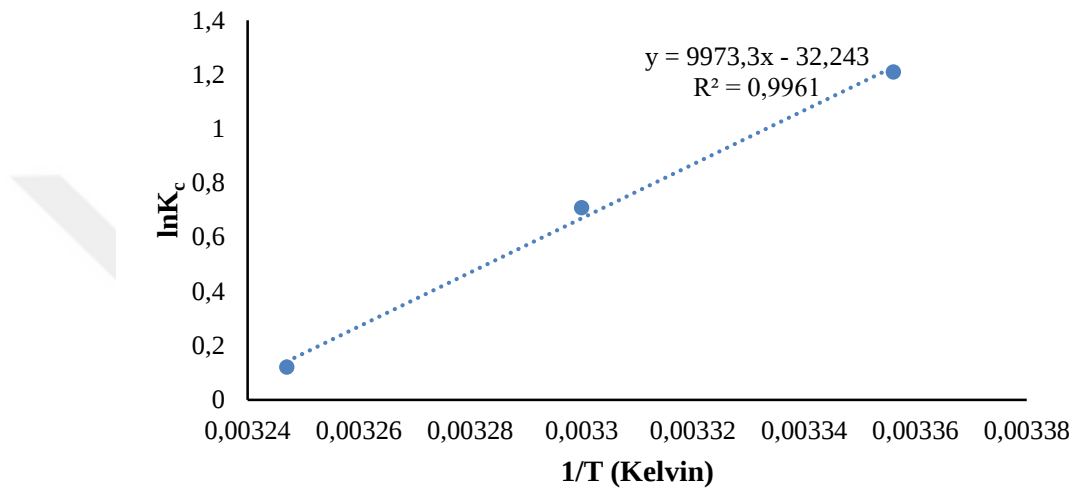
C ₀ (mg/L)	Deneysel q _m (mg/g)	Yalancı Birinci Dereceden Kinetik			Yalancı İkinci Dereceden Kinetik		
		k ₁ (g/mg dak.)	q _e (mg/L)	R ²	k ₂ (g/mg dak.)	q _e (mg/L)	R ²
100	42,5	0,015	45,5	0,99	5,08 x 10 ⁻³	8,41	0,94

Tablo 3.5'e göre, yalancı birinci dereceden ve yalancı ikinci dereceden kinetik modellerde R² değerleri sırasıyla; 0,99 ve 0,94 bulunmuştur. Bu durumda Pb biyosorpsiyonu için yalancı birinci dereceden kinetik modelin, yalancı ikinci dereceden modele kıyasla daha uygun olduğu tespit edilmiştir. Pb biyosorpsiyon kapasitesi deneysel çalışmalar sonunda 42,5 mg/g bulunmuştur. Yalancı birinci dereceden kinetik modele göre maksimum Pb biyosorpsiyon kapasitesi değeri 45,5 mg/g olarak hesaplanmıştır. Bu değerlerin birbirine yakın olması ve belirlenen R² değerinin 1'e yakın olması nedeniyle Pb biyosorpsiyonunun sözde birinci dereceden kinetik modele daha uygun olduğu belirlenmiştir.

3.8. Biyosorpsiyon Termodinamikleri

3.8.1. Cr Biyosorpsiyon Termodinamiği

Cr biyosorpsiyonunun istemli (kendiliğinden) veya istemsiz olarak gerçekleştiğini tespit etmek için ΔH , ΔS ve farklı sıcaklıklardaki ΔG değerleri Bölüm 1.14'te anlatıldığı gibi hesaplanmıştır. Sonuçlar, Şekil 3.39'da ve Tablo 3.6'da verilmiştir.



Şekil 3.39. MT2A'nın Cr termodinamiği hesabı için 1/T'ye karşılık lnK_c grafiği

Tablo 3.6. Cr'nin farklı sıcaklıklardaki termodinamik Parametreleri

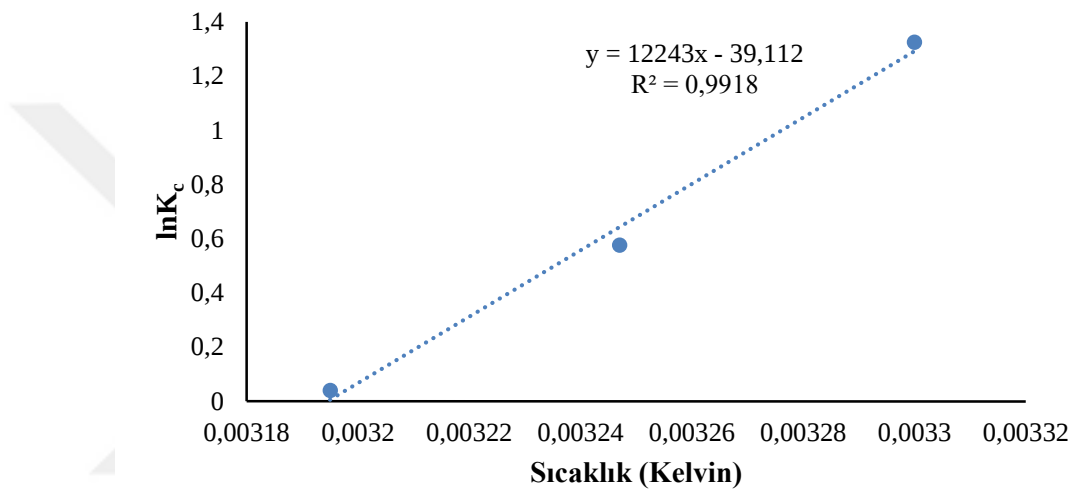
Sıcaklık (K)	ΔG (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (kJ/mol K)	R^2
298	-3	-83	-0,27	0,99
303	-1,8			
308	-0,31			

Tablo 3.6 incelendiğinde, ΔG tüm sıcaklıklarda negatif bulunmuştur. ΔG 'nin negatif değeri sorpsiyon işleminin termodinamik uygulanabilirliğini ve kendiliğinden gerçekleştiğini gösterir (Güneş, 2016). ΔH değeri biyosorpsiyonun fiziksel ya da kimyasal olduğu hakkında bilgi vermektedir. ΔH değerinin negatif olması biyosorpsiyonun ekzotermik olduğu ve adsorpsiyonun fiziksel olduğu anlamına gelir. ΔH değeri 2,1 kJ/mol ile 20,9 kJ/mol arasında ise fiziksel adsorpsiyon, eğer 0,9 kJ/mol ile 418,4 kJ/mol arasında ise kimyasal adsorpsiyon olduğu anlamına gelir (Ang vd., 2013).

ΔS değerlerinin negatif olması biyokütle yüzeyine Cr'nin bağlandığını ve sistem düzensizliğinin azaldığını gösterir (Uysal, 2010).

3.8.2. Pb Biyosorpsiyon Termodinamiği

Pb biyosorpsiyonunun kendiliğinden veya istemsiz olarak gerçekleştiğini tespit etmek için ΔH , ΔS ve 303 K (30 °C), 308 K (35 °C) ve 313 K (40 °C) sıcaklıklarındaki ΔG değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar Şekil 3.40'ta ve Tablo 3.7'de verilmiştir.



Şekil 3.40. MT3'ün Pb termodinamiği hesabı için $1/T$ 'ye karşılık $\ln K_c$ grafiği

Tablo 3.7. Pb'nin farklı sıcaklıklardaki termodinamik parametreleri

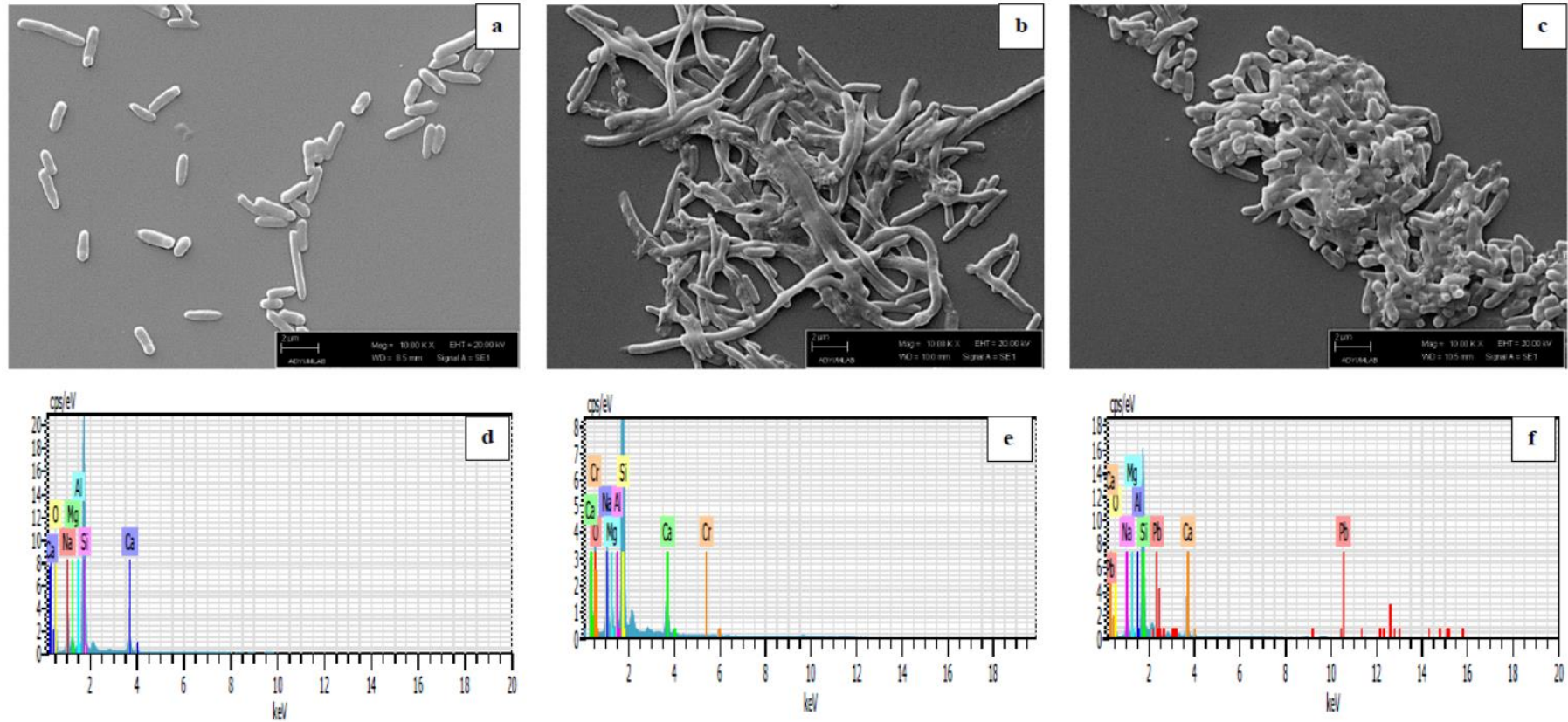
Sıcaklık (K)	ΔG (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (Kj/mol K)	R^2
303	-3,3	-102	-0,33	0,99
308	-1,5			
313	-0,1			

Tablo 3.7'ye göre 303 K (30 °C), 308 K (35 °C) ve 313 K için elde edilen ΔG değerleri negatif bulunmuştur. ΔG değerlerinin -20 kJ/mol ile 0 kJ/mol arasında olması Pb biyosorpsiyonunun fiziksel olduğunu göstermektedir (Güneş, 2016). ΔH değerinin negatif olması (-102 kJ/mol) biyosorpsiyonun ekzotermik olduğunu ve adsorpsiyonun dışardan enerjiye ihtiyaç duymadan kendiliğinden gerçekleştiğini göstermektedir.

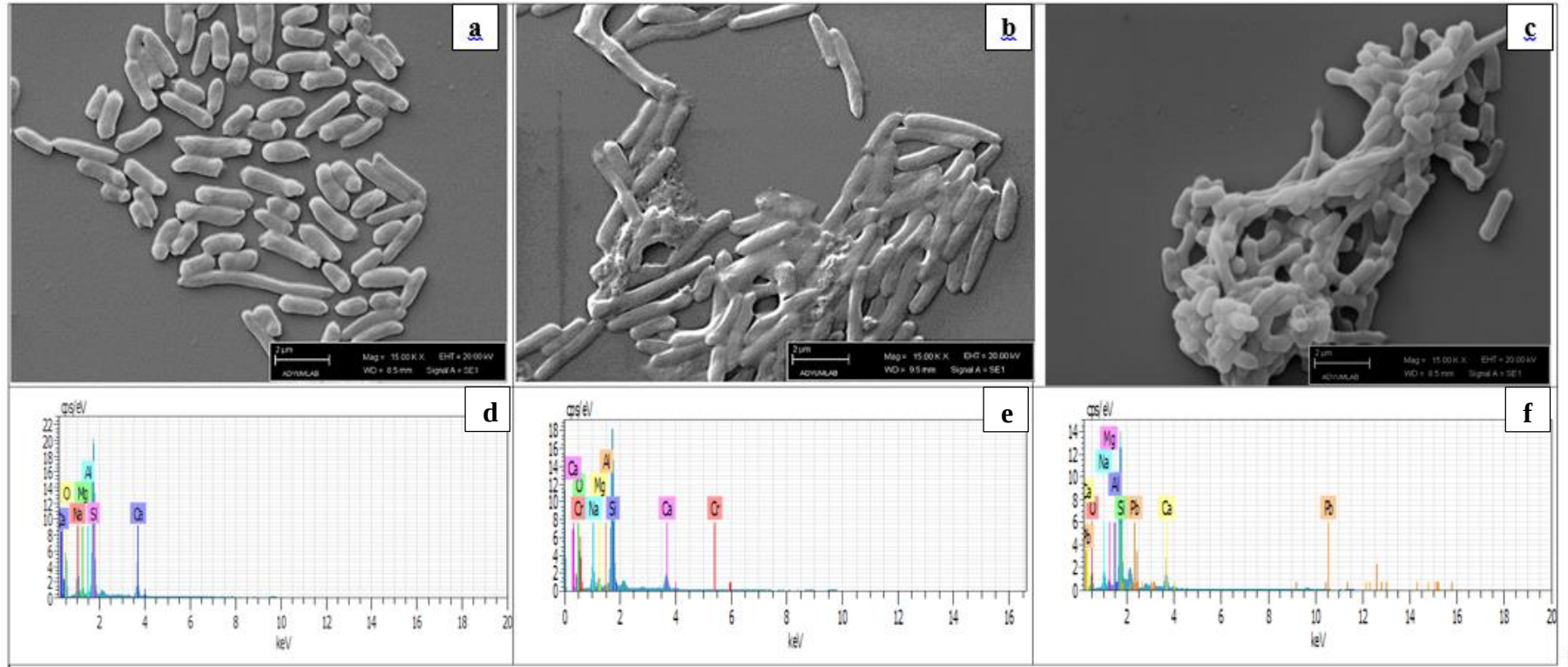
3.9. Krom ve Kurşun Uygulanan Bakterilerin SEM Görüntüleri

Bakterilerin Cr (25 mg/L) ve Pb (100 mg/L) uygulama öncesinde ve sonrasında çekilen SEM görüntüleri aşağıdadır. Hücrelerin SEM görüntüleri Şekil 3.41-3.43'te verilmiştir.

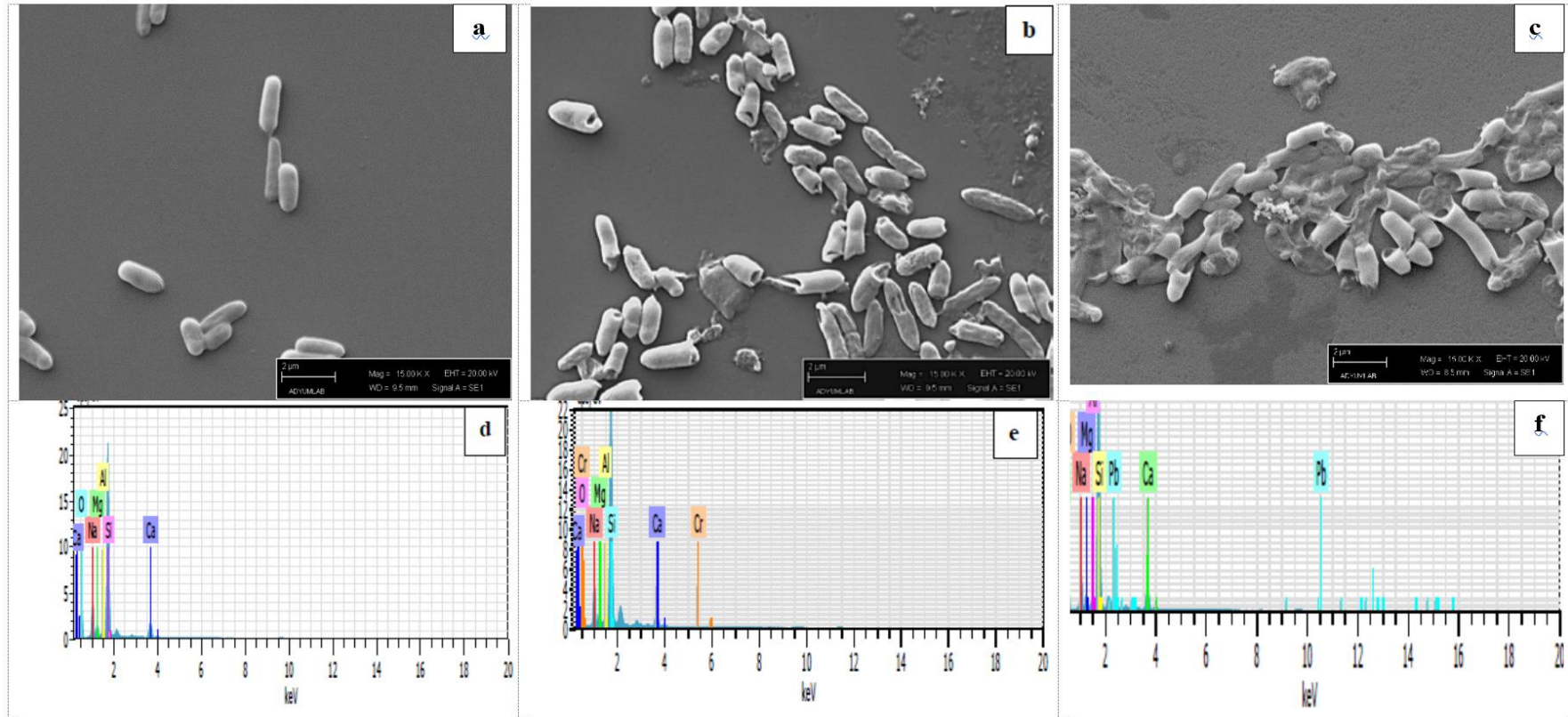




Şekil 3.41. *E. coli* Jm109 suşu SEM görüntüleri: Metal uygulanmamış (kontrol) *E. coli* Jm109 (a), Cr(VI) uygulanmış *E. coli* Jm109 (b), Pb uygulanmış *E. coli* Jm109 (c), Kontrol *E. coli* Jm109 EDX analizi (d), Cr uygulanmış *E. coli* Jm109 EDX analizi (e), Pb uygulanmış *E. coli* Jm109 EDX analizi (f)



Şekil 3.42. MT2A suşu SEM görüntüleri: Metal uygulanmamış (kontrol) MT2A (a), Cr(VI) uygulanmış MT2A (b), Pb uygulanmış MT2A (c), Kontrol MT2A EDX analizi (d), Cr uygulanmış MT2A EDX analizi (e), Pb uygulanmış MT2A EDX analizi (f)

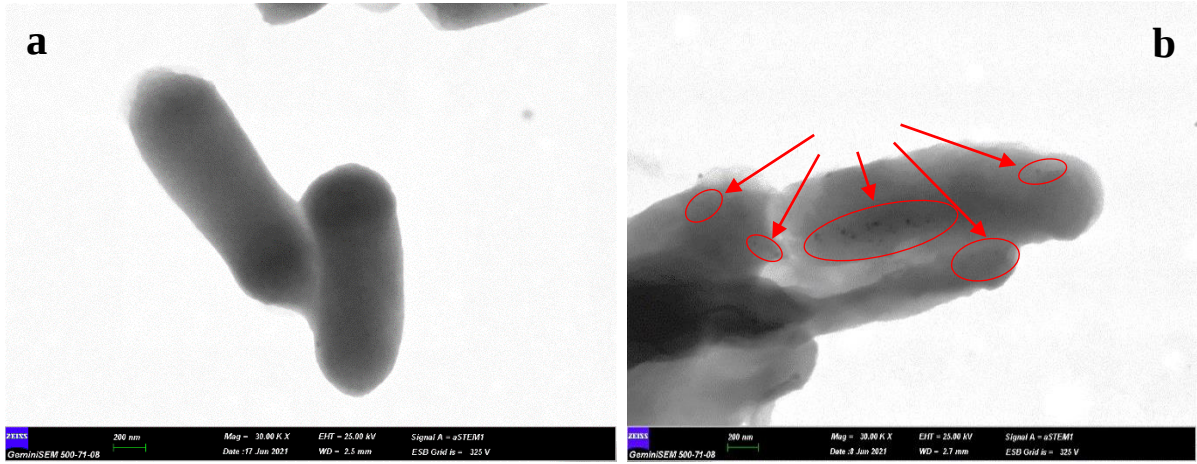


Şekil 3.43. MT3 suşu SEM görüntüleri: Metal uygulanmamış (kontrol) MT3 (a), Cr(VI) uygulanmış MT3 (b), Pb uygulanmış MT3 (c), Kontrol MT3 EDX analizi (d), Cr uygulanmış MT3 EDX analizi (e), Pb uygulanmış MT3 EDX analizi (f)

Hücrelerin SEM görüntüleri incelendiğinde tüm suşlarda kontrol gruplarının hücre yapısının pürüzsüz, basil yapıda ve düzgün olduğu gözlemlenmiştir. *E. coli* Jm109 suşuna Cr uygulandığında, hücrelerin üst üste geldiği ve yapısında bozulmalar olduğu görülmüştür (Şekil 3.41 (b)). Cr'ye maruz kaldıktan sonra MT2A hücrelerin uzadığı, üst üste bindiği ve yığıldığı hatta bazı hücrelerin yüzeyinin önemli ölçüde dağıldığı gözlenmiştir (Şekil 3.42 (b)). MT3 suşuna Cr uygulandıktan sonra, hücrelerde kopmalar ve uç kısımlarında kırılmalar oluşmuştur (Şekil 3.43 (b-c)). *E. coli* Jm109'a Pb uygulandığında, hücrelerin üst üste geldiği görülmüştür (Şekil 3.41 (c)). Benzer şekilde Pb'ye maruz bırakılan MT2A hücrelerinin de üst üste geldiği ve şekillerinin bozulduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.42 (c)). Pb uygulanan MT3 hücrelerinin üst üste geldiği, hücre uçlarında kırılmalar ve kopmalar olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.43 (c)). Cr uygulanan tüm hücrelerin EDX'lerinde Cr piklerinin olduğu, Pb uygulanan tüm hücrelerin EDX'lerinde ise Pb piklerinin olduğu belirlenmiştir. Hücrelerin kontrol gruplarında bu pikler gözlenmezken metal uygulanan gruplarda bu piklerin tespit edilmesi, hücre duvarında Cr ve Pb birikimi olduğunu doğrulamaktadır (Şekil 3.41 (e-f), 3.42 (e-f), 3.43 (e-f)). Bulgularımıza benzer şekilde, Cr uygulanan bakteri hücrelerinde EDX piklerinin hücrelerin dış yüzeyinde adsorbe edilen veya çökeltilen Cr partiküllerinin olduğu hatta Cr(VI)'nın Cr(III)'e indirgenmesi sonucu oluşan Cr(OH)₃ çökeltisinin var olabileceğini ifade eden çalışmalar bulunmaktadır (Das vd., 2021; Zhu vd., 2008).

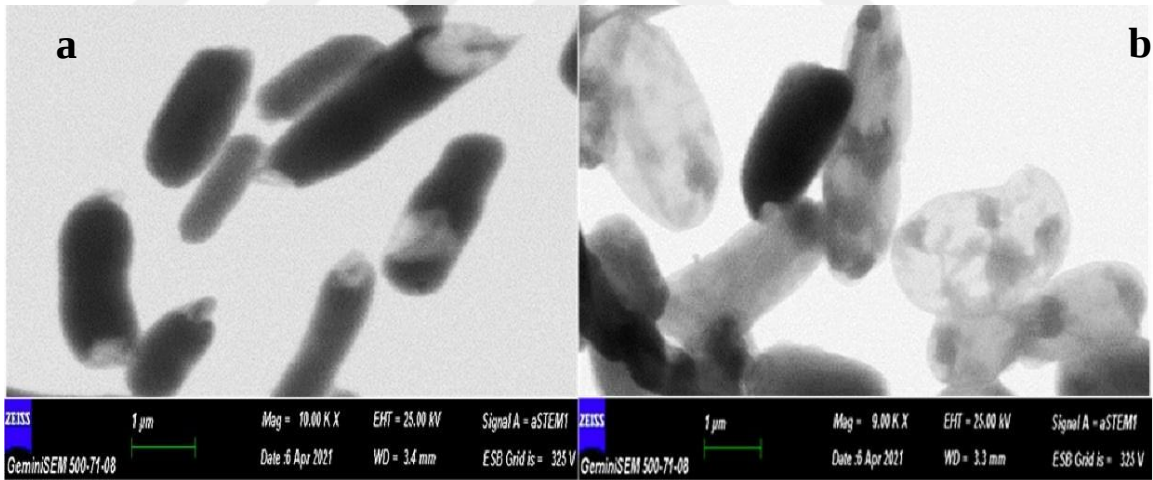
3.10. MT2A suşunun STEM Görüntüleri

Hücre içinde Cr birikimini belirlemek için Cr gideriminde ve indirgenmesinde en etkili olan MT2A suşu kullanılmıştır. Şekil 3.44'te Cr içeren ve içermeyen LB'de büyütülen MT2A suşunun STEM görüntüleri verilmiştir.



Şekil 3.44. MT2A STEM görüntüleri: Cr uygulanmayan hücreler (kontrol) (a), 25 mg/L Cr uygulanan hücreler (b)

Cr uygulanan MT2A hücrelerinin STEM görüntülerinde, hücre içinde Cr birikimi olduğunu gösteren siyah noktaların olduğu tespit edilmiş ancak kontrol grubunda bu siyah noktaların olmadığı gözlenmiştir (Şekil 3.44 (a)). Şekil 3.45'te Pb uygulanmayan ve Pb uygulanan MT3 hücrelerinin STEM görüntüleri verilmiştir.

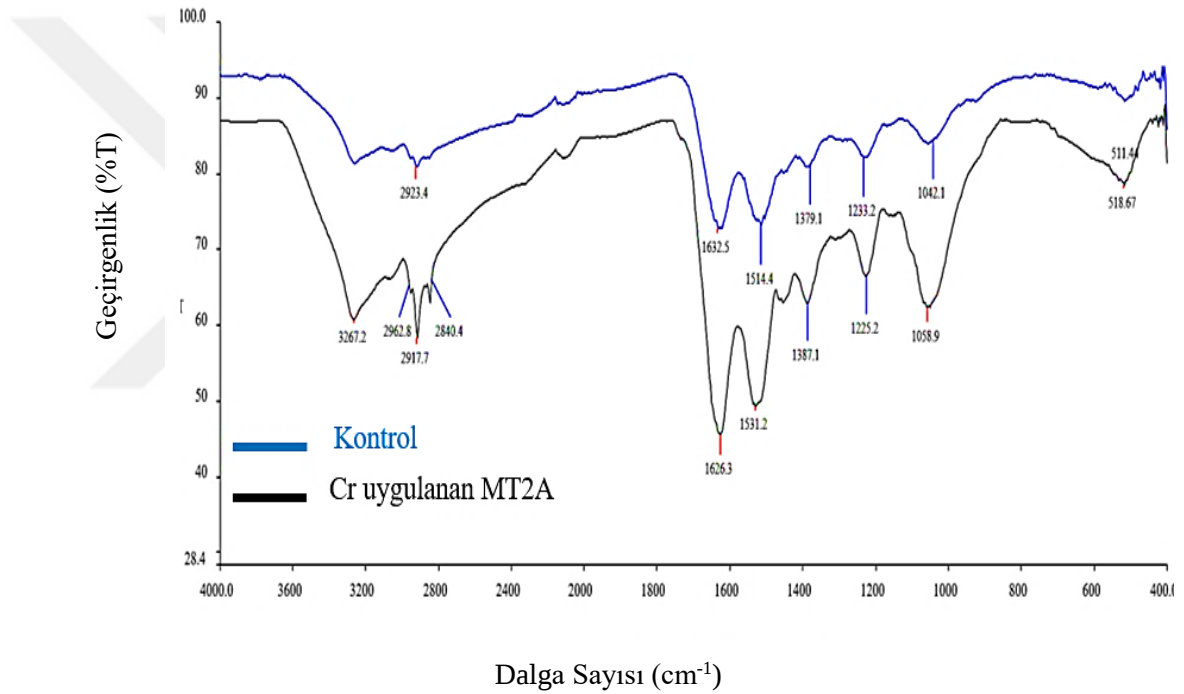


Şekil 3.45. MT3 hücresinin STEM görüntüleri: Pb uygulanmayan hücreler (kontrol) (a), Pb uygulanan hücreler (b)

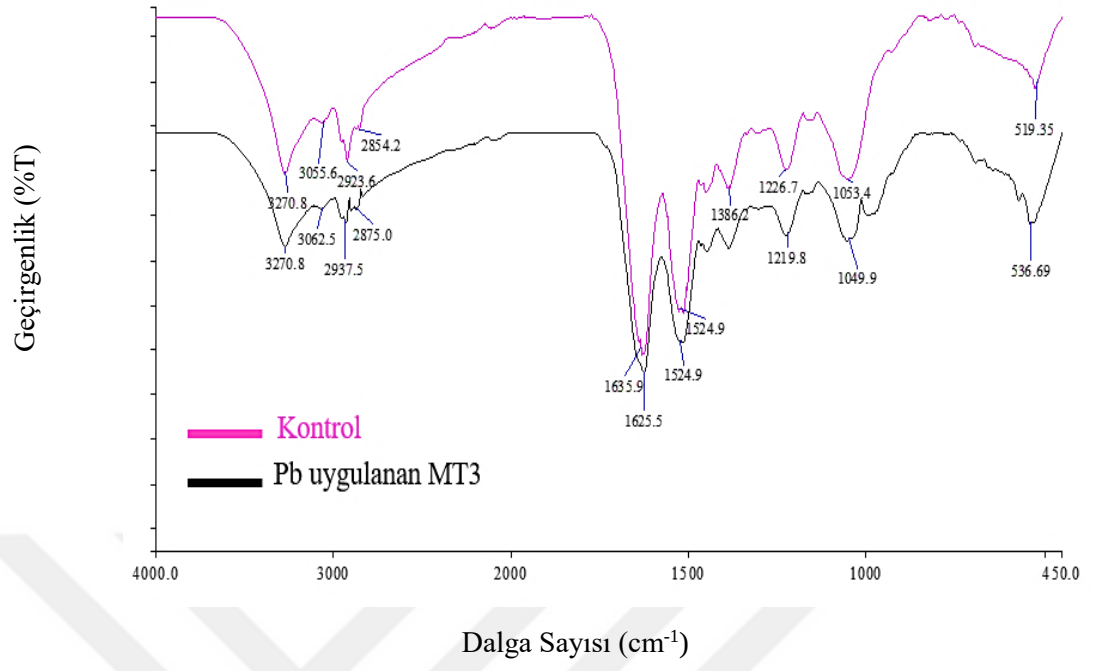
Pb'nin hem sulu çözeltilerden hem de gerçek atıksudan gideriminde en etkili türün MT3 olması nedeniyle, STEM görüntüleri sadece bu hücrenin kontrolü (Pb uygulanmayan) ve Pb'ye maruz bırakılan hücreleri için alınmıştır.

3.11. FTIR Analizi

Biyosorpsiyon prosesinde Cr ve Pb'nin bağlanmasında etkili olan fonksiyonel grupları tespit etmek için, metal uygulanmamış kontrol hücrelerinin ve metal uygulanan hücrelerin FTIR spektrumları alınmıştır ve piklerde dalgalanmalar olduğu görülmüştür. Cr'nin indirgenmesinde ve giderilmesinde en etkili olan bakterinin MT2A olması nedeniyle FTIR analizi sadece bu suşun kontrol ve 25 mg/L Cr uygulanan örneği için yapılmıştır. MT2A ve MT3 hücrelerinin FTIR spektrumları Şekil 3.46-3.47'de verilmiştir.



Şekil 3.46. MT2A kontrol ve Cr uygulanmış (25 mg/L) MT2A'nın FTIR spektrumu



Şekil 3.47. MT3 kontrol ve Pb uygulanmış (100 mg/L) MT3'ün FTIR spektrumu

4. BÖLÜM

TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1. Cr ve Pb'nin Hücre Büyümesine Etkisi

Cr ve Pb konsantrasyonu arttıkça hücrelerin büyüme toleransının azalması, bu metallerin yüksek konsantrasyonlarının hücreler üzerinde toksik etkisinin olduğunu göstermektedir. Uygulanan konsantrasyonlar arttıkça, bakterilerin Cr(VI) indirgenme oranı, Cr ve Pb'nin biyolojik giderim kapasiteleri düşmüştür. He ve arkadaşları (2009) çalışmalarında *Ochrobactrum* sp. suşuna uyguladıkları artan Cr konsantrasyonu ile birlikte Cr toksisitesinin artması sonucunda hücrelerin inhibe olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer şekilde, *B. anthracis* (Xu vd., 2015) ve *Microbacterium paraoxydans* (Mishra vd., 2021) suşlarının da metal konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak giderim verimlerinin azaldığı tespit edilmiştir.

4.2. MT2A ve MT3 Genlerinin Suşların Cr ve Pb Giderim Oranlarına Etkisi

4.2.1. MT2A ve MT3 Genlerinin Suşların Cr Giderim ve Cr(VI) İndirgeme Oranlarına Etkisi

Cr konsantrasyonları arttıkça, bakterilerin Cr giderme ve Cr(VI) indirgenme yüzdeleri azalmaktadır ve suşlar arasındaki fark önemli ölçüde artmaktadır. Bu bağlamda yüksek metal stresi altında suşlar gelişebilse bile, stresli metabolik yollar ve hücrelerin biyolojik aktiviteleri Cr giderme ve Cr(VI) indirgenme kapasitelerini inhibe edebilir (Zhang vd., 2012; Pan vd., 2014). Literatürde Cr(VI)'nın yabani suşlar tarafından sulardan ve sulu çözeltilerden giderilmesine ilişkin birçok çalışma bulunmaktadır (Zeng vd., 2019; Li vd., 2019; Sathishkumar vd., 2017). Tan ve arkadaşları (2020), arıtma tesisi çamurundan izole ettikleri *Bacillus* sp. CRB-B1 suşunun 200 mg/L ve 300 mg/L Cr(VI)'yı sırasıyla %86,2 ve %43,1 oranında giderdiğini, 300 mg/L'nin altındaki Cr

konsantrasyonlarında Cr'yi etkili bir şekilde indirgediğini ve artan konsantrasyonların suşun Cr(VI) indirgeme kapasitesini azalttığını tespit etmişlerdir. Benzer şekilde Huang ve arkadaşları (2021), yeni bir fakültatif anaerobik bakteri olan *Sporosarcina saromensis* W5 suşunun aerobik sistemde, 50 mg/L Cr(VI)'yi tamamen giderdiğini ve artan Cr(VI) konsantrasyonları ile birlikte giderim verimlerinin azaldığını belirlemişlerdir. Bhagarava ve Mishra (2018), bir deri endüstrisi atıksuyundan izole ettikleri *Cellulosimicrobium* sp. suşunun, 50 mg/L ve 100 mg/L Cr(VI)'yi 24 ve 96 saat sonunda sırasıyla %99 ve %97 oranında indirgediğini belirlemişlerdir. Bununla birlikte, 200 mg/L ve 300 mg/L Cr(VI) konsantrasyonlarının 96 saat sonunda sırasıyla %84 ve %62 oranlarında indirgendini saptamışlardır. Bu araştırmalardan anlaşıldığı üzere, Cr(VI) konsantrasyonu arttıkça indirgenme oranının azaldığı açık bir şekilde görülmektedir. Bu bulgular bu çalışmayı desteklemektedir. Bu çalışmada, Cr giderimi ve indirgemesi açısından rekombinant türler ile yabani türler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,05$). Tüm Cr konsantrasyonları için hem MT2A hem de MT3 suşlarında Cr giderim ve Cr(VI) indirgeme oranlarının *E. coli* Jm109'dan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.13-3.15). Toplam Cr gideriminde olduğu gibi, Cr(VI) indirgemesinde de Cr konsantrasyonu arttıkça indirgeme oranı azalmıştır. Sonuç olarak hem Cr gideriminde hem de indirgenmesinde tüm Cr konsantrasyonları için en etkili suşun MT2A olduğu gösterilmiştir. Literatürde bu çalışmadaki bulgulara benzeyen rekombinant bakteriler ile yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Bir araştırmada, *Serratia* sp.'nin Cr(VI) direnci ile ilişkili ChrA, ChrB ve ChrAB genlerinin *E. coli* BL21'e klonlanması sonucunda elde edilen rekombinant suşlarla Cr(VI) giderimi araştırılmıştır. Kontrol *E. coli* BL21 suşuna kıyasla, ChrA ve ChrAB genleri içeren rekombinant suşların Cr(VI)'ya karşı yüksek direnç kazandırdığı tespit edilmiştir. Ancak ChrB proteininin böyle bir özelliğe sahip olmadığı bildirilmiştir (He vd., 2018). Pei ve ark., (2020), Cr(VI) gideriminde etkili olan E-mcr ve E-gsr genlerini klonladıkları rekombinant suşların, 300 μ M Cr(VI)'yi sırasıyla %74,8 ve %87,3 oranında giderdiğini saptamışlardır. Ancak, Cr(VI) konsantrasyonu 400 μ M'dan 500 μ M'a çıkarıldığında E-mcr ve E-gsr suşlarının Cr(VI) giderme verimlerinin %77,6 - %52,2 arasında olduğunu bulmuşlardır. 600 μ M Cr(VI) konsantrasyonunda ise Cr(VI) giderme verimlerinin E-mcr'de %48,7'ye ve E-gsr'de %62,2'ye düştüğünü rapor etmişlerdir. Sonuç olarak, artan Cr(VI) konsantrasyonuna paralel şekilde giderme oranlarında azalmalar olduğu rapor edilmiştir. Wang ve arkadaşları (2021), *E. coli*'nin hücre yüzeyine Cr(III) adsorpsiyon proteinini (MerP) eksprese etmişler ve ardından

Cr(III) adsorpsiyonunu kolaylaştırmak için onu bir manyetik pellet sistemi ile birleştirmişlerdir. Elde edilen *E. coli* M-BL21 suşunun, 2,38 mmol/g Cr(III)'yi absorbe ettiğini gözlemlemişlerdir.

4.2.2. MT2A ve MT3 Genlerinin Suşların Pb Giderim Oranlarına Etkisi

Bu çalışmada, suşların Cr giderme ve Cr(VI) indirgenme oranlarına benzer şekilde Pb giderim oranlarının Pb konsantrasyonu arttıkça azaldığı tespit edilmiştir. Hücrelerin en yüksek Pb konsantrasyonundaki (100 mg/L) Pb giderim oranları: MT3 > MT2A > *E. coli* Jm109. Çalışmada tüm Pb konsantrasyonlarında en yüksek Pb gideriminin MT3 suşunda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.17). Pb'nin mikrobiyal biyobirikim kapasitesi ile ilgili benzer çalışmalar literatürde bulunmaktadır. Bu bağlamda, *Pseudomonas* BC15 (Sharma ve Shukla, 2021), *Enterobacter* sp. J1 (Raja vd., 2006) ve *B. cereus* BPS9'un (Lu vd., 2006) Pb'yi sırasıyla %65, %75 ve %78 oranlarında biriktirdiği rapor edilmiştir. Literatürde yabancı türler dışında, farklı MT genleri klonlanmış bakterilerle sulu çözeltilerden Pb giderim çalışmaları da bulunmaktadır. Örneğin, bir çalışmada Pb'nin mısır MT1 geni klonlanan *E. coli* BL21 suşuna kontrol suşundan daha yüksek bağlanma affinitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Duan vd., 2018). Benzer bir çalışmada, tip 2 pirinç MT (GST-OsMTI-2b) geni klonlanan rekombinant *E. coli* DE3 suşunun kontrole göre daha fazla Pb biriktirdiği ve bu metale karşı daha yüksek toleransa sahip olduğu rapor edilmiştir (Pirzadeh ve Shahpiri, 2016). Keshav ve ark (2019) tarafından *Cupriavidus metallidurans* CH34'ün pbrD geni *E. coli* BL21 (DE3) bakterisine klonlanmıştır. Rekombinant suşun 0,05 µM Pb'yi %99,7 oranında giderdiği saptanmıştır. Başka bir çalışmada ise ZraS/ZraR iki bileşenli hücre dışı Pb ve Zn algılama ve giderme sistemlerinin aktarıldığı *E. coli* suşunun 1 mM Pb'yi %48,6 oranında giderdiği ve 1 gr kuru hücre başına 487 µmol Pb'nin hücre yüzeyinde bağlandığı tespit edilmiştir (Maruthamuthu vd., 2015). Shehata ve Yamazaki (2018), *Cupriavidus metallidurans* CH34 suşunun Pb bağlayan PbrR genini ve *Synechococcus* suşunun SmtB MT genini *E. coli*'ye ekprese etmişlerdir. Isı uygulanmış ölü rekombinant *E. coli* (PbrR/SmtB-AT) biyosorbentinin, 100 mg/L Pb'yi %77 oranında (12 saat sonunda) giderdiği ve kuru hücre başına 31,8 mg Pb'nin bağlandığı rapor edilmiştir. Bu çalışmalar yabancı suşlardan ziyade rekombinant suşlar tarafından sulu çözeltilerden daha fazla Cr ve Pb giderimi yapıldığına dair bu çalışmadaki bulguları desteklemektedir. Ancak metal giderme etkinliği, kullanılan bakteri türüne, klonlanan genin özelliklerine, uygulama süresine, başlangıç metal

konsantrasyonuna ve ortamın çevresel koşullarına (pH, sıcaklık vb.) göre değişmektedir (Fernández vd., 2018).

4.3. Ortam Çevresel Koşullarının Cr ve Pb Biyosorpsiyonu Üzerine Etkileri

4.3.1. pH'nın Cr Biyosorpsiyonuna Etkisi

Çözeltinin pH'sı Cr biyosorpsiyonunu önemli ölçüde etkilemektedir. pH, hücre yüzeyindeki iyonlaşma derecesini ve metal çözeltisinin kimyasını etkilemektedir (Ghoneim vd., 2014). Metal iyonları ve fenolik hidroksil fonksiyonel gruplar arasındaki koordinasyon bağları ve biyokütle yüzeyindeki diğer iyon bağlayan bölgeler hafif asidik çözeltilerde (pH 3-5) oldukça zayıf olduğundan, sorpsiyon kapasitesi artan pH ile azalır (Argun vd., 2007). Literatürde bu konuda yapılan çalışmalar incelendiğinde, düşük pH'nın Cr biyosorpsiyonunu arttırdığı sonucuna varılabilir. Yang ve arkadaşları (2020), bakteriyel alg aerobik granüler çamurunun düşük pH'larda daha yüksek biyosorpsiyon verimine sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bir çalışmada, pH 1 ve pH 2'nin Cr(VI)'nın Cr(III)'e indirgenmesi için uygun olduğu tespit edilmiş, ancak pH 1'de biyokütlenin büyük olasılıkla tamamen protonlanarak, katyon ile katyon arasındaki yüklerin birbirini itmesi nedeniyle Cr(III)'e olan yüzeydeki affinitenin sınırlandığı bildirilmiştir. Ayrıca pH 2'de biyokütledeki protonlaşmanın daha düşük derecede meydana gelebileceği ve hücre yüzeyinin Cr'yi bağlamak için yeterli negatif yüke sahip olacağı rapor edilmiştir (Silva vd., 2009). Bir diğer çalışmada, ölü *B. salmalaya* 139SI suşunun en yüksek Cr(VI) biyosorpsiyon oranının pH 3'te olduğu saptanmıştır (Dadrasnia vd., 2015). Bu çalışmada Şekil 3.19 incelendiğinde, pH artışı ile birlikte Cr gideriminin azaldığı görülmektedir. En yüksek Cr gideriminin, pH 2'de %80 oranında olduğu bulunmuştur. Ancak artan pH ile bu oranın yaklaşık 8 kat azaldığı tespit edilmiştir. Bu bağlamda ortamın pH'sı azaldıkça biyokütle yüzeyinde bulunan fonksiyonel gruplar pozitif yüklenmektedir. Cr(VI), pH 1-6 arasındaki çözeltilerde $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ (dikromat) ve HCrO_4^- (hidrojen kromat) şeklinde anyonik halde bulunur. Düşük pH'da biyokütlenin pozitif yüklü grupları tarafından bu anyonik Cr formları biyosorbe edilir (Vinodhini ve Das, 2009). Çalışmada, düşük pH'da MT2A biyosorbentinin yüzeyinin protonlanması, ortamdaki $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ve HCrO_4^- anyonik iyonlarının biyosorbente daha fazla bağlanmasına yol açtığı gözlemlenmiştir.

4.3.2. Sıcaklığın Cr Biyosorpsiyonuna Etkisi

Metal biyosorpsiyonunda sıcaklık, diğer fizikokimyasal faktörlerin etkisiyle karşılaştırıldığında daha az önemlidir. Çünkü biyosorpsiyonun enerjiden bağımsız mekanizmalar olarak sıcaklıktan daha az etkilenmesi beklenir (Özdemir vd., 2009). Literatürde bu konuda yapılmış çalışmalar mevcuttur. Sarı ve Tuzen (2008) yürüttükleri çalışmada, *C. Virgatum* ile Cr biyosorpsiyonunun en iyi 25 °C’de gerçekleştiğini, sıcaklık artışı ile birlikte biyosorpsiyonun azaldığını rapor etmişlerdir. Bir çalışmada, *Synechocystis* sp. biyokütlesinin Cr(VI)’yı maksimum 25 °C’de biyosorbe ettiği tespit edilmiştir (Öztürk, 2008). Dadrasnia ve ark. (2015) tarafından, *B. salmalaya* 139SI suşunun Cr(VI) biyosorpsiyonunun en yüksek 25 °C’de gerçekleştiği rapor edilmiştir. Literatürde bu konuda yapılan çalışmalar ile bu çalışmadaki bulgular uyumludur (Masoudzadeh vd., 2011; Khadivinia vd., 2014). Şekil 3.20 incelendiğinde, MT2A biyosorbentinin en yüksek Cr biyosorpsiyon kapasitesinin 25 °C’de %77 oranında olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca sıcaklık artışı ile birlikte Cr biyosorpsiyon oranının azaldığı gözlemlenmiştir.

4.3.3. Temas Süresinin Cr Biyosorpsiyonuna Etkisi

Metallerin biyosorpsiyonunda en önemli parametrelerden biri de temas süresidir. Biyosorpsiyon başlangıçta temas süresi ile birlikte lineer olarak artar ancak optimum temas süresinden sonra biyosorbent doyum noktasına ulaşır ve metal bağlanma oranında azalmalar gerçekleşir. Biyosorbentlerin doyum noktasına ulaşması, metalin özelliklerine, mikroorganizmanın türüne ve yüzeyindeki bağlanma bölgelerine göre değişmektedir (Kumar vd., 2007). Öztürk (2008) tez çalışmasında, *Synechocystis* sp. BASO670 ölü biyokütlesinin Cr(VI) biyosorpsiyonunun ilk 40 dakika boyunca arttığını, 60. dakikada itibaren sabitlendiğini ileri sürmüştür. Şekil 3.21 incelendiğinde, MT2A biyosorbentinin Cr biyosorpsiyon oranının 40. dakikaya kadar arttığı, ancak 60. dakika en yüksek kapasiteye (100 mg/L Cr’nin %70’ini giderdiği) ulaştığı tespit edilmiştir. Bu nedenle optimum temas süresi 60 dakika olarak belirlenmiştir.

4.3.4. Biyosorbent Konsantrasyonunun Cr Biyosorpsiyonuna Etkisi

Cr biyosorpsiyonu üzerine MT2A biyosorbent konsantrasyonunun etkisi araştırılırken 0,05-0,2 g ölü biyokütle konsantrasyonları kullanılmıştır. Bu etkiyi anlamak için Şekil 3.22’ye bakılırsa, Cr biyosorpsiyon veriminin biyokütle konsantrasyonu 0,1 gr’a ulaşana

kadar lineer olarak arttığı ancak bu konsantrasyondan sonra giderim veriminde önemli bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca 0,1 g biyosorbent konsantrasyonundan sonra biyosorpsiyonun dengeye ulaşarak sabitlendiği gözlemlenmiştir. Biyosorbent konsantrasyonunun artması bağlanma bölgelerinin üst üste gelmesine veya agregasyon olmasına neden olur. Böylece biyosorbent doygunluğa ulaşır ve giderim verimi sabitlenir (Karthikeyan vd., 2007). Bir çalışmada temas süresinin ilk dakikalarında, artan *Bacillus* sp. BZ-1 biyokütle konsantrasyonunun Cr adsorpsiyon hızını önemli ölçüde arttırabileceği ileri sürülmüştür. Ancak, 40 g/L biyokütle konsantrasyonuna ulaşıldığında adsorpsiyon oranının (%94) maksimum seviyeye gelerek sabitlendiği saptanmıştır (Ren vd., 2015). Ekmekyapar ve arkadaşları (2006), yüksek biyokütle konsantrasyonlarının etkin adsorpsiyon alanının azalmasına ve biyosorpsiyon sırasında çökeltme oluşumuna neden olabileceğini rapor etmişlerdir. Ayrıca adsorpsiyon oranı sabitlendikten sonra, biyokütle konsantrasyonunda yapılan artışların adsorpsiyonun azalmasına neden olduğunu ileri sürmüşlerdir.

4.3.5. Başlangıç Cr Konsantrasyonunun Cr Biyosorpsiyonuna Etkisi

Metallerin biyosorbentlere bağlanması, metalin türüne ve konsantrasyonuna, biyosorbentin türüne, özelliklerine ve yapısına (metal bağlayan fonksiyonel gruplar, metal bağlayıcı proteinler vb.), ortam koşullarına (pH, sıcaklık, temas süresi) bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Öztürk, 2008). Şekil 3.23 incelendiğinde, Cr konsantrasyonu arttıkça biyosorpsiyon veriminde azalmalar olduğu gözlemlenmiştir. Ancak adsorpsiyon kapasitesinin 150 mg/L Cr'ye kadar lineer olarak arttığı daha yüksek konsantrasyonlarda artış oranının azalarak dengeye ulaştığı tespit edilmiştir. Bu bağlamda biyosorpsiyon ve adsorpsiyon prosesleri için optimum Cr konsantrasyonu 150 mg/L olarak belirlenmiştir. Bermudez ve arkadaşları (2012) tarafından biyokütle yüzeyinin sınırlı bağlanma bölgelerine sahip olduğu ve bu bölgelerde adsorpsiyon tamamlandıktan sonra daha fazla Cr alımının mümkün olmadığı saptanmıştır. Ayrıca Cr konsantrasyonu 10 mg/L'den 50 mg/L'ye çıkarıldığında *S. Muticum*'un adsorpsiyon kapasitesinin 14,5'ten 50,7 mg/g'ye yükseldiği rapor edilmiştir. Hücrelerde sınırlı sayıda bağlanma bölgesi bulunduğundan, adsorpsiyon kapasitesi, daha yüksek metal iyonu konsantrasyonlarında doygunluk gösterebilir. Bu duruma yüksek konsantrasyondaki Cr iyonlarının biyosorbente bağlanmak için birbiri ile rekabete girmesi neden olabilir (Rezaei, 2016). Çözeltideki Cr sayısı, biyokütle yüzeyindeki adsorpsiyon bölgelerine eşit olduğunda maksimum adsorpsiyon

kapasitesine ulaşılır (Zhang vd., 2020). Yu ve arkadaşları (2003), yüksek metal konsantrasyonlarında mevcut biyosorpsiyon bölgelerinin daha az sayıda yer aldığını ve metal iyonlarının giderim yüzdelerinin başlangıç konsantrasyonuna bağlı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Dadrasnia ve arkadaşları (2015) yapmış oldukları çalışmada, *B. salmaya* suşunun 50 mg/L Cr'yi %92 oranında giderdiğini ve 1 gr kuru hücre başına 46 mg Cr'yi bağladığını bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada, *Morganella morganii* biyokütlesinin 50,1; 78,5 ve 97,5 mg/L Cr'yi sırasıyla %83,4; 69,4 ve %54 oranında giderdiği tespit edilmiştir. Ayrıca 3 saatlik temas süresi sonunda uygulanan bu Cr konsantrasyonlarının adsorpsiyon kapasitelerinin sırasıyla, 21,3 mg/g; 25 mg/g ve 23 mg/g olduğu saptanmıştır (Ergül Ülger vd., 2014). Sultan ve ark (2012), *B. cereus*, *B. pumilis* ve *P. agglomerans* ölü biyokütlelerinin 50 mg/L Cr'yi sırasıyla, %90; %89 ve %85 oranında giderdiğini bulmuşlardır. Bu biyokütlelerin 2 saatlik temas süresi sonunda adsorpsiyon kapasitelerini sırasıyla, 11,3 mg/g; 11,2 mg/g ve 10,7 mg/g bulmuşlardır. Tez çalışmasında, MT2A biyosorbentinin 1 saatlik temas süresi sonunda 50, 100, 150, 200, 225 ve 250 mg/L Cr'nin giderim oranları sırasıyla, %92, %85, %81, %62, %56 ve %50 olarak bulunmuştur. Ayrıca MT2A biyosorbentinin bu konsantrasyonlardaki adsorpsiyon kapasiteleleri sırasıyla, 46 ± 1 mg Cr/g biyokütle, $84,6 \pm 3$ mg Cr/g biyokütle, $121,5 \pm 3$ mg Cr/g biyokütle, 124 ± 2 mg Cr/g biyokütle, $124,9 \pm 2$ mg Cr/g biyokütle ve $125,1 \pm 3$ mg Cr/g biyokütle olarak belirlenmiştir (Şekil 3.23). Literatürdeki benzer çalışmalar ile bu çalışmadaki bulgular kıyaslandığında temas süresinin kısa, biyosorpsiyon ve adsorpsiyon kapasitesitelerinin yüksek olması MT2A biyosorbentinin Cr gideriminde oldukça avantajlı olduğunu göstermektedir.

4.4. Ortam Çevresel Koşullarının Pb Biyosorpsiyonu Üzerine Etkileri

4.4.1. pH'nın Pb Biyosorpsiyonuna Etkisi

pH, metallerin çözünürlüğünü ve biyokütlenin hücre duvarlarındaki fonksiyonel gruplarını etkileyen en önemli parametrelerden biridir. Bakteri hücre duvarındaki karboksil (-COOH), hidroksil (OH^-), sülfid (S^{2-}) ve fosfat (PO_4^{3-}) gibi fonksiyonel gruplar pH 4'ün altında pozitif yüklenir. Bu durumda Pb^{+2} iyonları, biyokütle yüzeyine bağlanmak için ortamdaki H^+ iyonları ile yarışa girer ve Pb adsorpsiyon oranının azalmasına neden olur (Arief vd., 2008). Bu olay, Pb katyonik türleri ile bakteri hücre yüzeyinde bulunan anyonik ligandlar arasındaki güçlü elektrostatik çekim kuvveti

sonucunda gerçekleşmektedir (Mohapatra vd., 2019). Artan pH ile biyokütle yüzeyindeki fonksiyonel gruplar iyonlaşır ve biyosorpsiyon oranı artar (Ren vd., 2015). Öte yandan alkali pH'larda (> 7) Pb, kurşun (II) hidroksit ($\text{Pb}(\text{OH})_2$) formunda çöker ve kurşun hidroksit $\text{Pb}(\text{OH})^+$, Pb(II) sorpsiyon veriminin azalmasına neden olur (Ren vd., 2015). Bu nedenle çok yüksek pH'lar Pb giderimi için uygun değildir. *Bacillus* sp. PZ biyokütlesi kullanılarak Pb gideriminin yapıldığı bir çalışmada, en yüksek Pb biyosorpsiyon oranının pH 5'te olduğu rapor edilmiştir (Ren vd., 2015). Shehata ve Yamazaki (2018), rekombinant *E.coli* (PbrR/SmtB-AT) biyokütlesinin en yüksek Pb gideriminin pH 6'da gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Bu konuda yapılan çalışmalar, bu tez çalışmasında elde edilen bulguları desteklemektedir. Çalışmada, MT3 biyosorbentinin maksimum Pb biyosorpsiyon oranına (%83) pH 5'te ulaştığı tespit edilmiştir.

4.4.2. Sıcaklığın Pb Biyosorpsiyonuna Etkisi

Sıcaklık, reaksiyonun ekzotermik veya endotermik olmasına bağlı olarak adsorbat (kirletici madde) denge kapasitesini etkilemektedir (Al-Qodah, 2006). Sıcaklığın Pb biyosorpsiyonu üzerindeki etkisini görmek için Şekil 3.25 incelendiğinde, sıcaklığın 25 °C'den 30 °C'ye çıkarıldığında en yüksek Pb giderim kapasitesine (%79) ulaşıldığı tespit edilmiştir. Daha yüksek sıcaklıklarda ise Pb biyosorpsiyon veriminin azaldığı görülmüştür. Sıcaklık artışı ile birlikte Pb biyosorpsiyonunun azalması biyosorpsiyonun ekzotermik olduğu anlamına gelir. Bu durum, artan sıcaklıkların Van der Waals kuvvetlerini azaltmasından kaynaklanıyor olabilir (Kayacan, 2007). Rekombinant *E. coli* (PbrR/SmtB-AT) biyokütlesi ile Pb biyosorpsiyonunun yapıldığı bir çalışmada, düşük sıcaklıklarda biyosorpsiyon kapasitesinde azalmalar olduğu rapor edilmiştir (Shehata ve Yamazaki, 2018). Puranik ve Paknikar (1999) sıcaklık artışının, *Citrobacter* MCM B-181 biyokütlesinin Pb^{+2} , Cd^{+2} ve Zn^{+2} gibi metal iyonlarının biyosorpsiyon veriminde azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu bağlamda, yüksek sıcaklıkların biyosorbent yüzeyinde bulunan fonksiyonel metal bağlama bölgelerine zarar verdiğini rapor etmişlerdir. Bir çalışmada ise Cr(VI), Pb ve Cd'nin *Staphylococcus saprophyticus* tarafından bağlanması için 20 °C ila 35 °C'nin uygun olduğu bildirilmiştir (İlhan vd., 2004). Oves ve arkadaşları (2013), 20 °C–35 °C sıcaklık aralığında Pb, Cu ve Cd'nin *B. thuringiensis* OSM29 tarafından yüksek verimde giderildiğini belirtmişlerdir. Bu bilgiler ışığında, yüksek sıcaklıkların biyosorbent yüzeyine zarar vererek biyosorpsiyon oranını düşürdüğü sonucuna varılabilir.

4.4.3. Temas Süresinin Pb Biyosorpsiyonuna Etkisi

Çalışmada, MT3 biyosorbentinin farklı temas sürelerindeki (20-240 dakika) Pb biyosorpsiyon oranları araştırılmıştır. Zamana bağlı olarak Pb biyosorpsiyonunun, en yüksek 120. dakikada (%78) olduğu ve bu süreden sonra dengeye ulaşarak Pb gideriminde kayda değer bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 3.26). Biyosorpsiyon hızının, sabit bir metal konsantrasyonuna ulaştıktan sonra azaldığı görülmüştür. Metal alımındaki bu değişiklikler başlangıçta biyosorbent yüzeyindeki bağlanma bölgelerinin boş olması ve çözünen konsantrasyonunun yüksek olmasından kaynaklanabilir (Wierzba ve Latala, 2010). 120. dakikadan sonra bakteri hücre duvarında az sayıda yüzey aktif bölge kalması nedeniyle Pb alımı neredeyse değişmemiş ve biyosorpsiyonun dengeye ulaştığı gözlemlenmiştir.

4.4.4. Biyosorbent Konsantrasyonunun Pb Biyosorpsiyonuna Etkisi

Biyosorbent konsantrasyonu ağır metallerin biyosorpsiyon sürecini etkileyen önemli parametrelerden biridir. Biyosorbent konsantrasyonunun artması ağır metallerin bağlanmasında etkili olan bağlanma bölgelerinin sayısını artırarak biyosorpsiyon verimini arttırabilir. Ancak biyosorpsiyon hızı belirli bir limit değere kadar artar, bundan sonra biyokütle miktarındaki artışla birlikte azalır. Dengeye ulaşıldığında düşük biyokütle konsantrasyonu, yüksek biyokütle konsantrasyonundan daha fazla metal iyonunu bağlar (Rani vd., 2010). Ayrıca yüksek biyokütle etkin adsorpsiyon alanını azaltarak çökelti oluşumuna neden olabilir (Ekmekyapar vd., 2006). Bu nedenle yüksek biyokütle konsantrasyonu metallerin biyosorbent yüzeyine bağlanmasını engeller. Biyosorpsiyon uygulamalarında yüksek biyokütle konsantrasyonları biyokütle üretim maliyetini arttırmaktadır. Ekonomik açıdan da optimum konsantrasyonun belirlenmesi esastır (Priyadarshane ve Das, 2021). Şekil 3.27 incelendiğinde, MT3'ün en yüksek Pb biyosorpsiyon verimi (%78) 0,2 g biyosorbent kullanıldığında tespit edilmiştir. Daha yüksek biyosorbent konsantrasyonlarında, biyosorpsiyon hızında kayda değer bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Benzer durum, *Staphylococcus xylosus* (Aryal vd., 2010) ve *Mesorhizobium amorphae* biyokütlesinde (Xie vd., 2013) gözlemlenmiştir.

4.4.5. Başlangıç Pb Konsantrasyonunun Pb Biyosorpsiyonuna Etkisi

Bu tez çalışmasında artan Pb konsantrasyonu ile birlikte biyosorpsiyon oranının azaldığı tespit edilmiştir. Ancak Şekil 3.28 incelendiğinde, artan Pb konsantrasyonlarında

biyosorbentin adsorpsiyon kapasitesinin arttığı ve daha sonra dengeye ulaştığı gözlemlenmiştir. Tez çalışmasında, MT3 biyosorbentinin 2 saatlik temas süresi sonunda, 50, 100, 150 ve 200 mg/L Pb konsantrasyonlarında biyosorpsiyon oranları sırasıyla, %90, %85, %61 ve %48 olarak bulunmuştur. MT3 biyosorbentinin bu Pb konsantrasyonları için Pb adsorpsiyon kapasitesi sırasıyla; $22,5 \pm 1$ mg/g, $42,5 \pm 1$ mg/g, 46 ± 2 mg/g ve 48 ± 2 mg/g olarak belirlenmiştir. Bu konuda literatürde çalışmalar mevcuttur. Wierzba ve Lata (2010), başlangıç Pb konsantrasyonunu 50 mg/L'den 300 mg/L'ye çıkardıklarında, *P. fluorescens* ve *B. pumilus* ölü biyokütlelerinin adsorpsiyon kapasitelerinin sırasıyla 22 mg/g'dan 48 mg/g'a ve 31 mg/g'dan 53 mg/g'a çıktığını tespit etmişlerdir. Wang ve Chen (2009), metal konsantrasyonunun azalmasıyla biyosorpsiyon hızının arttığını ve yüksek metal konsantrasyonlarının metal giderim hızında önemli derecede azalmaya neden olduğunu rapor etmişlerdir. Jin ve arkadaşları (2016), Pb konsantrasyonunu 80 mg/L'den 109 mg/L'ye çıkardıklarında, *Arthrobacter* sp. 25'in adsorpsiyon kapasitesinin kademeli olarak arttığını ve 109 mg/L'den daha yüksek konsantrasyonlarda adsorpsiyonun azaldığını rapor etmişlerdir. Başka bir çalışmada, 100 mg/L Pb'ye maruz bırakılan *Arthrobacter* GQ-9'un maksimum Pb adsorpsiyon ve biyosorpsiyon kapasiteleri sırasıyla, 17,6 mg Pb/g kuru hücre ve %21,6 olarak bulunmuştur. Çalışmada sonuç olarak, artan Pb konsantrasyonlarının rekabetçi adsorpsiyona ve yetersiz adsorpsiyon bölgelerine neden olarak biyosorpsiyon oranında azalmaya yol açtığı ileri sürülmüştür (Wang vd., 2018). Literatürde rekombinant biyokütleler ile Pb biyosorpsiyonunun yapıldığı çalışmalar da bulunmaktadır. Shehata ve Yamazaki (2018), PbrR-SmtB-AT genlerini içeren rekombinant *E. coli* ölü biyokütlesinin 12 saat temas süresi sonunda 100 mg/L Pb'nin %77'sini giderdiğini ve 1 gram kuru biyokütlenin 40 mg Pb'yi bağladığını bildirmişlerdir. Kao ve arkadaşları (2006), memeli ve balık MT genlerini klonladıkları rekombinant suşun, 4 saat sonunda, Pb adsorpsiyon kapasitesinin 40 mg Pb/g kuru hücre ve biyosorpsiyon oranının %98 olduğunu belirlemişlerdir. Bu tez çalışmasında sonuç olarak, rekombinant ve yabanıl biyosorbentlerin kullanıldığı literatürdeki çalışmalara kıyasla, MT3 biyosorbentinin Pb biyosorpsiyon süresinin kısa olması, giderim oranının yüksek olması ve maliyetinin düşük olması önemli avantajları olduğu görülmüştür.

4.5. MT2A ve MT3 Biyosorbentlerinin Tekrar Kullanılabilirliği

Biyosorpsiyon oranı ilk döngülerde yüksek olup döngü sayısı arttıkça kademeli olarak azalmaktadır. Bu durum, metal bağlama bölgeleri ile ilişkilendirilebilir. Biyosorbentin

tercih edilmesini, hızlı metal adsorpsiyonu, kolay desorpsiyon, biyosorbentin maliyeti ve yeniden kullanılabilirlik yetenekleri etkilemektedir. Adsorbanların malzeme maliyetini azaltmak için desorpsiyon ve yeniden kullanılabilirlik en önemli faktörlerdir. Biyosorpsiyon/desorpsiyon döngüleri, MT2A ve MT3 biyosorbentlerinin yeniden kullanılabilirliğini incelemek için art arda 5 kez gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.29 incelendiğinde, MT2A biyosorbentinin 5 ardışık biyosorpsiyon/desorpsiyon döngüsünü yüksek performansta gerçekleştirdiği saptanmıştır. Son döngüde, ilk döngüye kıyasla biyosorpsiyon ve desorpsiyon oranlarının sırasıyla 1,4 ve 1,8 kat azaldığı tespit edilmiştir. Art arda yapılan biyosorpsiyon/desorpsiyon döngülerinden sonra bu oranların azalması beklenen bir durumdur. Benzer durumlar literatür çalışmalarında da tespit edilmiştir. Bazzazzadeh ve arkadaşları (2020), HNO_3 desorpsiyon çözeltisi ile süspanse ettikleri *S. tenerrimum* biyokütlesinin adsorpsiyon/desorpsiyon döngüsünün 5 kere tekrarlanabileceğini saptamışlardır. Bir başka çalışmada, *Leiotrametes flavida* biyokütlesinin optimum koşullarda Cr(VI) 'yı %72,4 oranında adsorbe ettiğini rapor etmişlerdir. Biyokütle 1M NaOH ile desorbe edildikten sonra Cr(VI) 'nın adsorpsiyon oranlarını birinci, ikinci ve üçüncü döngü sonunda sırasıyla %60, %45 ve %30 olarak bulmuşlardır. Tekrarlanan kullanımlarda adsorpsiyondaki azalmaların alkali koşullar altında desorbe edilmeyen biyokütlenin fonksiyonel gruplarına sıkıca bağlanan Cr iyonlarından kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır (Antony vd., 2020). Pb'nin MT3 biyosorbenti biyosorpsiyon/desorpsiyon döngüsünü incelemek için Şekil 3.30'a bakıldığında, bu döngünün 4 defa art arda etkili bir şekilde gerçekleşebileceği belirlenmiştir. Ancak artan döngü sayısına paralel olarak biyosorpsiyon ve desorpsiyon oranlarının azaldığı tespit edilmiştir. 4 döngü sonunda, ilk döngüye kıyasla biyosorpsiyon ve desorpsiyon oranlarının sırasıyla 1,5 ve 1,8 kat azaldığı gözlemlenmiştir. Desorpsiyon (rejenerasyon) işleminin ardından biyosorpsiyon kapasitelerindeki azalmaya biyosorbent kaybı, biyosorbentin yapısal hasarı ve metal kompleksi tarafından bağlanma bölgelerinin tıkanması gibi çeşitli faktörler neden olabilir (Huang ve Liu, 2013).

4.6. Adsorpsiyon İzotermi

Çalışmada Cr ve Pb'nin yaygın olarak kullanılan Langmuir ve Freundlich izoterm modellerine uygunluğu araştırılmıştır. Cr ve Pb'nin adsorpsiyon izotermi korelasyon (R^2) değerleri incelendiğinde, her iki metalin de Langmuir izoterm modeline daha uygun olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 3.2-3.3). Bu da Cr ve Pb adsorpsiyonunun tek

katmanlı ve homojen biyosorbent yüzeyinde gerçekleştiği anlamına gelmektedir. Bu çalışmadaki bulgular benzer şekilde *Aeromonas caviae* (Loukidou vd., 2004), *Laminaria japonica* (Wang vd., 2008) ve *Pseudomonas* sp (Ziagova vd., 2007) biyosorbentleri ile Cr adsorpsiyonunun Langmuir izoterm modeline uygun olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Cr için, Langmuir izoterm modelinde R_L boyutsuz tersinirlik değerleri; 0,02-0,1 arasında olması (R_L değerlerinin 0 ile 1 arasında olması) Langmuir izoterm modeline uygun olduğunu doğrulamaktadır. Tablo 4.1’de Cr ve Pb’nin boyutsuz bir katsayı olan

Metal	Başlangıç Metal Konsantrasyonu (mg/L)	R_L	Değerlendirme	R_L değerleri
Cr	50	0,11	Elverişli	
	100	0,05		
	150	0,04		
	200	0,03		
	250	0,02		
Pb	50	0,08	Elverişli	
	100	0,04		
	150	0,03		
	200	0,02		

verilmiştir.

Tablo 4.1. Biyosorpsiyonun R_L değerlerine göre değerlendirilmesi

Tablo 4.1 incelendiğinde, Cr ve Pb'nin bütün başlangıç konsantrasyonlarının R_L değerlerinin 0-1 arasında olduğu tespit edilmiştir. Bu aralıktaki R_L değerleri adsorpsiyona elverişli olduğunu göstermektedir (Al-Ghouti ve Daana, 2020). Langmuir modeli kullanılarak tahmin edilen Cr'nin q_m (maksimum biyosorpsiyon kapasitesi) 133,33 mg/g iken, biyosorpsiyon deneylerinde en yüksek Cr biyosorpsiyon kapasitesi 125,1 mg/g bulunmuştur. Tablo 3.3 incelendiğinde, Langmuir izoterm modelinde Pb'nin hesaplanan q_m değeri 50 mg/g iken, deneysel Pb biyosorpsiyon kapasitesi 48 mg/g bulunmuştur. Tunalı Akar ve arkadaşları (2009), *Symphoricarpus albus* tarafından Pb'nin biyosorpsiyon verilerinin Langmuir izotermine daha iyi uyduğunu ve tek tabakalı maksimum biyosorpsiyon kapasitesinin 15 °C'de 46,4 mg/g olduğunu tespit etmişlerdir. Bir diğer çalışmada Pb biyosorpsiyonunun *Chelatococcus* sp. biyokütlesinde tek tabakalı olarak gerçekleştiği ve Langmuir izoterm modeline daha çok uyduğu rapor edilmiştir (Chintalpudi vd., 2021). Cr ve Pb adsorpsiyonunda deneyde elde edilen veriler ile Langmuir modeline göre hesaplanan q_m değerlerinin birbirine yakın olması yapılan deneylerin doğruluğunu göstermektedir. Sonuç olarak, Cr ve Pb'nin Langmuir izoterm modeline daha elverişli olduğu ve daha iyi açıklanabildiği tespit edilmiştir.

4.7. Adsorpsiyon Kinetiği

Cr ve Pb biyosorpsiyonlarının kinetiklerini incelemek için yalancı birinci dereceden ve yalancı ikinci dereceden kinetik modelleri kullanılmıştır. Tablo 3.5 ve Tablo 3.6 incelendiğinde, her iki metalin R^2 değerlerinin yalancı birinci dereceden kinetik modele daha uygun olduğu gözlemlenmiştir. Cr ve Pb için kinetik modeller kullanarak hesaplanan q_e değerleri ile deneyler sonucunda belirlenen q_e değerlerinin yalancı birinci dereceden kinetik modelde birbirlerine yakın olduğu görülmüştür (Tablo 3.5-3.6). Bu bağlamda Cr ve Pb biyosorpsiyonlarının yalancı birinci dereceden kinetiğe daha uygun olduğu ve bu model kullanılarak daha iyi açıklanabileceği sonucuna varılmıştır. Paul ve arkadaşları (2012), *Acinetobacter junii* biyosorbentinin Cr(VI) adsorpsiyonunun yalancı birinci dereceden kinetik modele uyduğunu bildirmiştir. Benzer gözlem *P. aeruginosa* PU21 biyosorbenti ile Pb adsorpsiyonunda da tespit edilmiştir (Lin ve Lai, 2006).

4.8. Adsorpsiyon Termodinamiği

Cr ve Pb biyosorpsiyonlarını termodinamik olarak incelemek için Tablo 3.6 ve Tablo 3.7'ye bakıldığında, Cr ve Pb'nin ΔH değerlerinin negatif olduğu gözlemlenmiştir. Bu

da, her iki biyosorpsiyon prosesinin ekzotermik olduğu anlamına gelmektedir. Benzer şekilde Cr ve Pb'nin ΔS ve ΔG değerleri de negatif bulunmuştur. ΔS 'nin negatif olması, düzensizliğin azaldığı anlamına gelir. Çözünmüş Cr ve Pb moleküllerinin entropilerindeki azalma bu moleküllerin, çözeltideki düzensiz fazdan düzenli katı faza geçme eğilimlerinden kaynaklanır (Kayacan, 2007). Cr ve Pb'nin tüm sıcaklıklardaki ΔG değerleri negatif bulunmuştur. Bu da Cr ve Pb biyosorpsiyonlarının dışardan enerjiye ihtiyaç duymadan kendiliğinden gerçekleştiği ve iki metalin biyosorpsiyonlarının fiziksel olduğu anlamına gelir (Savcı, 2010).

4.9. Hücrelerin SEM ve STEM Analizi ile Cr ve Pb'nin Hücreler Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

4.9.1. Hücrelerin SEM Görüntüleri

Metal uygulandıktan sonra hücreye ne kadar zarar verdiğini ve metallerin hücre içinde mi yüzeyinde mi biriktiğini tespit etmek için hücrelerin SEM ve STEM görüntüleri alınmıştır. Hücrelerin SEM görüntülerini incelemek için Şekil 3.41, 3.42 ve 3.43'e bakıldığında, metal uygulanmayan kontrol hücrelerinin hücre yapılarının düzgün ve pürüzsüz olduğu, metal uygulanan tüm suşların morfolojik yapılarının bozulduğu, üst üste geldiği ve deformasyona uğradığı gözlemlenmiştir.

Cr(VI) uygulanan *E. coli* Jm109'un SEM görüntüsüne bakıldığında, hücrelerin üst üste bindiği ve uzadığı görülmüştür (Şekil 3.41 (b)). Cr(VI)'ya maruz kalan MT2A hücrelerinin üst üste bindiği, uzadığı ve dağıldığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.42 (b)). Şekil 3.43 (b)'ye bakıldığında Cr(VI) uygulanan MT3 suşunun uçlarında kopmalar ve kırılmalar olduğu tespit edilmiştir. SEM görüntülerinde Cr'ye maruz kalan hücrelerin morfolojisindeki değişiklikler ve EDX spektrumlarındaki Cr piki, Cr toksisitesine karşı hücreler için koruyucu bir strateji olarak hücre yüzeyinde veya içinde Cr(III) birikimini gösterebilir. Bu bilgilerden yola çıkarak çalışmada hücrelerde biriken Cr formunun Cr(III) olabileceği düşünülebilir.

Benzer durum Pb uygulanan hücrelerde de gözlemlenmiştir. Şekil 3.41 (c)'ye bakıldığında, Pb'ye maruz bırakılan *E. coli* Jm109'un hücre yüzeyinde bozulmalar olduğu ve hücrelerin yapıştığı tespit edilmiştir. Pb ile muamele edilmiş MT2A hücrelerinin, kontrol MT2A hücrelerine kıyasla daha yoğun ve daha pürüzlü bir yüzeye sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca kontrole kıyasla, Pb ile muamele edilmiş MT2A

hücrelerinin daha fazla hasar gördüğü ve birbirine yapıştığı tespit edilmiştir (Şekil 3.42 (c)). Pb uygulanan MT3 hücresinin kontrol MT3 hücresine kıyasla uç kısımlarında kırılmalar ve kopmalar olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.43 (c)). Pb uygulanan tüm hücrelerin EDX spektrumlarında Pb piki varken kontrol gruplarında Pb piki görülmemiştir (Şekil 3.41, 3.42, 3.43 (e-f)). Bu pikler hücre yüzeyinde Pb birikimi olduğu anlamına gelebilir. Cr ve Pb uygulandıktan sonra bakteri şeklindeki bu değişikliklerin nedeni, bakteri yüzeyinde biriken Cr ve Pb olabilir. Bir başka olası neden de bakteriler toksik metallere maruz kaldığında, hücrelerin kümeleşerek veya yapışarak bir araya gelip kendilerini korumak için savunma mekanizması geliştirebilmesidir (Karthik vd., 2017; Varınca vd., 2021). Strese bağlı morfolojik değişiklikler, hücrenin hayatta kalmasında, metabolik aktivitelerde dolayısıyla atıksudan metal gideriminde önemli bir role sahip olabilir (Garg vd., 2013). Literatürde bu çalışmadaki bulguları destekleyen araştırmalar bulunmaktadır. Naik ve arkadaşları (2012), ağır metal maruziyeti nedeniyle hücre şeklinde oluşan değişikliğin ağır metallerin toksisitesine direnmek için geliştirilen bir mekanizma olduğunu ileri sürmüştür. Karthik ve arkadaşları (2017), Cr(VI) uygulanan hücrelerin artan Cr(VI) konsantrasyonları ile küme benzeri morfoloji gösterdiğini bildirmişler ve hücrelerin küme oluşumlarının bakteri hücrelerini Cr tarafından indüklenen kimyasal strese maruz kalmaktan korumuş olabileceğini belirtmişlerdir. Garg ve arkadaşları (2013) benzer bir gözlem yaparak, 500 mg/L Cr(VI) uygulanan ve Cr(VI) uygulanmayan (kontrol) *P. putida* hücrelerinin SEM morfolojisindeki farklılıklara dikkat çekmiştir. Başka bir çalışmada, 100 mg/L Cr(VI) ve 160 mg/L Pb ayrı ayrı *Rhodobacter sphaeroides* SC01 hücresine uygulandıktan sonra hücrelerin büzüldüğü ve buruştuğu tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada, hücre kalıntılarının oluştuğu saptanmıştır (Su vd., 2020). Sagar ve arkadaşları (2017), ağır metal toksisitesine maruz kalan bakteri hücrelerinin yapışmasının ve fiziksel parçalanmasının, toplam yüzey alanında azalmaya neden olduğunu ileri sürmüştür. Literatürde rekombinant hücrelerin SEM görüntüleri ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Uçkun ve arkadaşları (2021a), 25 mg/L Cd uyguladıkları *E. coli* MT3 rekombinant suşunun SEM görüntülerinde, hücrelerin morfolojik yapılarının bozulduğunu ve uçlarının kırık olduğunu bildirmiştir. Bir başka çalışmada, 1 mg/L As'ye maruz bırakılan *E. coli* MT2'nin SEM görüntülerinde, hücrelerin birbirine yapıştığı, biraz uzadığı ve kontrole göre hafif süngerimsi bir görünüme sahip olduğu gözlemlenmiştir (Uçkun vd., 2021b). Das ve arkadaşları (2021), Cr(VI) uygulanan bakteri hücrelerinin EDX piklerinin hücrelerin dış yüzeyinde adsorbe

edilen veya çökeltilen Cr partiküllerinin, Cr(III) olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Öte yandan, Zhu ve arkadaşları (2008), Cr(VI) uyguladıkları bakteri hücrelerinin EDX piklerinin $\text{Cr}(\text{OH})_3$ 'ün hücre yüzeyine bağlanmasından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Benzer bulgu Pb uygulanan *Rhodobacter sphaeroides* SC01'in EDX analizinde görülmüştür (Su vd., 2020).

4.9.2. MT2A ve MT3 Hücrelerinin STEM Görüntüleri

Cr'nin MT2A hücresinde ve Pb'nin MT3 hücresinde, hücre içi birikimlerini tespit etmek için STEM analizi yapılmıştır. Şekil 3.44 (b)'ye bakıldığında 25 mg/L Cr(VI) uygulanan MT2A hücrelerinin STEM görüntülerinde, hücre içi Cr çökmesini temsil edebilecek bariz siyah noktalar görülmüştür. Bu siyah noktalar Cr(VI)'nın Cr(III)'e indirgenmiş formu olabilir. Cr uygulanmayan kontrol MT2A hücrelerinde ise bu siyah noktalar görülmemiştir (Şekil 3.44 (a)). Cr(VI)'nın çeşitli bakteri hücrelerine uygulanması sonucunda hücre içinde gözlenen bu siyah noktaların Cr(III) olabileceği farklı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Karthik vd., 2017; Liu vd., 2019; Sturm vd., 2018; Su vd., 2021; Zeng vd., 2019). Cr'ye maruz kalan başka hücreler ile ilgili yapılan çalışmalarda TEM görüntülerinde de bu çalışmadaki bulgulara benzer şekilde siyah nokta kümelerinin oluştuğu tespit edilmiştir. Li ve arkadaşları (2021), yürüttükleri çalışmada, STEM analizi ile bakterilerin (*Stenotrophomonas acidaminiphila* 4-1) hücre içindeki Cr varlığını parlak parçacıklar olarak belirlemiştir. Benzer şekilde farklı araştırmacılar da, bu siyah noktaların Cr(VI)'nın indirgenmesi sonucu oluşan Cr(III) olabileceği öne sürmüştür (Pei vd., 2020, Karthik vd., 2017; Liu vd., 2019; Sturm vd., 2018; Su vd., 2021; Zeng vd., 2019). Bu çalışmadaki bulguya benzer şekilde, Pei ve arkadaşları (2020), Cr(VI) uyguladıkları E-mcr geni klonlanan rekombinant *E. coli*'nin TEM görüntülerinde, hücrelerin içinde görülen siyah nokta kümelerinin Cr(III) olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Pb uygulanan MT3 hücrelerinin sitoplazmasında kontrollerinden farklı olarak kümeler bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.45 (b)). Pb uygulanan MT3 hücrelerinin sitoplazmik bölgesinde ince elektron yoğun opak partiküller gözlenirken, kontrol hücrelerinde bu tortular görülmemiştir (Şekil 3.44 (a)). Bakteri hücrelerinin içindeki bu kümelenmenin görünümünün, nanometrik Pb parçacıklarının hücre içi birikiminin bir göstergesi olduğu düşünülebilir. Bulgular, bu konuda yapılan çalışmalarla uyumludur. Teemu ve arkadaşları

(2008), Pb bağlanmasından sonra liyofilize *Bifidobacterium longum* ve *Lactobacillus fermentum* ME3'ün hücre yüzeyinde yoğun olarak Pb birikintisi olduğunu tespit etmişlerdir. Zhai ve arkadaşları (2016), bu birikime yüzey yükündeki değişikliğin neden olduğunu bakteri hücreleri tarafından bir tür kendini koruma mekanizması olabileceğini ve ağır metal maruziyeti ile artan yüzey proteinlerinin dejenerasyonunun ve hücrelerin toplanmasına yol açmış olabileceğini rapor etmişlerdir. Uçkun ve ark (2021a), Cd uyguladıkları rekombinant *E. coli* MT3 ve kontrol *E. coli* MT3 (Cd uygulanmamış) hücrelerinin STEM görüntülerinde önemli farklılıklar olduğunu tespit etmişlerdir. Cd uygulanan *E. coli* MT3 hücrelerinin sitoplazmasında kümeler oluştuğunu ve bu kümelerin Cd birikiminden kaynaklanıyor olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Pek çok araştırmacı, farklı ağır metalleri uyguladıkları bakteri hücrelerinin TEM görüntülerinde opak ve yoğun elektron parçacıklarının bulunduğunu gözlemlemişlerdir (Bhattacharya vd., 2013; Samuel vd., 2013; Yao vd., 2020; Shi vd., 2020). Bu araştırmalar elde edildiren bulguları desteklemektedir.

4.10. Fonksiyonel Grupların Cr ve Pb Biyosorpsiyonuna Etkisi

Çalışmada, bakteriyel fonksiyonel gruplar ile Cr ve Pb iyonları arasındaki etkileşimi araştırmak için FTIR spektrumları alınmıştır (Şekil 4.39-4.40). FTIR spektrumlarında kontrole kıyasla 25 mg/L Cr uygulandıktan sonra önemli piklerin olduğu ve yoğunluğunun değiştiği görülmüştür (Şekil 4.39). Bakterilerin yapısal bileşenleri olan oligosakkarit, protein ve lipid gruplarına ait pikler net olarak gözlemlenmiştir. Cr(VI) uygulandıktan sonra 1233 cm^{-1} , 1379 cm^{-1} , 1514 cm^{-1} ve 1632 cm^{-1} 'de bulunan piklerin 1225 cm^{-1} , 1387 cm^{-1} , 1531 cm^{-1} ve 1626 cm^{-1} piklerine kaydığı tespit edilmiştir. $3000\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$ aralığında görülen küçük omuz piki, protein yapısındaki N-H bağının hidrojen pikidir. Yaklaşık olarak 2850 cm^{-1} ve 2950 cm^{-1} aralığında görülen pikler alifatik C-H stres pikleridir (Ma vd., 2021). Bu pikler protein ve karbonhidrat yapılarından kaynaklanmaktadır. 1620 cm^{-1} 'deki amid I zirvesi ve 1530 cm^{-1} 'deki amid II zirvesi bakteri proteinlerinin neden olduğu amid (peptid) bağı C=O germe titreşimleridir (Zhang vd., 2019). Bakteri hücre duvarının yapısındaki gruplardan kaynaklanan P=O bağının yaklaşık 1220 cm^{-1} 'de piki görülmüştür. Özellikle C=O (karbonil) ve P=O (fosforil) gruplarının Cr iyonları ile etkileşimi ve koordinasyon yapılarının oluşması ile pik konumları değişmiştir. Bu değişikliğin nedeni koordinasyon yapısının oluşması, halka kararlılığı ve koordinasyon bağı kararlılığından dolayı bağların titreşmesidir. Cr iyonları

bakteri hücre yapılarında genellikle protein ve polisakkaritlerle koordinasyon oluşturur ve bu yapıların bir kısmı polisakkaritlerdeki serbest OH grupları ile etkileşir. Ancak OH grupları ile Cr iyonlarının etkileşimi sonunda bu bant pikinin şiddeti kontrole göre azalmıştır. Bu değişiklik Cr iyon koordinasyonundan kaynaklanmaktadır. Cr iyonunun etkisi altında gözlenen bir diğer değişiklik ise 518 cm^{-1} civarında gözlenen pikin genişlemesidir. Ayrıca literatürde hücre duvarındaki hidroksil ve karboksil gruplarının sadece Cr(III) bağlanmasının değil, bakterilerin de Cr(VI) indirgemesinde rol oynayabileceği belirtilmiştir (Mangaiyarkarasi vd., 2011). Dolayısıyla FTIR spektrumundaki bu değişiklik nedeniyle kontrolün FTIR spektrumundaki bazı grup piklerinin redoks reaksiyonlarına girerek azaldığı ve bazı grupların pik şiddetlerinin arttığı söylenebilir. Bu nedenle 518 cm^{-1} civarında pikin şiddeti artmıştır. Tüm bu piklerden bakteri hücre yapısında protein ve polisakkarit grupları ile Cr koordinasyonlarının olduğu görülmüştür. Ayrıca fosfolipid yapılarda P=O grupları ve Cr koordinasyonları gözlemlenmiştir. Ayrıca, Cr(VI)'nın Cr(III)'e indirgendiği görülmüştür. Sonuç olarak, Cr uygulanan hücrede etkili olan fonksiyonel gruplar; amino (amid I, amid II), fosforil ve karbonil olarak belirlenmiştir. Bu bağlamda, bakteri hücre yüzeyi fonksiyonel gruplar ile Cr iyonlarının koordine olabileceği ve ortamdaki ağır metal toksisitesini azaltmak için kullanılabileceği tespit edilmiştir. Hücreler, ağır metalleri bağlarken hücre duvarındaki fonksiyonel gruplarını değiştirerek zorlu koşullara dayanabilmektedir (Zakaria vd., 2007). Pradhan ve arkadaşları (2019), hücre duvarındaki amin, hidroksil ve karboksil gibi fonksiyonel grupların ağır metallerin emilimini sağladığını öne sürmüşlerdir. Karthik ve arkadaşları (2017), farklı konsantrasyonlarda Cr(VI) uyguladıkları *Cellulosimicrobium funkei* AR8 hücrelerinin FTIR sonuçlarında fonksiyonel grupların Cr(VI) konsantrasyonuna göre farklılık gösterdiğini belirlemişlerdir. FTIR analiz sonuçları incelendiğinde alkanlar, amidler ve amin fonksiyonel gruplarının Cr(VI) absorpsiyonunda etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Wu ve arkadaşları (2019), *Bacillus* sp.'ye Cr(VI) uygulamasından sonra krom oksit birikimine bağlı olarak bir hidroksil pikinin oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Bharagava ve Mishra (2018) araştırmalarında, Cr uyguladıkları hücrenin FTIR analizi sonuçlarında alken, karbonil ve nitro gibi farklı fonksiyonel grupların bulunduğunu belirlemişlerdir. Maurya ve arkadaşları (2022), Cr(VI)'ya maruz kalan *B. vallismortis* hücrelerinde amid I, hidroksil, karbonil ve karboksil fonksiyonel gruplarının Cr(VI)'nın bakteri hücre yüzeyine bağlanmasında etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Su ve arkadaşları (2021),

Cr'nin hücre duvarına fiziksel bağlanmasında amin, hidroksil, karboksil, fosforik ve sülfat fonksiyonel gruplarının etkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu araştırmalar, tezdeki FTIR sonuçlarına benzer olup çalışmayı desteklemektedir.

Şekil 4.40'a bakıldığında kontrol grubunun, 100 mg/L Pb ile muamele edilen hücreye kıyasla piklerin yerinin ve şiddetinin değiştiği görülmüştür. Bu değişiklikler, hücre yüzeyindeki fonksiyonel grupların aktivitesinden kaynaklanmaktadır ve Pb'nin hücre yüzeyine bağlandığını düşündürmektedir. FTIR analizi sonucunda, kontrol hücresindeki 3055 cm^{-1} , 2923 cm^{-1} , 2854 cm^{-1} , 1635 cm^{-1} , 1226 cm^{-1} , 1053 cm^{-1} , 519 cm^{-1} piklerinin Pb'ye maruz bırakılan hücrede 3062 cm^{-1} , 2937 cm^{-1} , 2875 cm^{-1} , 1625 cm^{-1} , 1219 cm^{-1} , 1049 cm^{-1} , 536 cm^{-1} piklerine kaydığı tespit edilmiştir. Kontroldeki 3055 cm^{-1} pikinin, Pb uygulanan örnekte 3062 cm^{-1} 'ye kaydığı tespit edilmiş ve pikin N-H (amin) bağına karşılık geldiği belirlenmiştir. Kontrol grubundaki 2923 cm^{-1} , 2854 cm^{-1} piklerinin, Pb uygulandıktan sonra sırasıyla 2937 cm^{-1} ve 2875 cm^{-1} piklerine kaydığı gözlemlenmiştir. Bu kaymalar, alifatik C-H (alkan) fonksiyonel grubunun Pb ile etkileşime girdiğini anlamına gelmektedir. Pb biyosorpsiyonu öncesinde 1635 cm^{-1} bandının Pb biyosorpsiyonu sonrasında 1625 cm^{-1} bandına kaydığı tespit edilmiştir. Bu pikler amid I (C=O) gerilme titreşimidir (Zhang vd., 2019). Kontrolde 1226 cm^{-1} titreşimi, Pb uygulandıktan sonra 1219 cm^{-1} 'ye kaymıştır. Bu da P=O grubunun spesifik bandıdır (Mangaiyarkarasi vd., 2011). Pb uygulanmadan önce 1053 cm^{-1} spektrumunun Pb uygulanan örnekte 1049 cm^{-1} 'ye kaydığı görülmüştür. Bu pik S=O (sülfoksit) titreşimine karşılık gelir. Polisakkarit gruplarında bulunan C-O gerilme titreşimi sonunda, kontrolde 519 cm^{-1} pikinin, Pb uygulanan örnekte 536 cm^{-1} 'e kaydığı belirlenmiştir. Tez çalışmasında MT3'ün Pb biyosorpsiyonunda, N-H (amin), C-H (alkan), C=O (amid I), P=O (fosforil), S=O (sülfoksit), C-O fonksiyonel gruplarının etkili olduğu tespit edilmiştir. Pb biyosorpsiyonuna katılan fonksiyonel grupları tespit etmek için birçok araştırmacı çalışmalar yapmıştır. Örneğin, Huang ve Liu (2013), *Pseudomonas* sp. LKS06'nın Pb biyosorpsiyonunda amin, karboksil, fosfat ve hidroksil gruplarının etkili olduğunu bildirmişlerdir. Sharma ve Shukla (2021) tarafından, *B. cereus* BPS-9'un Pb'yi bağlamada etkili olan fonksiyonel gruplar C-H, C=C, N=N, N-H ve C-O olarak belirlenmiştir. Başka bir çalışmada ise *Curtobacterium* sp. FM01'in Ni ve Pb'nin biyosorpsiyonunda amin, karboksil, hidroksil ve karbonil gruplarının etkili olduğu saptanmıştır (Masoumi vd., 2016).

4.11. Sonuç ve Öneriler

İçme sularında veya endüstriyel kuruluşların çıkış sularında yüksek konsantrasyondaki toksik metallerin giderimine dair geleneksel metotlara alternatif yeni teknolojiler araştırılmaktadır. Özellikle ekonomik olması ve sürdürülebilirliği açısından gen teknolojisiyle biyolojik arıtımın kullanılması en popüler metotlardan biridir ve en etkili gen, protein veya enzimin keşfine yönelik tüm dünyada bir yarış vardır. Literatürde sulardan metal gideriminde denenmiş birçok gen bulunmaktadır ancak hala en etkili olabilecek genin keşfine dair çalışmalar devam etmektedir. Bu çalışma ile insanlarda Cd, Cr ve Hg gibi toksik metalleri bağlama özelliği olan metalloproteinlerden MT2A ve MT3 bakterilere klonlanarak, Cr ve Pb metallerini bağlama etkinliği araştırılmıştır. Böylece bu proteinlerin prokaryotik canlılarda ökaryotlardaki gibi metal bağlamada etkili oldukları keşfedilmiştir. Biyolojik arıtım proseslerinde kullanılan en elverişli canlı türü bakteriler olduğundan bu proteinlerin bakterilere klonlanarak bakterilerdeki etkinliği belirlenmiştir. Tez çalışmasında elde edilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır.

- ✓ Belirlenen MİK değerlerindeki metal konsantrasyonları bakterilerin %90'ının üremesini engellediği için bakterilere uygulanmamaktadır. MİK'in alt konsantrasyonları, özellikle içme suyu ve deşarj sularındaki standart metal konsantrasyonlarını da içerecek şekilde belirlenir. Bu çalışmada Cr ve Pb'nin farklı konsantrasyonları bakterilere 24 saat boyunca uygulanmış ve hücrelerin maksimum dayanabileceği metal konsantrasyonu (taşıma kapasitesi) tespit edilmiştir.
- ✓ *E. coli* Jm109, MT2A ve MT3 bakterilerinin Cr MİK değerleri sırasıyla, 50, 140 ve 75 mg/L olarak bulunmuştur. Bu hücrelerin Pb MİK değerleri de sırasıyla 1000, 1750 ve 2000 mg/L olarak belirlenmiştir.
- ✓ Yapılan bu çalışmada, öncelikle ökaryotik metalloproteinlerin sulardan metal gideriminde etkin olduğu ve bu proteinlerden hangisinin Cr ve Pb'ye affinitesinin olduğu belirlenmiştir. 50 mg/L Cr içeren sulu çözeltiden toplam Cr giderim oranı en yüksek olan suşun %75'lik oranla MT2A olduğu ve kontrol hücresi olan *E. coli* Jm109'dan 2,2 kat daha fazla oranda toplam Cr giderim kapasitesine sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca, MT2A suşunun gram kuru hücre başına 46 mg Cr bağladığı belirlenmiştir. ICP-MS ile yapılan metal kalıntı analizleri sonuçlarında, hem sulu

çözeltilerden hem de krom kaplama tesislerinin çıkış suyundan Cr gideriminde en etkin bakterinin MT2A geni içeren rekombinant suş olduğu tespit edilmiştir.

- ✓ 50 mg/L Pb içeren sulu çözeltiden en yüksek Pb gideriminin MT3 suşu tarafından yapıldığı ve %54 oranında giderildiği tespit edilmiştir. MT3'ün Pb biyogiderim kapasitesi, *E. coli* Jm109'dan 3,6 kat daha yüksek bulunmuştur. 50 mg/L Pb uygulanan MT3'ün gram kuru hücre başına 22,5 mg Pb bağladığı belirlenmiştir.
- ✓ Metallerin hem bakteri hücre yüzeyinde hem de hücre içindeki birikim oranlarının tespit edilmesiyle, arıtım işleminde canlısının mı (biyoakümülyasyon) ölüsünün mü (biyosorpsiyon) daha etkili olduğu belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan MT2A ve MT3 biyosorbentlerinin yüksek Cr ve Pb konsantrasyonlarında daha etkili olduğu tespit edilmiştir.
- ✓ Biyosorpsiyon deneylerinde optimum koşulları belirlemek için çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmada, Cr biyosorpsiyonu en yüksek verimde pH 2'de bulunmuştur.
- ✓ Pb biyosorpsiyonunun en iyi pH 5'te gerçekleştiği tespit edilmiştir. Çünkü daha yüksek pH'larda (> 7) Pb, $Pb(OH)_2$ formunda çöker. Bu durumun sorpsiyon veriminin azalmasına neden olduğu düşünülebilir.
- ✓ Cr ve Pb biyosorpsiyonları sıcaklık artışı ile azalmıştır. Bu da Cr ve Pb biyosorpsiyonlarının ekzotermik olduğunu göstermektedir. Bu durum, artan sıcaklıkların Van der Waals kuvvetlerini azaltmasından kaynaklanıyor olabilir (Kayacan, 2007).
- ✓ Biyosorbent yüzeyindeki metal bağlayan aktif bölgeler tamamen dolduktan sonra yani doyum noktasına ulaşıldıktan sonra artan temas süresinin Cr ve Pb biyosorpsiyonunda kayda değer bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür.
- ✓ Sabit metal konsantrasyonunda, biyosorbent konsantrasyonu arttıkça birim biyosorbent kütlesi başına bağlanan metal miktarı azalır. Bu durum biyosorbent miktarı arttığında doymamış yüzey oluşumundan kaynaklanıyor olabilir.

- ✓ Artan Cr ve Pb başlangıç konsantrasyonlarının rekabetçi adsorpsiyona ve yetersiz adsorpsiyon bölgelerine neden olarak biyosorpsiyon oranında azalmaya yol açtığı tespit edilmiştir. Ancak adsorpsiyon kapasitesinin belli bir Cr ve Pb konsantrasyonuna kadar arttığı, daha sonra doyum noktasına ulaşarak sabitlendiği görülmüştür.
- ✓ MT2A biyosorbentinin sulardan Cr biyosorpsiyonu için optimum koşulları; pH 2.0, 0,1 g biyosorbent, 25 °C, 150 mg/L Cr ve 60 dakika temas süresi olarak belirlenmiştir. MT3 biyosorbentinin sulardan Pb biyosorpsiyonu için optimum koşulları ise pH 5.0, 0,2 g biyosorbent, 30 °C, 100 mg/L Pb ve 120 dakika temas süresi olarak bulunmuştur.
- ✓ ΔG değerleri Cr ve Pb için uygulanan tüm sıcaklıklarda negatif bulunmuştur. Bu da Cr ve Pb biyosorpsiyonlarının dışardan enerjiye ihtiyaç duymadan kendiliğinden gerçekleştiği ve biyosorpsiyonların fiziksel olduğu anlamına gelmektedir.
- ✓ İzoterm ve kinetik çalışmalar sonunda Cr ve Pb biyosorpsiyonlarının Langmuir izoterm modeline ve yalancı birinci dereceden kinetiğe daha uygun olduğu belirlenmiştir.
- ✓ Cr uygulanan MT2A biyosorbentinin biyosorpsiyon/desorpsiyon döngüsünün 5 kez verimli bir şekilde tekrarlanabileceği belirlenmiştir. Pb uygulanan MT3 biyosorbentinin ise 4 ardışık biyosorpsiyon/desorpsiyon döngüsünü yüksek performansta gerçekleştirdiği saptanmıştır.
- ✓ Cr ve Pb uygulanan hücrelerin SEM görüntülerinde, metallerin toksik etkileri nedeniyle morfolojik yapılarının bozulduğu görülmüştür. MT2A ve MT3 hücrelerinin STEM görüntülerinde ise Cr ve Pb uygulanan hücrelerin sitoplazmasında siyah noktalar/kümeler tespit edilmiştir. Bu noktaların hücre içinde Cr ve Pb birikiminden kaynaklandığı düşünülmektedir.
- ✓ MT2A'da bulunan, amino (amid I, amid II), fosforil ve karbonil fonksiyonel gruplarının Cr bağlanmasında etkili iken MT3'e Pb bağlanmasında ise amin, alkan, amid I, fosforil, sülfoksit, C-O fonksiyonel gruplarının etkili olduğu tespit edilmiştir.

- ✓ MT2A ve MT3 bakterilerinin arıtım tesislerinde biyolojik arıtım ünitesinde kullanılması söz konusu olduğunda, deneysel çalışmalarda belirlenen canlı biyokütle konsantrasyonu üniteye aşılır. Bakteriler LB içerisinde sıvı (mg/L) olarak biyoreaktörün kapasitesine göre verilerek arıtım yapılabilir. Eğer arıtım maliyetinin düşürülmesi isteniyorsa canlı bakterinin yaşaması için gerekli olan besiyeri yerine karbon kaynağı olarak uygun çevresel atıklar (kuruyemiş kabukları, atık yağlar, bitki artıkları, peynir altı suyu, melas vb.) kullanılabilir. Ancak, ölü biyokütlenin yani biyosorbentlerin tekrar tekrar kullanılabilir olması ve besiyeri gereksinimlerinin olmaması nedeniyle çalışmada bakterilerin ölüsü kullanılarak su ve atıksulardan metallerin biyosorpsiyonu yapılabilir. Üretilen biyosorbentler herhangi bir polimere veya manyetik malzemeye tutundurulmadan direk olarak içme suları ya da endüstriyel sular arıtıldıktan sonra deşarj öncesinde metal gideriminde kullanılabilir.
- ✓ Yeterli biyokütle üretildikten sonra, biyosorbentler çeşitli proseslerde denenerek en etkili arıtma yöntemi tespit edilebilir ve böylece arıtımda sürdürülebilirliği sağlanabilir.
- ✓ Biyosorbentler Cr ve Pb bağlanması/giderimi ile ilgili başka alanlarda da biyoteknolojik araç olarak kullanılabilir.

KAYNAKÇA

1. Abatenh, E., Gizaw, B., Tsegaye Z, Wassie, M., 2017. The Role of Microorganisms in Bioremediation- A Review. **Open Journal of Environmental Biology**, 2 (1): 038-046.
2. Ackerley, D.F., Gonzalez, C.F., Keyhan, M., Blake, R., Matin, A., 2004. Mechanism of chromate reduction by the Escherichia coli protein, NfsA, and the role of different chromate reductases in minimizing oxidative stress during chromate reduction. **Environmental Microbiology**, 6: 851-860.
3. Adam, V., Chudobova, D., Tmejova, K., Cihalova, K., 2014. An Effect of Cadmium and Lead Ions on Escherichia coli with the Cloned Gene for Metallothionein (MT3) Revealed by Electrochemistry. **Electrochimica Acta**, 140: 11-19.
4. Addgene., 2022. Vector Database Plasmid: pET-21(+). (Web sayfası: <https://www.addgene.org/vector-database/2553/>), (Erişim tarihi: Aralık 2022).
5. Aktay, G., Söylemezoğlu, T., 2001. Metallerin Toksikolojik Önemi. **FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences**, 26 (4): 197-203.
6. Al-Qodah, Z., 2006. Biosorption of heavy metal ions from aqueous solutions by activated sludge. **Desalination**, 196 (1-3): 164-176.
7. Al-Ghouti, M.A., Da'ana, D.A., 2020. Guidelines for the use and interpretation of adsorption isotherm models: A review. **Journal of Hazardous Materials**, 393: 122383.
8. Alteri, C.J., ve Mobley, H.L.T., 2012. Escherichia coli physiology and metabolism dictates adaptation to diverse host microenvironments. **Current Opinion in Microbiology**, 15 (1): 3-9.
9. Antony, G.S., Manna, A., Baskaran, S., 2020. Non-enzymatic reduction of Cr (VI) and it's effective biosorption using heat-inactivated biomass: A fermentation waste material. **Journal of Hazardous Materials**, 392: 122257.

10. Anusha, P., Natarajan, D., 2020. Bioremediation potency of multi metal tolerant native bacteria *Bacillus cereus* isolated from bauxite mines, kolli hills, Tamilnadu- A lab to land approach. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, **25**: 101581.
11. Argun, M.E., Dursun, S., Ozdemir, C., Karatas, M., 2007. Heavy metal adsorption by modified oak sawdust: thermodynamics and kinetics, **Journal of Hazardous Materials**, **141**: 77–85.
12. Arief, V.O., Trilestari, K., Sunarso, J., Indraswati, N., Ismadji, S., 2008. Recent progress on biosorption of heavy metals from liquids using low cost biosorbents: characterization, biosorption parameters and mechanism studies. **Clean–Soil, Air, Water**, **36** (12): 937-962.
13. Arivalagan, P., Singaraj, D., Haridass, V., Kaliannan, T., 2014. Removal of cadmium from aqueous solution by batch studies using *Bacillus cereus*. **Ecological Engineering**, **71**: 728-735.
14. Arshad, M., Saleem, M., Hussain, S. 2007. Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation, **Trends in Biotechnology**, **25** (8): 356-362,
15. Aryal, M., Ziağova, M., Liakopoulou-Kyriakides, M., 2010. Study on arsenic biosorption using Fe(III)-treated biomass of *Staphylococcus xylosus*. **Chemical Engineering Journal**, **162** (1): 178-185.
16. Aytan, N. 2010. Atık Madde Olarak Patates Kabuğundan Biyosorban Üretimi Ve Metilen Mavisi İçin Adsorpsiyon Karakteristikleri. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, İstanbul, 77 s.
17. Barkay, T., Miller, S. M., Summers, A.O., 2003. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. **FEMS Microbiology Reviews**, **27** (2-3): 355-384.
18. Bermudez, Y.G., Rico, I.L.R., Guibal, E., deHoces, M.C., Lara, M.A.M., 2012. Biosorption of hexavalent chromium from aqueous solution by *Sargassum muticum* Brown alga. Application of statistical design for process optimization. **Chemical Engineering Journal**, **183**: 68-76.

19. Bazzazzadeh, R., Soudi, M. R., Valinassab, T., Moradlou, O., 2020. Kinetics and equilibrium studies on biosorption of hexavalent chromium from leather tanning wastewater by *Sargassum tenerrimum* from Chabahar-Bay Iran. **Algal Research**, **48**: 101896.
20. Bharagava, R. N., Mishra, S., 2018. Hexavalent chromium reduction potential of *Cellulosimicrobium* sp. isolated from common effluent treatment plant of tannery industries. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, **147**: 102-109.
21. Bhaskar, P. V., Bhosle, N. B., 2006. Bacterial extracellular polymeric substance (EPS): a carrier of heavy metals in the marine food-chain. **Environment International**, **32** (2): 191-198.
22. Bhattacharya, A., Gupta, A., 2013. Evaluation of *Acinetobacter* sp. B9 for Cr (VI) resistance and detoxification with potential application in bioremediation of heavy-metals-rich industrial wastewater. **Environmental Science and Pollution Research**, **20** (9): 6628-6637.
23. Biondo, R., da Silva, F.A., Vicente, E.J., Souza Sarkis, J.E., Schenberg, A.C.G., 2012. Synthetic phytochelatin surface display in *Cupriavidus metallidurans* CH34 for enhanced metals bioremediation. **Environmental Science & Technology**, **46** (15): 8325-8332.
24. Boogaard, P. J., Slikkerveer, A., Nagelkerke, J. F., Mulder, G. J., 1991. The role of metallothionein in the reduction of cisplatin-induced nephrotoxicity by Bi³(+)-pretreatment in the rat in vivo and in vitro. Are antioxidant properties of metallothionein more relevant than platinum binding? **Biochemical Pharmacology**, **41** (3): 369-375.
25. Bremner, I., 1987. Nutritional and physiological significance of metallothionein. **Experientia Supplementum**, **52**: 81-107.
26. Brim, H., McFarlan, S.C., Fredrickson, J.K., Minton, K.W., Zhai, M., Wackett, L.P., Daly, M.J., 2000. Engineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radioactive mixed waste environments. **Nature Biotechnology**, **18**: 85-90.

27. Brown, N. L., Shih, Y. C., Leang, C., Glendinning, K. J., Hobman, J. L., Wilson, J. R., 2002. Mercury transport and resistance. **Biochemical Society Transactions**, **30**(4), 715-718.
28. Bruins, M. R., Kapil, S., Oehme, F. W., 2000. Microbial Resistance to Metals in the Environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, **45** (3): 198-207.
29. Cao, W., Wang, Z., Ao, H., Yuan, B., 2018. Removal of Cr(VI) by corn stalk based anion exchanger: the extent and rate of Cr(VI) reduction as side reaction. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, **539**: 424-432.
30. Chang, J., Deng, S., Liang, Y., Chen, J., 2019. Cr (VI) removal performance from aqueous solution by *Pseudomonas* sp. strain DC-B3 isolated from mine soil: characterization of both Cr (VI) bioreduction and total Cr biosorption processes. **Environmental Science and Pollution Research**, **26** (27): 28135-28145.
31. Chatterjee, S., Ghosh, I., & Mukherjea, K. K., 2011. Uptake and removal of toxic Cr(VI) by *Pseudomonas aeruginosa*: Physico-chemical and biological evaluation. **Current Science**, **101** (5): 645–652.
32. Chaturvedi, R., Archana, G., 2014. Cytosolic expression of synthetic phytochelatin and bacterial metallothionein genes in *Deinococcus radiodurans* R1 for enhanced tolerance and bioaccumulation of cadmium. **Biometals**, **27** (3): 471-482.
33. Cervantes, C., Gutierrez-Corona, F., 1994. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, **14** (2): 121-137.
34. Cha, J.S., Cooksey, D.A., 1991. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **88** (20): 8915-8919.
35. Chaudhuri, R.R., Henderson, I.R., 2012. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infection, Genetics and Evolution*, **12** (2): 214-226.

36. Chen, M., Xu, P., Zeng, G., Yang, C., Huang, D., Zhang, J., 2015. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: applications, microbes and future research needs. **Biotechnology advances**, **33** (6): 745-755.
37. Chen, S.L., Wilson, D.B., 1997. Construction and characterization of *Escherichia coli* genetically engineered for bioremediation of Hg²⁺-contaminated environments. **Applied Environmental Microbiology**, **63**: 2442–2445.
38. Cheng, Y., Yan, F., Huang, F., Chu, W., Pan, D., Chen, Z., Zheng, J., Yu, M., Lin, Z., Wu, Z., 2010. Bioremediation of Cr(VI) and Immobilization as Cr(III) by *Ochrobactrum anthropi*. **Environmental Science & Technology**, **44** (16): 6357–6363.
39. Cheung, K.H., Gu, J.D., 2007. Mechanisms of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: a review. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, **59**: 8-15.
40. Chintalpudi, V. K., Kanamarlapudi, R. K. S. L., Mallu, U. R., Muddada, S., 2021. Isolation, identification, biosorption optimization, characterization, isotherm, kinetic and application of novel bacterium *Chelatococcus* sp. biomass for removal of Pb (II) ions from aqueous solutions. **International Journal of Environmental Science and Technology**, 1-14.
41. Chojnacka, K., 2010. Biosorption and bioaccumulation—the prospects for practical applications. **Environment International**, **36** (3): 299-307.
42. Dadrasnia A, Chuan Wei KS, Shahsavari N, Azirun MS, Ismail S., 2015. Biosorption Potential of *Bacillus salmalaya* Strain 139SI for Removal of Cr(VI) from Aqueous Solution. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, **12** (12):15321-15338.
43. Das, S., Mishra, J., Das, S.K., Pandey, S., Rao, D.S., Chakraborty, A., Sudarshan, M., Das, N., 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.

44. Das, S., Dash, H. R., Chakraborty, J., 2016. Genetic basis and importance of metal resistant genes in bacteria for bioremediation of contaminated environments with toxic metal pollutants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **100** (7): 2967-2984.
45. Das, S., Behera, B. C., Mohapatra, R. K., Pradhan, B., Sudarshan, M., Chakraborty, A., Thatoi, H., 2021. Reduction of hexavalent chromium by *Exiguobacterium mexicanum* isolated from chromite mines soil. **Chemosphere**, **282**: 131135.
46. Dauvin, J.-C., 2008. Effects of heavy metal contamination on the macrobenthic fauna in estuaries: The case of the Seine estuary. **Marine Pollution Bulletin**, **57** (1): 160-169.
47. Deng, X., Wilson, D., 2001. Bioaccumulation of mercury from wastewater by genetically engineered *Escherichia coli*. **Applied microbiology and biotechnology**, **56** (1), 276-279.
48. Deng, X., Yi, X. E., Liu, G., 2007. Cadmium removal from aqueous solution by gene-modified *Escherichia coli* JM109. **Journal of Hazardous Materials**, **139** (2): 340-344.
49. Deng, X., Jia, P., 2011. Construction and characterization of a photosynthetic bacterium genetically engineered for Hg⁺² uptake, **Bioresource Technology**, **102** (3): 3083-3088.
50. Doğan, G., 2012. *Pseudomonas Cinsi Bakterilerde Hekzavalent Krom İndirgeme Üzerine Organik Moleküllerin Etkisi*. Pamukkale Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Denizli, 144 s.
51. Drewniak, L., Ciekowska, M., Radlinska, M., Sklodowska, A., 2015. Construction of the recombinant broad-host-range plasmids providing their bacterial hosts arsenic resistance and arsenite oxidation ability, **Journal of Biotechnology**, **196–197**: 42-51,

52. Duan, L., Kong, J. J., Wang, T. Q., Sun, Y., 2018. Binding of Cd (II), Pb (II), and Zn (II) to a type 1 metallothionein from maize (*Zea mays*). **Biometals**, **31** (4): 539-550.
53. Duffus, J.H., Worth, H.G.J., 1996. Fundamental toxicology for chemists. UK: Royal Society of Chemistry Information Services.
54. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), 2011. Krom. (Web sayfası: https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/chromiumsum.pdf), (Erişim tarihi: Mayıs 2020).
55. Dziegiel, P., 2004. Expression of metallothioneins in tumor cells. **Polish Journal of Pathology**, **55** (1): 3-12.
56. Ekmekyapar, F., Aslan, A., Bayhan, Y. K., Cakici, A., 2006. Biosorption of copper (II) by nonliving lichen biomass of *Cladonia rangiformis* hoffm. **Journal of hazardous materials**, **137** (1): 293-298.
57. Elçin, YM., 2021. Rekombinant DNA teknolojisi. (Web sayfası: https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/7196/mod_resource/content/0/6.%20Hafta.pdf), (Erişim tarihi: Aralık 2020).
58. El-Helow, E. R., Sabry, S. A., ve Amer, R. M., 2000. Cadmium biosorption by a cadmium resistant strain of *Bacillus thuringiensis*: regulation and optimization of cell surface affinity for metal cations. **Biometals**, **13** (4): 273-280.
59. Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F., Xie, Y., 2015. Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. **The Scientific World Journal**, **2015**: 756120.
60. EPA, 2018. Edition of the drinking water standards and health advisories tables. (Web sayfası: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2018-03/documents/dwtable2018.pdf>), (Erişim tarihi: Şubat 2020).
61. Ersoy Ömeroğlu, E., 2011. İzmir Körfezi'nden biyoluminesen bakterilerin izolasyonu, fenotipik ve moleküler karakterizasyonu. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 336 s.

62. Ertugay, N., Malkoc, M., 2014. Adsorption Isotherm, Kinetic, and Thermodynamic Studies for Methylene Blue from Aqueous Solution by Needles of *Pinus Sylvestris* L. **Polish Journal of Environmental Studies**, **23**: 1995–2006.
63. Ergül Ülger, Z., 2016. Ağır Metal İçeren Atıksulardan İzole Edilecek Bakteriler İle Cr (VI) Biyoremediasyonu. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 79 s.
64. Ergül Ülger, Z., Ozkan, A. D., Tunca, E., Atasagun, S., Tekinay, T., 2014. Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by live and acid-modified biomass of a novel *Morganella morganii* isolate. **Separation Science and Technology**, **49** (6): 907-914.
65. Fabre, B., Jezequel, K., ve Lebeau, T., 2003. Maximum uptakes of cadmium on free and immobilised bacteria and actinomycetes cells. **Environmental Chemistry Letters**, **1** (2): 141-144.
66. Fernandez, P. M., Viñarta, S. C., Bernal, A. R., Cruz, E. L., Figueroa, L. I., 2018. Bioremediation strategies for chromium removal: current research, scale-up approach and future perspectives. **Chemosphere**, **208**: 139-148.
67. Fu, F., Wang, Q., 2011. Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. **Journal of Environmental Management**, **92** (3): 407-418.
68. Gadd, G.M., 1990. Biosorption. **Chemistry and Industry (London)**, **13**: 421-426.
69. Garg, SK., Tripathi, M., Singh, SK., Singh, A., 2013. Pentachlorophenol dechlorination and simultaneous Cr⁶⁺ reduction by *Pseudomonas putida* SKG-1 MTCC (10510): characterization of PCP dechlorination products, bacterial structure, and functional groups. **Environmental Science and Pollution Research**, **20**: 2288–2304.
70. Garrett, S. H., Sens, M. A., Todd, J. H., Somji, S., 1999. Expression of MT3 protein in the human kidney. **Toxicology letters**, **105** (3): 207-214.

71. Gavrilescu, M., 2004. Removal of heavy metals from the environment by biosorption. **Engineering in Life Sciences**, **4** (3): 219-232.
72. Ghoneim, M.M., El-Desoky, H.S., El-Moselhy, K.M., Amer, A., Abou El-Naga, E. H., Mohamedein, L.I., Al-Prol, A.E., 2014. Removal of cadmium from aqueous solution using marine green algae, *Ulva lactuca*. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, **40** (3): 235-242.
73. Green-Ruiz, C., 2006. Mercury(II) removal from aqueous solutions by nonviable *Bacillus* sp. from a tropical estuary. **Bioresource Technology**, **97** (15): 1907-1911.
74. Gogada, R., Singh, S. S., Lunavat, S. K., Pamarthi, M. M., Rodrigue, A., Vadivelu, B., Apte, S. K., 2015. Engineered *Deinococcus radiodurans* R1 with NiCoT genes for bioremoval of trace cobalt from spent decontamination solutions of nuclear power reactors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **99** (21): 9203-9213.
75. Göçenoğlu Sarıkaya A., 2019. Sulu Çözeltilerden Cr (VI)'nın Biyosorpsiyonunda *Pleurotus ostreatus*' un Biyokütle Olarak Kullanımının Araştırılması. **Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi**, **17**: 1173-1183.
76. Guo, H., Luo, S., Chen, L., Xiao, X., 2010. Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulaor endophytic bacterium *Bacillus* sp. L14. **Bioresource Technology**, **101** (22): 8599-8605.
77. Gupta S., Singh D., 2017. Role of Genetically Modified Microorganisms in Heavy Metal Bioremediation, *Advances in Environmental Biotechnology*. (Editörler Kumar R., Sharma A., Ahluwalia S.), 197-214, Springer, Singapore.
78. Güneş S., 2016, Portakal (*Citrus sinensis* L.) Küspesinden Ürtilen Aktif Karbonun Sulu Çözeltilerden Reaktif Boyar Madde Adsorpsiyonunda Kullanımı. Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya, 143 s.
79. Hamutoğlu, R., Dinçsoy, A. B., Cansaran Duman, D., ve Aras, S., 2012. Biyosorpsiyon, adsorpsiyon ve fitoremediasyon yöntemleri ve uygulamaları. **Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi**, **69**: 235 - 253.

80. Han, N. S., Seo, J.-H., ve Chung, Y. C., 1992. Growth and copper resistance of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing a metallothionein gene. **Biotechnology Letters**, **14** (1): 7-10.
81. Hatay İ., 2006. Bazı Organik Maddelerin İnorganik Destekler Üzerine İmmobilizasyonu ve Adsorban Olarak Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Konya, 72 s.
82. He, Z., Gao, F., Sha, T., Hu, Y., He, C., 2009. Isolation and characterization of a Cr(VI)-reduction *Ochrobactrum* sp. strain CSCr-3 from chromium landfill. **Journal of Hazardous Materials**, **163**: 869–873.
83. He, Y., Ma, W., Li, Y., 2014. Expression of metallothionein of freshwater crab (*Sinopotamon henanense*) in *Escherichia coli* enhances tolerance and accumulation of zinc, copper and cadmium. **Ecotoxicology**, **23**: 56–64.
84. He, Y., Dong, L., Zhou, S., Jia, Y., vd., 2018. Chromium resistance characteristics of Cr(VI) resistance genes *ChrA* and *ChrB* in *Serratia* sp. S2. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, **157**: 417-423.
85. Holan, Z. R., Volesky, B., ve Prasetyo, I., 1993. Biosorption of cadmium by biomass of marine algae. **Biotechnology and Bioengineering**, **41** (8): 819-825.
86. Huang, W., Liu, Z.M. 2013. Biosorption of Cd(II)/Pb(II) from aqueous solution by biosurfactant-producing bacteria: Isotherm kinetic characteristic and mechanism studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, **105**:113-119.
87. Huang, Y, Zeng, Q., Hu, L., Zhong, H., He, Z., 2021. Bioreduction performances and mechanisms of Cr(VI) by *Sporosarcina saromensis* W5, a novel Cr(VI)-reducing facultative anaerobic bacteria. **Journal of Hazardous Materials**, **413**: 125411.
88. Hussain, S., Slikker, W., Jr., Ali, S. F., 1996. Role of metallothionein and other antioxidants in scavenging superoxide radicals and their possible role in neuroprotection. **Neurochemistry International**, **29** (2): 145-152.

89. İlhan, S., Nourbakhsh, M.N., Kiliçarslan, S., Ozdag, H., 2004. Removal of chromium, lead and copper ions from industrial waste waters by *Staphylococcus saprophyticus*. **Turkish Electronic Journal of Biotechnology**, **2** (2): 50-57.
90. Ike, A., Sriprang, R., Ono, H., Murooka, Y., Yamashita, M., 2007. Bioremediation of cadmium contaminated soil using symbiosis between leguminous plant and recombinant rhizobia with the MTL4 and the PCS genes. **Chemosphere**, **66** (9): 1670-1676.
91. Iyer, A., Mody, K., Jha, B., 2005. Biosorption of heavy metals by a marine bacterium. **Marine Pollution Bulletin**, **50** (3): 340-343.
92. Jackson, D.A., Symons, R.H., Berg, P. 1972. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **69** (10): 2904-2909.
93. Jacob, J. M., Karthik, C., Saratale, R. G., Kumar, S. S., vd., 2018. Biological approaches to tackle heavy metal pollution: A survey of literature. **Journal of Environmental Management**, **217**: 56-70.
94. Janyasuthiwong, S., Rene, E. R., Esposito, G., ve Lens, P. (Eds.). 2017. Chapter 1 Techniques for Metal Removal and Recovery from Waste Stream. (Vol. Volume 1: Principles and Processes). Springer France. 1-23.
95. Javanbakht, V., Alavi, S.A., Zilouei, H., 2014. Mechanisms of heavy metal removal using microorganisms as biosorbent. **Water Science and Technology**, **69** (9): 1775–1787.
96. Ji, G., Silver, S., 1995. Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern. **Journal of Industrial Microbiology** **14**: 61–75.
97. Jin, Y., Wang, X., Zang, T., Hu, Y., Hu, X., Ren, G., Qu, J., 2016. Biosorption of lead (II) by *Arthrobacter* sp. 25: process optimization and mechanism. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, **26** (8): 1428-1438.

98. Jobby, R., Jha, P., Yadav, A.K., Desai, N., 2018. Biosorption and biotransformation of hexavalent chromium [Cr(VI)]: A comprehensive review. **Chemosphere**, **207**: 255-266.
99. Kadukova, J., Vircikova, E., 2005. Comparison of differences between copper bioaccumulation and biosorption. **Environment International**, **31** (2): 227-232.
100. Kahvecioglu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S., 2003. Metallerin çevresel etkileri-1. **Metalurji Dergisi**, **136**: 47-53.
101. Kahraman, N., 2012. Sulu Çözeltilerden Krom (VI) Gideriminde Beyaz Çürükçül Fungus *Lentinus concinnus* Kullanımı. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans tezi, 86 s.
102. Kalita, D., Joshi, S.R., 2017. Study on bioremediation of Lead by exopolysaccharide producing metallophilic bacterium isolated from extreme habitat. **Biotechnology Reports**, **16**: 48-57.
103. Kang, S.H., Singh, S., Kim, J.Y., Lee, W., Mulchandani, A., Chen, W., 2007. Bacteria metabolically engineered for enhanced phytochelatin production and cadmium accumulation. **Applied Environmental Microbiology**, **73** (19): 6317-20.
104. Kang, C.H., So, J.S., 2016. Heavy metal and antibiotic resistance of ureolytic bacteria and their immobilization of heavy metals. **Ecological Engineering**, **97**: 304-312.
105. Kao, W. C., Chiu, Y. P., Chang, C.C., Chang, J.S., 2006. Localization effect on the metal biosorption capability of recombinant mammalian and fish metallothioneins in *Escherichia coli*. **Biotechnology progress**, **22** (5): 1256-1264.
106. Kargın, F., Erdem, C., 1991. Accumulation of copper in liver, spleen, stomach, intestine, gill and muscle of *Cyprinus carpio*. **Doğa Turkey Journal of Zoology**, **15**: 306-314.
107. Karthik, C., Barathi, S., Pugazhendhi, A., Ramkumar, V. S., vd., , 2017. Evaluation of Cr(VI) reduction mechanism and removal by *Cellulosimicrobium*

- funkei strain AR8, a novel haloalkaliphilic bacterium. **Journal of Hazardous Materials**, 333: 42-53.
108. Katalay, S., Parlak, S., Arslan, Ö.Ç., 2005. Ege Denizinde Yaşayan Kaya Balıklarının (*Gobius niger* L., 1758) Karaciğer Dokusunda Bazı Ağır Metallerin Birikimi. **Journal of Fisheries and Aquatic Science**, 22 (3): 385-388.
 109. Katartaş Z., 2011. Rekombinant DNA teknolojisi ile ilaç üretimi. Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji, Doktora Tezi, 102s, Kayseri.
 110. Karthikeyan, S., Balasubramanian, R., Iyer, C.S.P., 2007. Evaluation of the marine algae *Ulva fasciata* and *Sargassum* sp. for the biosorption of Cu (II) from aqueous solutions. **Bioresource technology**, 98 (2): 452-455.
 111. Kayaaltı, Z., 2007. Metalloprotein Promotor Bölge Polimorfizminin Toksik Metal ve İz Element Düzeylerine Etkisi. Ankara Üniversitesi, Doktora Tezi, Ankara, 119.
 112. Kayacan, S., 2007. Kömür ve Koklarla Sulu Çözeltilerden Boyar Maddelerin Uzaklaştırılması. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 74 s.
 113. Keshav, V., Achilonu, I., Dirr, H., ve Kondiah, K., 2019. Recombinant expression and purification of a functional bacterial metallo-chaperone PbrD-fusion construct as a potential biosorbent for Pb(II). **Protein Expression and Purification**, 158: 27-35.
 114. Khadivinia, E., Sharafi, H., Hadi, F., Zahiri, H.S., Modiri, S., Tohidi, A., Noghabi, K.A., 2014. Cadmium biosorption by a glyphosate-degrading bacterium, a novel biosorbent isolated from pesticide-contaminated agricultural soils. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20 (6): 4304-4310.
 115. Khan, Z., Nisar, M. A., Hussain, S. Z., Arshad, M. N., vd., 2015. Cadmium resistance mechanism in *Escherichia coli* P4 and its potential use to bioremediate

environmental cadmium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **99** (24): 10745-10757.

116. Kılıç., M., 2004. Kurşun (II) ve Cıva (II) İyonlarının Biyokütle Üzerine Adsorpsiyonunun İncelenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Isparta, 2004.
117. Kim, S.K., Lee, B.S., Wilson, D. B., Kim, E. K., 2005. Selective cadmium accumulation using recombinant Escherichia coli. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, **99** (2): 109-114.
118. Koçberber Kılıç, N. 2008. Proteomik Yaklaşımla Atıksu Kaynaklı Mikroorganizmalarda Cr(VI) Direnç Yollarının Araştırılması. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara, 99.
119. Kulshreshtha, S., 2013. Genetically Engineered Microorganisms: A Problem Solving Approach for Bioremediation. **Journal of Bioremediation and Biodegradation**, **4**: 133.
120. Kumar, P., Kim, K.-H., Bansal, V., Lazarides, T., vd., 2017. Progress in the sensing techniques for heavy metal ions using nanomaterials. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, **54**: 30-43.
121. Kumar, Y. P., King, P., Prasad, V.S.R.K., 2007. Adsorption of zinc from aqueous solution using marine green algae *Ulva fasciata* sp. **Chemical Engineering Journal**, **129** (1-3): 161-166.
122. Kumar, V., Dwivedi, S.K., 2019. Hexavalent chromium reduction ability and bioremediation potential of *Aspergillus flavus* CR500 isolated from electroplating wastewater. **Chemosphere**, **237**: 124567.
123. Kumari, V., Yadav, A., Haq, I., Kumar, S., vd., 2016. Genotoxicity evaluation of tannery effluent treated with newly isolated hexavalent chromium reducing *Bacillus cereus*. **Journal of Environmental Management**, **183**: 204-211.
124. Kuppusamy, S., Thavamani, P., Venkateswarlu, K., Lee, Y. B., vd., 2017. Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)

contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions. **Chemosphere**, **168**: 944-968.

125. Li, L., Shang, X., Sun, X., Xiao, X., Xue, J., Gao, Y., Gao, H., 2021. Bioremediation potential of hexavalent chromium by a novel bacterium *Stenotrophomonas acidaminiphila* 4-1. **Environmental Technology & Innovation**, **22**: 101409.
126. Li, X., Ren, Z., Crabbe, M. J. C., Wang, L., Ma, W., 2021. Genetic modifications of metallothionein enhance the tolerance and bioaccumulation of heavy metals in *Escherichia coli*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, **222**: 12512.
127. Liang, X.L., Zhao, F., Shi, R.J., Ban, Y.H., vd., 2015. Construction and evaluation of an engineered bacterial strain for producing lipopeptide under anoxic conditions. **Chinese Journal of Applied Ecology**, **26** (8): 2553-2560.
128. Lin, C.C., Lai, Y.T., 2006. Adsorption and recovery of lead (II) from aqueous solutions by immobilized *Pseudomonas aeruginosa* PU21 beads. **Journal of Hazardous Materials**, **137** (1): 99-105.
129. Liu, J., Cheng, M. L., Yang, Q., Shan, K. R., vd., 2007. Blood metallothionein transcript as a biomarker for metal sensitivity: low blood metallothionein transcripts in arsenicosis patients from Guizhou, China. **Environmental Health**, **115** (7): 1101-1106.
130. Liu, S., Zhang, F., Chen, J., Sun, G., 2011. Arsenic removal from contaminated soil via biovolatilization by genetically engineered bacteria under laboratory conditions. **Journal of Environmental Science**. **23**:1544–1550
131. Liu X, Chu G, Du Y, vd., 2019. The role of electron shuttle enhances Fe(III)-mediated reduction of Cr(VI) by *Shewanella oneidensis* MR-1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** **35**:64.
132. Loukidou, M.X., Zouboulis, A.I., Karapantsios., T.D., Matis, K.A., 2004. Equilibrium and kinetic modeling of chromium (VI) biosorption by *Aeromonas*

caviae. **Colloids Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects**, **242**: 93–104.

133. Lu, W. B., Shi, J. J., Wang, C. H., Chang, J. S., 2006. Biosorption of lead, copper and cadmium by an indigenous isolate *Enterobacter* sp. J1 possessing high heavy-metal resistance. **Journal of Hazardous Materials**, **134** (1-3): 80-86.
134. Ma, Y., Lin, J., Zhang, C., Ren, Y., vd., 2011. Cd(II) and As(III) bioaccumulation by recombinant *Escherichia coli* expressing oligomeric human metallothioneins. **Journal of Hazardous Materials**, **185** (2): 1605-1608.
135. Ma, W., Li, X., Wang, Q., vd., 2019. Tandem oligomeric expression of metallothionein enhance heavy metal tolerance and bioaccumulation in *Escherichia coli*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, **181**: 301–307.
136. Ma, L., Chen, N., Feng, C., 2021. Performance and enhancement mechanism of corncob guiding chromium (VI) bioreduction. **Water Research** **197**: 117057.
137. Mabbett, A.N., Macaskie, L.E., 2001. A novel isolate of *Desulfovibrio* sp with enhanced ability to reduce Cr(VI). **Biotechnology Letters**, **23** (9): 683-687.
138. Maleki, A., Hayati, B., Naghizadeh, M., Joo, S.W., 2015. Adsorption of hexavalent chromium by metal organic frameworks from aqueous solution. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, **28**: 211-216.
139. Mejare, M., Bülow, L., 2001. Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. **TRENDS in Biotechnology**, **19** (2): 67-73.
140. Manafi, Z., Abdollahi, H., Majd, M. Z., Golbang, N., vd., 2012. Isolation and identification of microorganisms causing microbial degradation of organic phase of the solvent extraction unit in the copper industries. *International Journal of Mineral Processing*, 112-113: 43-48.
141. Mangaiyarkarasi, M.M., Vincent, S., Janarthanan, S., Rao, T.S., Tata, B.V.R. 2011. Bioreduction of Cr (VI) by alkaliphilic *Bacillus subtilis* and interaction of the membrane groups. **Saudi Journal of Biological Sciences**, **18** (2): 157-167.

142. Maruthamuthu, M.K., Ganesh, I., Ravikumar, S., vd., 2015. Evaluation of zraP gene expression characteristics and construction of a lead (Pb) sensing and removal system in a recombinant Escherichia coli. **Biotechnology Letters**, **37**: 659–664.
143. Masoudzadeh, N., Zakeri, F., Bagheri Lotfabad, T., Sharafi, H., Masoomi, F., Zahiri, H. S., Noghabi, K. A., 2011. Biosorption of cadmium by Brevundimonas sp. ZF12 strain, a novel biosorbent isolated from hot-spring waters in high background radiation areas. **Journal of Hazardous Materials**, **197**: 190-198.
144. Masoumi, F., Khadivinia, E., Alidoust, L., Mansourinejad, Z., Shahryari, S., Safaei, M., Noghabi, K. A., 2016. Nickel and lead biosorption by Curtobacterium sp. FM01, an indigenous bacterium isolated from farmland soils of northeast Iran. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, **4** (1): 950-957.
145. Mauro, J.M., Pazirandeh, M., 2000. Construction and expression of functional multi-domain polypeptides in Escherichia coli: expression of the Neurospora crassa metallothionein gene, **Letters in Applied Microbiology**, **30**: 161–166.
146. Maurya, A., Kumar, P. S., Raj, A., 2022. Characterization of biofilm formation and reduction of hexavalent chromium by bacteria isolated from tannery sludge. **Chemosphere**, **286**: 131795.
147. Mergeay, M., Monchy, S., Vallaey, T., Auquier, V., vd., 2003. Ralstonia metallidurans, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. **FEMS Microbiology Reviews**, **27**: 385–410
148. Mishra, S., Chen, S., Saratale, G. D., 2021. Reduction of hexavalent chromium by Microbacterium paraoxydans isolated from tannery wastewater and characterization of its reduced products. **Journal of Water Process Engineering** **39**: 101748.
149. Mohapatra, R.K., Panda, C.R., 2017. Spatiotemporal variation of water quality and assessment of pollution potential in Paradip port due to port activities. **Indian journal of Geo Marine Sciences** **46** (7), 1274–1286.

150. Mohapatra, R. K., Parhi, P. K., Pandey, S., Bindhani, B. K., Thatoi, H., Panda, C. R., 2019. Active and passive biosorption of Pb (II) using live and dead biomass of marine bacterium *Bacillus xiamenensis* PbRPSD202: Kinetics and isotherm studies. **Journal of Environmental Management**, **247**: 121-134.
151. Molla, D., 2013. *Escherichia coli*'de Heterolog Rekombinant Protein Ekspresyonu Sırasında Oluşan Stres Yanıtının İncelenmesi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 157 s.
152. Naik, M. M., Pandey, A., Dubey, S. K., 2012. *Pseudomonas aeruginosa* strain WI-1 from Mandovi estuary possesses metallothionein to alleviate lead toxicity and promotes plant growth. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, **79**: 129-133.
153. Nguyen, T.T.L., Lee, H.R., Hong, S.H., vd., 2013. Selective Lead Adsorption by Recombinant *Escherichia coli* Displaying a Lead-Binding Peptide. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, **169**: 1188–1196.
154. Nies, D.H., Silver, S., 1989. Metal ion uptake by a plasmid-free metal-sensitive *Alcaligenes eutrophus* strain. **Journal of bacteriology**, **171** (7): 4073-4075.
155. Nies, D.H., 1999. Microbial heavy-metal resistance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **51**: 730–750.
156. Nies, D.H., 2000. Heavy metal-resistant bacteria as extremophiles: molecular physiology and biotechnological use of *Ralstonia* sp. CH34. **Extremophiles**, **4** (2): 77-82.
157. Nollet, H., Roels, M., Lutgen, P., Van Der Meeren, P., Verstraete, W., 2003. Removal of PCBs from wastewater using fly ash. **Chemosphere**, **53** (6):655-665.
158. Olaniran, A. O., Balgobind, A., Pillay, B., 2013. Bioavailability of Heavy Metals in Soil: Impact on Microbial Biodegradation of Organic Compounds and Possible Improvement Strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, **14** (5): 10197-10228.

159. Oves, M., Khan, M. S., Zaidi, A., 2013. Biosorption of heavy metals by *Bacillus thuringiensis* strain OSM29 originating from industrial effluent contaminated north Indian soil. **Saudi Journal of Biological Sciences**, **20** (2), 121-129.
160. Özbolat, G., Tuli, A., 2016. Ağır metal toksisitesinin insan sağlığına etkileri. **Arşiv Kaynak Tarama Dergisi**, **25** (4): 502-521.
161. Özdemir, S., Kilinc, E., Poli, A., Nicolaus, B., Güven, K., 2009. Biosorption of Cd, Cu, Ni, Mn and Zn from aqueous solutions by thermophilic bacteria, *Geobacillus toebii* sub. sp. decanicus and *Geobacillus thermoleovorans* sub. sp. stromboliensis: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. **Chemical Engineering Journal**, **152** (1): 195-206.
162. Özseit Selçuk, B.Ş. 2010. Subtractive Hibridizasyon Cdna Kütüphanesinden Elde Edilen Kalbe Özgü Yeni Genlerin Genomik Organizasyonlarının Belirlenmesi ve Fonksiyonel Analizleri. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, 157 s.
163. Öztürk, Ş., 2008. Çeşitli Tatlı Sulardan İzole Edilen Bazı *Synechocystis* sp. İzolatlarına Cr(VI) ve Cd(II) Ağır Metallerinin Etkisi ve iderimi: Metal Gideriminin Protein ve Tiyoller Açısından Değerlendirilmesi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara, 204 s.
164. Öztürk, Ş., Aslım, B., Tunceli, A., 2011. Biosorption of chromium(VI) ions from aqueous system by free and immobilized biomass of wild *Synechocystis* sp.: A comparative study. **Fresenius Environmental Bulletin**, **20**: 2412–2418.
165. Öztürk, A., 2019. *Escherichia Coli* Akuporin-Z İçeren Nanofiltrasyon Membran Üretiminin ve Filtrasyon Parametrelerinin Optimizasyonu. Gebze Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Gebze, 87 s.
166. Palumaa, P., Eriste, E., Kruusel, K., Kangur, L., vd., 2003. Metal binding to brain-specific metallothionein-3 studied by electrospray ionization mass spectrometry. **Cellular and Molecular Biology**, **49** (5): 763-768.

167. Pan, X., Liu, Z., Chen, Z., vd., 2014. Investigation of Cr(VI) reduction and Cr(III) immobilization mechanism by planktonic cells and biofilms of *Bacillus subtilis* ATCC-6633. **Water Research**, **55**: 21–29.
168. Pardo, R., Herguedas, M., Barrado, E., Vega, M., 2003. Biosorption of cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass of *Pseudomonas Putida*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, **376** (1): 26-32.
169. Park, J. D., Liu, Y., Klaassen, C. D., 2001. Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals. **Toxicology**, **163** (2-3): 93-100.
170. Patel, J., Zhang, Q., McKay, R.M.L. vd., 2010. Genetic Engineering of *Caulobacter crescentus* for Removal of Cadmium from Water. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, **160** (1), 232-243.
171. Patra, R. C., Malik, S., Beer, M., Megharaj, M., vd., 2010. Molecular characterization of chromium (VI) reducing potential in Gram positive bacteria isolated from contaminated sites. **Soil Biology and Biochemistry**, **42** (10): 1857-1863.
172. Paul, M. L., Samuel, J., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A., 2012. Comparative kinetics, equilibrium, thermodynamic and mechanistic studies on biosorption of hexavalent chromium by live and heat killed biomass of *Acinetobacter junii* VITSUKMW2, an indigenous chromite mine isolate. **Chemical Engineering Journal**, **187**: 104-113.
173. Pengfei, Z., 2016. Adsorption and Desorption Isotherms. (Web sayfası: [http://www.kereseaarchgroup.com/uploads/4/8/4/5/48456521/160903_introduction to bet isotherms.pdf](http://www.kereseaarchgroup.com/uploads/4/8/4/5/48456521/160903_introduction_to_bet_isotherms.pdf)), (Erişim tarihi: Kasım 2021).
174. Pei, Y., Tao, C., Ling, Z., vd., 2020. Exploring novel Cr(VI) remediation genes for Cr(VI)-contaminated industrial wastewater treatment by comparative metatranscriptomics and metagenomics. **Science of Total Environment** **742**:140435.

175. Petrlova, J.P.D., Mikelova, R., 2006. Attomolevoltammetric determination of metallothionein. **Electrochimica Acta**, **51**: 5112–5119.
176. Pirzadeh, S., Shahpiri, A., 2016. Functional characterization of a type 2 metallothionein isoform (OsMTI-2b) from rice. **International Journal of Biological Macromolecules**, **88**: 491-496.
177. Pradhan, D., Sukla, L.B., Mishra, B.B., Devi, N., 2019. Biosorption for removal of hexavalent chromium using microalgae *Scenedesmus* sp, **Journal of Cleaner Production**, **209**: 617–629.
178. Priyadarshane, M., Das, S., 2021. Biosorption and removal of toxic heavy metals by metal tolerating bacteria for bioremediation of metal contamination: A comprehensive review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, **9** (1): 104686.
179. Pugazhendhi, A., Boovaragamoorthy, G. M., Ranganathan, K., Naushad, M., vd., 2018. New insight into effective biosorption of lead from aqueous solution using *Ralstonia solanacearum*: Characterization and mechanism studies. **Journal of Cleaner Production**, **174**: 1234-1239.
180. Puranik, P.R., Paknikar, K.M., 1999. Biosorption of lead, cadmium, and zinc by *Citrobacter* strain MCM B-181: Characterization Studies. **Biotechnology Progress**, **15** (2): 228-237.
181. Raghu, G., Balaji, V., Venkateswaran, G., Rodrigue, A., Mohan, P.M., 2008. Bioremediation of trace cobalt from simulated spent decontamination solutions of nuclear power reactors using *E. coli* expressing NiCoT genes, **Applied Microbiology and Biotechnology**, **81**: 571-578.
182. Raja, C.E., Anbazhagan, K., Selvam, G.S., 2006. Isolation and characterization of a metal-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, **22** (6), 577-585.
183. Rani, M. J., Hemambika, B., Hemapriya, J., Kannan, V.R., 2010. Comparative assessment of heavy metal removal by immobilized and dead bacterial cells: a

biosorption approach. **African Journal of Environmental Science and Technology**, **4** (2):77-83.

184. Rasheed, T., Bilal, M., Nabeel, F., Adeel, M., Iqbal, H.M., 2019. Environmentally-related contaminants of high concern: potential sources and analytical modalities for detection, quantification, and treatment. **Environment International**, **122**: 52-66.
185. Rezaei, H., 2016. Biosorption of chromium by using *Spirulina* sp. **Arabian Journal of Chemistry**, **9** (6): 846-853.
186. Rehman, A., Shakoori, F.R., Shakoori A.R., 2006. Uptake of Heavy Metals by a Ciliate, *Tachysoma pellionella*, Isolated from Industrial Effluents and Its Potential Use in Bioremediation of Toxic Wastewater. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, **77**: 469–476.
187. Ren, G., Jin, Y., Zhang, C., Gu, H., vd., 2015. Characteristics of *Bacillus* sp. PZ-1 and its biosorption to Pb(II). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, **117**: 141-148.
188. Resmi Gazete., 2004. Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği. TC Çevre ve Şehircilik Bakanlığı, Karar, 8289.
189. Rosen, M.B., Pokhrel, L.R., Weir, M.H., 2017. A discussion about public health, lead and *Legionella pneumophila* in drinking water supplies in the United States. **Science of The Total Environment**, **590-591**: 843-852.
190. Rouch, D.A., Lee, B.T.D., Morby, A.P., 1995. Understanding cellular responses to toxic agents: A model for mechanism choice in bacterial metal resistance. **Journal of Industrial Microbiology**, **14**: 132-141.
191. Ruiz, O.N., Alvarez, D., Gonzalez-Ruiz, G., vd., 2011. Characterization of mercury bioremediation by transgenic bacteria expressing metallothionein and polyphosphate kinase. **BMC Biotechnology**, **11** (82): 1-8.

192. Sagar, S., Bajaj, S., Gola, D., Malik, A., PJ Khankhane, R.K., Singh, D.K., 2017. A qualitative approach to nickel and lead uptake by heavy metal resistant bacteria *Klebsiella* sp. 10KN. **International Journal of Applied Research**, **3**: 878–885.
193. Sağlam, N., Cihangir, N., 1995. Ağır Metallerin Biyolojik Süreçlerle Biyosorpsiyonu Çalışmaları. **Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi**, **11**: 157-161.
194. Sağlık Bakanlığı, 2013. İnsani tüketim amaçlı sular hakkında yönetmelik. (**Web sayfası:** <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2013/03/20130307-7.htm>), (Erişim tarihi: Nisan 2020).
195. Samuel, J., Paul, M.L., Ravishankar, H., vd., 2013. The differential stress response of adapted chromite mine isolates *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* and its impact on bioremediation potential. **Biodegradation**, **24**: 829–842.
196. Sarı, A., Tuzen, M., 2008. Biosorption of total chromium from aqueous solution by red algae (*Ceramium virgatum*): Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. **Journal of Hazardous Materials**, **160**: 349–355.
197. Sathishkumar, K., Murugan, K., Benelli, G., vd., 2017. Bioreduction of hexavalent chromium by *Pseudomonas stutzeri* L1 and *Acinetobacter baumannii* L2. **Annals of Microbiology**, **67**: 91–98.
198. Sauge-Merle, S., Lecomte-Pradines, C., Carrier, P., Cuine, S., vd., , 2012. Heavy metal accumulation by recombinant mammalian metallothionein within *Escherichia coli* protects against elevated metal exposure. **Chemosphere**, **88** (8): 918-924.
199. Sato, M., Bremner, I., 1993. Oxygen free radicals and metallothionein. **Free Radical Biology and Medicine**, **14** (3): 325-337.
200. Sauer, J. M., Waalkes, M. P., Hooser, S. B., Baines, A. T., vd., 1997. Tolerance induced by all-trans-retinol to the hepatotoxic effects of cadmium in rats: role of metallothionein expression. **Toxicology and Applied Pharmacology**, **143** (1): 110-119.

201. Savcı, S., 2010. Veteriner ve Beşeri Amaçlı Kullanılan Bazı Farmasötiklerin Canlı Aktif Çamur Tarafından Adsorpsiyonunun İncelenmesi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana, 203 s.
202. Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodford, N., van Duijkeren, E., Johnson, A. P., Gastra, W., 2010. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, **65** (4): 601-604.
203. Sekhar, K., Priyanka, B., Reddy, V.D., Rao, K. V., 2011. Metallothionein 1 (CcMT1) of pigeonpea (*Cajanus cajan*, L.) confers enhanced tolerance to copper and cadmium in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana*. **Environmental and Experimental Botany**, **72** (2): 131-139.
204. Shahpiri, A., Mohammadzadeh, A., 2018. Bioaccumulation of Arsenic by Engineered *Escherichia coli* Cells Expressing Rice Metallothionein Isoforms. **Current Microbiology** **75**: 1537–1542.
205. Shahpiri, A., Rahimi, A.M. 2019. Expression of Rice Metallothionein Isoforms in *Escherichia coli* Enhances the Accumulation of Trivalent and Hexavalent Chromium, **Protein & Peptide Letters**, **26** (10): 768-775.
206. Shamim, S., Rehman, A., Qazi, M.H., 2014. Cadmium-Resistance Mechanism in the Bacteria *Cupriavidus metallidurans* CH34 and *Pseudomonas putida* mt2. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, **67** (2): 149–157.
207. Sharma, B., Shukla, P. 2021. Lead bioaccumulation mediated by *Bacillus cereus* BPS-9 from an industrial waste contaminated site encoding heavy metal resistant genes and their transporters, **Journal of Hazardous Materials**, **401**: 123285,
208. Shehata, M., Yamazaki, K., 2018. Using Recombinant *E. coli* Displaying Surface Heavy Metal Binding Proteins for Removal of Pb²⁺ from Contaminated Water. **Journal of Bioremediation and Biodegradation**, **9**: 441.

209. Shi, Z., Zhang, Z., Yuan, M., Wang, S., Yang, M., Yao, Q., Ba, W., Zhao, J., Xie, B., 2020. Characterization of a high cadmium accumulating soil bacterium, *Cupriavidus* sp. WS2. **Chemosphere**, **247**: 125834.
210. Silva, B., Figueiredo, H., Neves, I.C., Tavares, T., 2009. The role of pH on Cr(VI) reduction and removal by *Arthrobacter viscosus*. **Internatinal Journal of Chemical Biological Engineering**, **2** (2): 100–103.
211. Singh, R., Chadetrik, R., Kumar, R., vd., 2010. Biosorption optimization of lead(II), cadmium(II) and copper(II) using response surface methodology and applicability in isotherms and thermodynamics modeling. **Journal of Hazardous Materials** **174**: 623–634.
212. Singh, S., Mulchandani, A., Chen, W., 2008. Highly selective and rapid arsenic removal by metabolically engineered *Escherichia coli* cells expressing *Fucus vesiculosus* metallothionein. **Applied and Environmental Microbiology**, **74** (9): 2924-2927.
213. Singh, J. S., Abhilash, P. C., Singh, H. B., Singh, R. P., vd., 2011. Genetically engineered bacteria: An emerging tool for environmental remediation and future research perspectives. **Gene**, **480** (1): 1-9.
214. Srinath, T., Verma, T., Ramteke, P. W., Garg, S. K., 2002. Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. **Chemosphere**, **48** (4): 427-435.
215. Sturm, G., Brunner, S., Suvorova, E., vd., 2018. Chromate Resistance Mechanisms in *Leucobacter chromiirens*. **Applied and Environmental Microbiology**, **84** (23): 1-11.
216. Su, Y.-J., Lin, J.-Q., Lin, J.-Q., Hao, D.H., 2009. Bioaccumulation of Arsenic in recombinant *Escherichia coli* expressing human metallothionein. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, **14** (5): 565-570.

217. Sun, X.-F. Ma, Y. Liu, X.-W. Wang, S.-G. Gao, B.-Y. Li, X.-M. 2010. Sorption and detoxification of chromium (VI) by aerobic granules functionalized with polyethylenimine, **Water Research**, **44**: 2517–2524.
218. Su, Y.Q., Zhao, Y.J., Zhang, W.J., Chen, G.C., vd., 2020. Removal of mercury(II), lead(II) and cadmium(II) from aqueous solutions using *Rhodobacter sphaeroides* SC01. **Chemosphere**, **243**: 125166.
219. Su, Y.Q., Yuan, S., Guo, Y.C., vd., 2021. Highly efficient and sustainable removal of Cr (VI) in aqueous solutions by photosynthetic bacteria supplemented with phosphor salts. **Chemosphere** **283**: 131031.
220. Sultan, S., Mubashar, K., Faisal, M., 2012. Uptake of toxic Cr (VI) by biomass of exo-polysaccharides producing bacterial strains. **African Journal of Microbiology Research**, **6**: 3329-3336
221. Sundstrom, D.W., Klei, H.E., 1979. Wastewater treatment. Prentice Hall, Prentice Hall, Englewood Cliffs, 327-330.
222. Şencan, A., 2006. Sulu Çözelti ve Deri Endüstrisi Atıksuyundan Cr+6 İyonunun Aktif Çamur Biyokütleri ile Biyosorpsiyonu. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Isparta, 2006.
223. 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, 1-10.
224. Taniguchi, J., Hemmi, H., Tanahashi, K., Amano, N., vd., 2000. Zinc biosorption by a zinc-resistant bacterium, *Brevibacterium* sp. strain HZM-1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **54** (4): 581-588.
225. Teemu, H., Seppo, S., Jussi, M., T. Raija, T., Kalle, L., 2008. Reversible surface binding of cadmium and lead by lactic acid and bifidobacteria. **International Journal of Food Microbiology**, **125** (2): 170-175.

226. Thacker, U., Parikh, R., Shouche, Y., Madamwar, D., 2006. Hexavalent chromium reduction by *Providencia* sp. **Process Biochemistry**, **41** (6): 1332-1337.
227. Timkova, I., Sedlakova-Kadukova, J., Pristas, P., 2018. Biosorption and bioaccumulation abilities of actinomycetes/streptomycetes isolated from metal contaminated sites. **Separations** **5** (4): 1-14.
228. Ting, Y. P., Prince, I. G., ve Lawson, F., 1991. Uptake of cadmium and zinc by the alga *Chlorella vulgaris*: II. Multi-ion situation. **Biotechnology and Bioengineering**, **37** (5): 445-455.
229. Toriumi, S., Saito, T., Hosokawa, T., Takahashi, Y., vd., 2005. Metal Binding Ability of Metallothionein-3 Expressed in *Escherichia coli*. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, **96** (4): 295-301.
230. Tunalı, S., Çabuk, A., Akar, T., 2006. Removal of lead and copper ions from aqueous solutions by bacterial strain isolated from soil. **Chemical Engineering Journal**, **115** (3): 203-211.
231. Tunalı Akar, S., Gorgulu, A., Anılan, B., Kaynak, Z., Akar, T., 2009. Investigation of the biosorption characteristics of lead(II) ions onto *Symphoricarpos albus*: Batch and dynamic flow studies. **Journal of Hazardous Materials**, **165** (1-3): 126–133.
232. Turner, J.S., Glands, P.D., Samson, A.C., ve Robinson, N.J., 1996. Zn²⁺-sensing by the cyanobacterial metallothionein repressor SmtB: different motifs mediate metal-induced protein-DNA dissociation. **Nucleic Acids Research**, **24** (19): 3714-3721.
233. Türk Standartları Enstitüsü, 2005. TSE 266 İçme suyunda standardı, (Erişim tarihi: Nisan 2021).
234. Uçkun, A.A., Uçkun, M., Akkurt, Ş., 2021a. Efficiency of *Escherichia coli* Jm109 and genetical engineering strains (*E. coli* MT2, *E. coli* MT3) in cadmium removal from aqueous solutions. **Environmental Technology & Innovation**, **24**: 102024.

235. Uçkun, A.A., Uçkun, M., Akkurt, Ş., 2021b. Bioremoval of arsenic from aqueous solutions with metallothionein gene cloned recombinant *Escherichia coli* strains. **Adıyaman Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi**, **8** (14):244–252.
236. Uysal, R., 2010, Sulu ortamdan asit kırmızısı (AK88) boyarmaddesinin giderimi için montmorillonit türü kil mineralinin adsorpsiyon özelliklerinin araştırılması. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans tezi, Eskişehir, 189 s.
237. Vallee, B. L., 1995. The function of metallothionein. **Neurochemistry International**, **27** (1): 23-33.
238. Valls, M., Atrian, S., de Lorenzo, V., Fernández, L.A., 2000. Engineering a mouse metallothionein on the cell surface of *Ralstonia eutropha* CH34 for immobilization of heavy metals in soil. **Nature Biotechnology**, **18** (6): 661-665.
239. Vasak, M., 2005. Advances in metallothionein structure and functions. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, **19** (1): 13-17.
240. Vasak, M., ve Meloni, G., 2011. Chemistry and biology of mammalian metallothioneins. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, **16** (7): 1067.
241. Vergili, İ., 2006. Sulardan Adsorpsiyonla Organik Madde Gideriminin Spektral Absorpsiyon Katsayısı (SAK254) Parametresiyle İzlenmesi. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, 166 s.
242. Verma, S., Kuila, A., 2019. Bioremediation of heavy metals by microbial process. **Environmental Technology & Innovation**, **14**: 100369.
243. Vijayaraghavan, K., Yun, Y.S., 2008. Bacterial biosorbents and biosorption. **Biotechnology Advances**, **26** (3): 266–291.
244. Vijver, M., Gestel, C., Lanno, R., 2004. Internal Metal Sequestration and Its Ecotoxicological Relevance: A Review. **Environmental Science & Technology**, **38** (18): 4705–4712.

245. Wikipedia., 2022. Escherichia coli. (Web sayfası: [https://tr.wikipedia.org/wiki/Escherichia coli](https://tr.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli)), (Erişim tarihi: 22.01.2022).
246. Vinodhini, V., Das, N., 2009. Mechanism of Cr (VI) biosorption by neem sawdust. **American-Eurasian Journal of Scientific Research**, 4 (4): 324-329.
247. Viti, C., Pace, A., Giovannetti, L., 2003. Characterization of Cr(VI)-resistant bacteria isolated from chromium-contaminated soil by tannery activity. **Current Microbiology**, 46 (1): 1-5.
248. Volesky, B., 2001. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. **Hydrometallurgy**, 59 (2): 203-216.
249. Vural, A., Demir, S., Boyno, G., 2018. Biyoremediasyon ve Fungusların Biyoremediasyonda Kullanılması. **Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi**, 28: 490-501.
250. Wang, J., Chen, C., 2006. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. **Biotechnology Advances**, 24 (5): 427-451.
251. Wang, X.S., Li, Z.Z., Sun, C., 2008. Removal of Cr(VI) from aqueous solutions by low-cost biosorbents: marine macroalgae and agricultural by-products. **Journal of Hazardous Materials**, 153:1176–1184.
252. Wang, J., Chen, C., 2009. Biosorbents for heavy metals removal and their future. **Biotechnology Advances**, 27: 195-226.
253. Wang, T., Yao, J., Yuan, Z., Zhao, Y., Wang, F., Chen, H., 2018. Isolation of lead-resistant *Arthrobacter* strain GQ-9 and its biosorption mechanism. **Environmental Science and Pollution Research**, 25 (4): 3527-3538.
254. Wang, J., Zhao, S., Ling, Z., 2021. Enhanced removal of trivalent chromium from leather wastewater using engineered bacteria immobilized on magnetic pellets. **Science of The Total Environment**, 775: 145647.
255. Watt, G.C.M., Britton, A., Gilmour, H.G., Moore, M.R., vd., 2000. Public health implications of new guidelines for lead in drinking water: a case study in an area

with historically high water lead levels. **Food and Chemical Toxicology**, **38**: 73-79.

256. West, A.K., Stallings, R., Hildebrand, C.E., Chiu, R., vd., 1990. Human metallothionein genes: structure of the functional locus at 16q13. **Genomics**, **8** (3): 513-518.
257. Wierzba, S., Latała, A., 2010. Biosorption lead (II) and nikel (II) from an aqueous solution by bacterial biomass. **Polish Journal of Chemical Technology**, **12** (3): 72-78.
258. Wise, S.S., Elmore, L.W., Holt, S.E., Little, J. E., vd., 2004. Telomerase-mediated lifespan extension of human bronchial cells does not affect hexavalent chromium-induced cytotoxicity or genotoxicity. **Molecular and Cellular Biochemistry**, **255** (1-2): 103-111.
259. Wu, M., Li, Y., Li, J., Wang, Y., vd., 2019. Bioreduction of hexavalent chromium using a novel strain CRB-7 immobilized on multiple materials. **Journal of Hazardous Materials**, **368**: 412-420.
260. Xie, P., Hao, X., Mohamad, O.A., Liang, J., Wei, G., 2013. Comparative study of chromium biosorption by Mesorhizobium amorphae strain CCNWGS0123 in single and binary mixtures. **Applied biochemistry and biotechnology**, **169** (2): 570-587.
261. Xu, W.H., Jian, H, Liu, Y.G., vd., 2015. Bioreduction of Chromate by an Isolated Bacillus anthracis Cr-4 with Soluble Cr(III) Product. **Water, Air, Soil Pollution**, **226** (82): 1-9.
262. Varınca, K., Uçkun, M., Akkurt, Ş., Uçkun, A.A., 2021. Ralstonia eutropha H16 suşuyla sulu çözeltilerden kurşun ve bor biyogiderimi. **Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi**, **37** (2):314 322.
263. Yalçın, S., 2016. Atıksulardan İzole Edilen Pseudomonas spp’ ların Ekzopolisakkarit Üretimine Bazı Ağır Metallerin Etkisi. Nevşehir Üniversitesi,

Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Nevşehir, 99 s.

264. Yang, C., Xu, L., Yan, L., Xu, Y., 2010. Construction of a genetically engineered microorganism with high tolerance to arsenite and strong arsenite oxidative ability. **Journal of Environmental Science and Health Part A**, 45 (6): 740-745.
265. Yang, H.Z., Gu, W.J., Chen, W., Hwang, J.S., vd., 2019. Metal binding characterization of heterologously expressed metallothionein of the freshwater crab *Sinopotamon henanense*. **Chemosphere**, 235: 926-934.
266. Yang, X., Zhao, Z., Yu, Y., vd., 2020. Enhanced biosorption of Cr(VI) from synthetic wastewater using algal-bacterial aerobic granular sludge: Batch experiments, kinetics and mechanisms. **Separation and Purification Technology**, 251:117323.
267. Yao, Y., Hu, L., Li, S., Zeng, Q., Zhong, H., He, Z. 2020. Exploration on the bioreduction mechanisms of Cr (VI) and Hg (II) by a newly isolated bacterial strain *Pseudomonas umsongensis* CY-1. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 201, 110850.
268. Yaşar, C., Saraçoğlu, D., Özperk, M., Aldemir, S.S. 2017. Genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO), pp. 1-8. Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar ve Biyogüvenlik (Ed: İsmail Bezirganoğlu). Pegem Akademi, Türkiye.
269. Yu, L.J., Shukla, S.S., Dorris, K.L., Shukla, A., Margrave, J.L., 2003. Adsorption of chromium from aqueous solutions by maple sawdust, **Journal of Hazardous Materials**, 100: 53–63.
270. Zabochnicka Swiątek, M., Krzywonos, M., 2014. Potentials of biosorption and bioaccumulation processes for heavy metal removal. **Polish Journal of Environmental Studies**, 23 (2): 551–561.
271. Zakaria, Z.A., Zakaria, Z., Surif, S., Ahmad, W.A., 2007. Hexavalent chromium reduction by *Acinetobacter haemolyticus* isolated from heavy-metal contaminated wastewater. **Journal of Hazardous Materials** 146: 30–38.

272. Zeng, Q., Hu, Y., Yang, Y., Hu, L., Zhong, H., He, Z. 2019. Cell envelop is the key site for Cr(VI) reduction by *Oceanobacillus oncorhynchi* W4, a newly isolated Cr(VI) reducing bacterium, **Journal of Hazardous Materials**, **368**: 149-155.
273. Zhai, Q., Fengwei, T., Wang, G., Zhao, J., Liu, X., vd., 2016. The cadmium binding characteristics of a lactic acid bacterium in aqueous solutions and its application for removal of cadmium from fruit and vegetable juices. **RSC advances**, **6** (8): 5990-5998.
274. Zhang, W., Chen, L., Liu, D., 2012. Characterization of a marine-isolated mercury-resistant *Pseudomonas putida* strain SP1 and its potential application in marine mercury reduction. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **93** (3):1305–1314.
275. Zhang, B., Zhou, S., Zhou, L., Wen, J., Yuan, Y., 2019. Pyrolysis temperature-dependent electron transfer capacities of dissolved organic matters derived from wheat straw biochar. **Science and Total Environment** **696**:133895.
276. Zhang, C., Ren, H. X., Zhong, C. Q., Wu, D., 2020. Biosorption of Cr (VI) by immobilized waste biomass from polyglutamic acid production. **Scientific Reports**, **10** (1): 1-8.
277. Zhao, X.W., Zhou, M.H., Li, Q.B., Lu, Y.H., He, N., Sun, D.H., Deng, X. 2005. Simultaneous mercury bioaccumulation and cell propagation by genetically engineered *Escherichia coli*, **Process Biochemistry**, **40** (5): 1611-1616.
278. Zheng, W. J., Spassov, V. Z., Yan, L., Flook, P. K., vd., 2004. A hidden Markov model with molecular mechanics energy-scoring function for transmembrane helix prediction. **Computational Biology and Chemistry**, **28** (4): 265-274.
279. Zhu, W., Chai, L., Ma, Z., vd., 2008. Anaerobic reduction of hexavalent chromium by bacterial cells of *Achromobacter* sp. Strain Ch1. **Microbiology Research**, **163**: 616–623.

280. Ziagova, M., Dimitriadis, G., Aslanidou, D., 2007. Comparative study of Cd(II) and Cr(VI) biosorption on *Staphylococcus xylosus* and *Pseudomonas* sp. in single and binary mixtures. **Bioresource Technology**, **98**: 2859–2865.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Şeyma AKKURT

Uyruğu: Türkiye (T.C)

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi, Çevre Mühendisliği Bölümü	2016
Lisans	Erciyes Üniversitesi, Çevre Mühendisliği Bölümü	2014
Lise	Behice Yazgan Lisesi, Kayseri	2009

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2017-Halen	Adıyaman Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümü	Araştırma Görevlisi

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

SCI/SCI-E Yayınlar

- Akkurt, Ş., Oğuz, M., Alkan Uçkun, A., 2022. Bioreduction and bioremoval of hexavalent chromium by genetically engineered strains (*Escherichia coli* MT2A and *Escherichia coli* MT3). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38 (45).
- Alkan Uçkun, A., Uçkun, M., Akkurt, Ş., 2021. Efficiency of *Escherichia coli* Jm109 and genetical engineering strains (*E. coli* MT2, *E. coli* MT3) in cadmium removal from aqueous solutions. *Environmental Technology & Innovation*, 24: 102024.

Ulusal Yayınlar

- Uçkun, A. A., Uçkun, M., Akkurt, Ş., 2021. Metallotiyonein Geni Klonlanmış Rekombinant *Escherichia Coli* Suşlarıyla Sulu Çözeltilerden Arsenik Biyogiderimi. *Adıyaman Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8 (14), 244-252.
- Varınca, K., Uçkun, M., Akkurt, Ş., Uçkun, A. A., 2021. *Ralstonia eutropha* H16 suşuyla sulu çözeltilerden kurşun ve bor biyogiderimi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 37 (2).
- Akkurt Ş., Oğuz M., 2021. Atıksularda Koronavirüslerin Varlığı, Akıbeti ve Giderimi: COVID19 Üzerine Bir Derleme, *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 23, 330 – 340.
- Akkurt Ş., Oğuz M., 2019. Atıksu Arıtma Tesislerinde Mikro Kirleticilerin Arıtılabilirliği, *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 22 (2), 58-77.
- Oğuz M., Akkurt Ş. 2017. Kayseri İlinin Yenilenebilir Enerji Potansiyeli, *Niğde Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 6 (2), 362-374.