

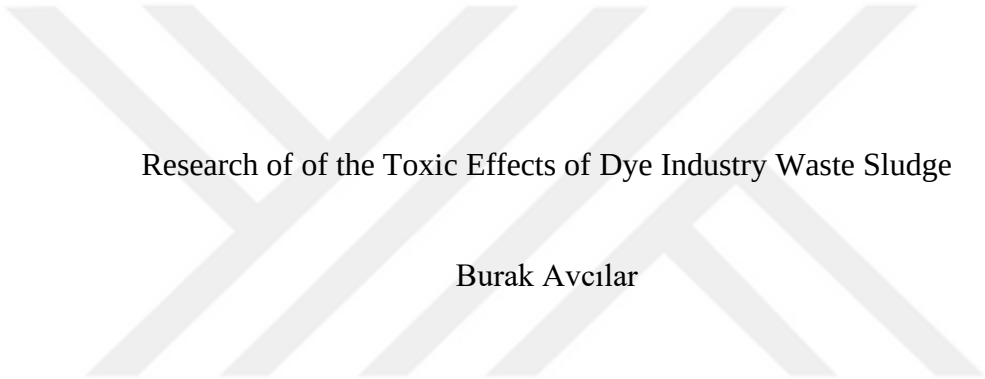
Boya Endüstrisi Atık Çamurunun Toksik Etkilerinin Araştırılması

Burak AVCILAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Mayıs 2022



Research of of the Toxic Effects of Dye Industry Waste Sludge

Burak Avcılar

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

May 2022

Boya Endüstrisi Atık Çamurunun Toksik Etkilerinin Araştırılması

Burak AVCILAR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Bilim Dalında

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ferhan Korkmaz

Mayıs 2022

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Dr. Öğr. Üyesi Ferhan Korkmaz danışmanlığında hazırlamış olduğum “Boya Endüstrisi Atık Çamurunun Toksik Etkilerinin Araştırılması” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim.

26/05/2022

Burak AVCILAR
İmza

ÖZET

Boya endüstrisinde, boya üretim proseslerinde ve bunun gibi diğer sanayi işletmelerinde üretimden kaynaklı ortaya çıkan boya atık çamurunun toksik etkisi günümüzde önemini koruyan konular arasındadır. Oluşan bu atık çamurun içerisindeki yüksek inorganik madde içeriği nedeniyle doğrudan uzaklaştırılması mümkün değildir, arıtılması zorunludur. Bu nedenle boya üretimi sırasında ortaya çıkan atık çamurun toksik etkilerinin incelenmesi gerekir.

Bu çalışma boya üretim tesisinden üretim kaynaklı ortaya çıkan atık çamurun toksik etkilerinin araştırılmasını kapsamaktadır. Boya endüstrisine ait atık çamurun biyosorpsiyon yöntemiyle giderimi yapılmış, giderimden önce ve sonra toksik etkileri araştırılmıştır. Bunun için önce atık çamurun 100, 50, 25, 10, 1 konsantrasyonları hazırlanmıştır. Karakterizasyonu için KOİ ve pH değerleri ölçülmüştür. İçerisinde bulunan ağır metal konsantrasyonları (Ca, Fe, Ni, Zn, Cr, Mg, Pb, Cu, Hg ve Mn) ise ICP-MS analizi ile belirlenmiştir. Atık çamurun biyosorpsiyonu biyosorbent test düzeneğinde, endüstriyel atık sulardan elde edilmiş bir mikroorganizma kullanılarak optimum koşullara göre gerçekleştirilmiştir. Genetik materyalde meydana gelen değişikliklerin belirlenmesi için, in vitro ortamda çoğaltılan *Klebsiella pneumoniae* kullanılmıştır. Varsayılan genotoksik etkiler kullanılan organizmaya göre dizayn edilmiş 10 bazlık 4 primer (OPAR3, OPAR8, Primer640, AP4) kullanılarak RAPD-PCR deney sistemi ile analiz edilmiştir. Veriler matematiksel modelleme programları (Image Lab 5.0 ve PyElph 1.4) tarafından değerlendirilmiştir. Atık çamurun sitotoksik etkisi ise, bakteriyel lüminensans *Vibrio fischeri*'nin ışığa yeteneğinin baskılayıcı direncine dayanarak Mikrotoks deney sistemi ile analiz edilmiştir. Biyosorpsiyon sonrasında boya atık çamuru yıkımı sonucunda oluşan ürünlerin toksisitesinde bir düşüş oluşturduğu görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Boya endüstrisi, Atık çamur, Genotoksisite, RAPD-PCR, *Klebsiella pneumoniae*, Sitotoksisite, Mikrotoks, *Vibrio fischeri*.

SUMMARY

The toxic effect of paint waste sludge resulting from production in the paint industry, paint production processes and other similar industrial enterprises is among the issues that maintain its importance today. Due to the high content of inorganic substances in this waste sludge, it is not possible to be removed directly, it has to be treated. For this reason, the toxic effects of the waste sludge generated during paint production should be examined.

This study covers the investigation of the toxic effects of the waste sludge produced from the paint production facility. Waste sludge belonging to the paint industry was removed by biosorption method, and its toxic effects were investigated before and after the removal. For this, 100, 50, 25, 10, 1 concentrations of the waste sludge were prepared. KOI and pH values were measured for characterization. The heavy metal concentrations (Ca, Fe, Ni, Zn, Cr, Mg, Pb, Cu, Hg and Mn) in it were determined by ICP-MS analysis. The biosorption of the waste sludge was carried out in a biosorbent test setup, using a microorganism obtained from industrial wastewater, according to optimum conditions. *Klebsiella pneumoniae* propagated in vitro was used to determine the changes in genetic material. The putative genotoxic effects were analyzed by the RAPD-PCR assay system using 4 primers of 10 bases (OPAR3, OPAR8, Primer640, AP4) designed according to the organism used. Data were evaluated by mathematical modeling programs (Image Lab 5.0 and PyElph 1.4). The cytotoxic effect of the sludge was analyzed with the Mikrotox test system based on the suppressive resistance of the irradiation ability of bacterial luminescence *Vibrio fischeri*. It has been observed that the toxicity of the products formed as a result of the dye waste sludge destruction after biosorption has decreased.

Keywords: Paint industry, Sludge, Genotoxicity, RAPD-PCR, *Klebsiella pneumoniae*, Cytotoxicity, Mikrotox, *Vibrio fischeri*.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	2
2.1. Boya Endüstrisinin Genel Özellikleri	2
2.2. Boya Endüstrisi Atık Çamurunun Biyolojik ve Çevresel Etkileri	3
2.3. Boya Üretimi Sırasında Oluşan Atık Çamurun Karakterizasyonu	5
2.4. Biyosorpsiyon Yöntemi ile Biyosorpsiyon Uygulaması	6
2.5. Genetik ve Yapısal Varyasyonlar	7
2.6. Toksikoloji ve Toksik Etki Mekanizmaları	9
2.7. Genetik Toksisite	12
2.8. Genotoksisite Testlerinin Kullanım Alanları	13
2.9. RADP (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA) Yöntemi	13
2.10. Akut Toksisite Testi ile Toksisitenin Araştırılması.....	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	18
3.1. Materyal.....	18
3.1.1. Boya çamurunun eldesi ve analizi.....	18
3.1.2. Toksisite çalışmasında kullanılan mikroorganizmalar	19
3.1.3. Çalışmada kullanılan besiyerleri	19
3.1.3.1. <u>Malt Ekstrat Agar (MEA)</u>	19
3.1.3.2. <u>Üst Agar</u>	19
3.1.3.3. <u>Nutrient Agar (NA)</u>	19
3.1.3.4. <u>Nutrient Broth (NB)</u>	20

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.1.3.5. <u>Eozin Metilen Blue Agar (EMB Agar)</u>	20
3.1.4. Çalışmada kullanılan çözeltiler	20
3.1.4.1. <u>Serum Fizyolojik (SF)</u>	20
3.1.4.2. <u>pH ayarlamasında kullanılan çözeltiler</u>	21
3.1.4.3. <u>KOİ analizinde kullanılan çözeltiler</u>	21
3.1.4.4. <u>DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler</u>	21
3.1.4.5. <u>RAPD yönteminde kullanılan çözeltiler</u>	22
3.1.4.6. <u>Akut toksisite testinde (Mikrotoks) kullanılan çözeltiler</u>	23
3.1.5. Çalışmada kullanılan cihazlar	23
3.2. Yöntem	25
3.2.1. Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ) Analizi ile Kirliliğin Belirlenmesi	25
3.2.2. Sitotoksik konsantrasyonların belirlenmesi	26
3.2.2.1. <u>Atık çamur içinde küf-maya ve bakteri kontrolü</u>	26
3.2.2.2. <u>Atık çamurunun sitotoksik konsantrasyonunun belirlenmesi</u>	26
3.2.2.3. <u>Stok <i>Klebsiella pneumoniae</i> türlerinin büyütülmesi</u>	27
3.2.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'nin DNA ekstraksiyonu	27
3.2.4. RAPD yöntemi ile genotoksitenin belirlenmesi	29
3.2.4.1. <u><i>Klebsiella pneumoniae</i> 'nin genel özellikleri</u>	29
3.2.4.2. <u>RAPD-PCR işleminin yapılışı</u>	30
3.2.5. Biyosorpsiyon yöntemi ile atık çamurun biyosorpsiyonu	32
3.2.6. Atık çamurun toksik etkisinin Mikrotoks ile test edilmesi	33
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	34
4.1. Fizikokimyasal Analizleri Sonuçları	34
4.1.1. KOİ analiz sonuçları	34
4.1.2. pH ölçüm sonuçları	35
4.1.3. Ağır metal analiz sonuçları	35
4.2. Toksisite Testleri Sonuçları	36
4.2.1. RAPD Profillerinin Analizi ve Değerlendirilmesi	36
4.1.1.1. <u>Matris sonuçları</u>	45

İÇİNDEKİLER (devam)**Sayfa**

4.1.1.2. <u>GKS (Genomik Kalıp Stabilite) analizi</u>	54
4.1.1.3. <u>Filogenetik analiz</u>	58
4.2.2. Mikrotoks sonuçlarının değerlendirilmesi	67
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	69
KAYNAKLAR DİZİNİ	71



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Atık çamurun alındığı depo	18
3.2. KOİ tüpleri içerisine konulan maddeler ve miktarları	25
4.1. Spektrometre cihazında okumaları yapılan numuneler	34
4.2. Biyosorpsiyon öncesi OPAR3 jel görüntüleri	37
4.3. Biyosorpsiyon sonrası OPAR3 görüntüleri	38
4.4. Biyosorpsiyon öncesi OPAR8 görüntüleri	39
4.5. Biyosorpsiyon sonrası OPAR8 görüntüleri	40
4.6. Biyosorpsiyon öncesi Primer640 görüntüleri	41
4.7. Biyosorpsiyon sonrası Primer640 görüntüleri	42
4.8. Biyosorpsiyon öncesi AP4 görüntüleri	43
4.9. Biyosorpsiyon sonrası AP4 görüntüleri	44
4.10. Biyosorpsiyon öncesi OPAR3 primeri ile yapılan üç denemenin kümeleme analizi sonucunda elde edilen dendrogramı	59
4.11. Biyosorpsiyon öncesi OPAR8 primeri ile yapılan üç denemenin kümeleme analizi sonucunda elde edilen dendrogramı	60
4.12. Biyosorpsiyon öncesi Primer640 primeri ile yapılan üç denemenin kümeleme analizi sonucunda elde edilen dendrogramı	61
4.13. Biyosorpsiyon öncesi AP4 primeri ile yapılan üç denemenin kümeleme analizi sonucunda elde edilen dendrogramı	62
4.14. Biyosorpsiyon sonrası OPAR3 primeri ile yapılan üç denemenin kümeleme analizi sonucunda elde edilen dendrogramı	63
4.15. Biyosorpsiyon sonrası OPAR8 primeri ile yapılan üç denemenin kümeleme analizi sonucunda elde edilen dendrogramı	64
4.16. Biyosorpsiyon sonrası Primer640 primeri ile yapılan üç denemenin kümeleme analizi sonucunda elde edilen dendrogramı	65
4.17. Biyosorpsiyon sonrası AP4 primeri ile yapılan üç denemenin kümeleme analizi sonucunda elde edilen dendrogramı	66

ÇİZELGELER DİZİNİ

Cizelge

Sayfa

3.1. Genomik DNA izolasyonu için kullanılan reaktifler ve kimyasallar	22
3.2. RAPD işlemi için gerekli bileşenler	22
3.3. Çalışma kapsamında kullanılan cihazlar	24
3.4. Atık çamur konsantrasyonlarının hazırlanışı	27
3.5. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'nin sınıflandırması	29
3.6. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'nin 10 bp izolatının rastgele amplifiye polimorfik DNA (RAPD) profillerini taramak için kullanılan primerler.....	31
3.7. RAPD-PCR koşulları.....	31
3.8. RAPD-PCR protokolü	32
4.1. ICP-MS analizi sonuçları	35
4.2. Biyosorpsiyon öncesi OPAR3 primeri ile yapılan çalışmada ortaya çıkan matrisler...	46
4.3. Biyosorpsiyon öncesi OPAR8 primeri ile yapılan çalışmada ortaya çıkan matrisler...	47
4.4. Biyosorpsiyon öncesi Primer640 primeri ile yapılan çalışmada ortaya çıkan matrisler	48
4.5. Biyosorpsiyon öncesi AP4 primeri ile yapılan çalışmada ortaya çıkan matrisler	49
4.6. Biyosorpsiyon sonrası OPAR3 primeri ile yapılan çalışmada ortaya çıkan matrisler .	50
4.7. Biyosorpsiyon sonrası OPAR8 primeri ile yapılan çalışmada ortaya çıkan matrisler .	51
4.8. Biyosorpsiyon sonrası Primer640 primeri ile yapılan çalışmada ortaya çıkan matrisler	52
4.9. Kontrollerle RAPD amplifikasyonlarını gösteren biyosorpsiyon sonrası AP4 primeri ile yapılan çalışmada ortaya çıkan matrisler.....	53
4.10. Biyosorpsiyon öncesi GKS analizleri için yapılan üç farklı denemede elde edilen a ve n değerlerinin ortalamaları.....	54
4.11. Biyosorpsiyon sonrası GKS analizleri için yapılan üç farklı denemede elde edilen a ve n değerlerinin ortalamaları.....	55
4.12. Biyosorpsiyon öncesi ve sonrası Genomik Kalıp Stabilitesi yüzdeleri.....	56

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)**Çizelge****Sayfa**

4.13. Mikrotoks testi sonucunda biyosorpsiyon öncesi atık çamur konsantrasyonlarında elde edilen akut toksisite değerleri	68
---	----



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
G	Gram
kg	Kilogram
mg	Miligram
cm	Santimetre
ml	Mililitre
M	Molar
µg	Mikrogram
l	Litre
°C	Santigrat derece
Cd	Kadmiyum Elementi Simgesi
Cr	Krom Elementi Simgesi
Fe	Demir Elementi Simgesi
Mg	Magnezyum Elementi Simgesi
Mn	Mangan Elementi Simgesi
Hg	Civa Elementi Simgesi
Pb	Kurşun Elementi Simgesi
Ni	Nikel Elementi Simgesi
As	Arsenik Elementi Simgesi
Zn	Çinko Elementi Simgesi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
EC	Elektriksel İletkenlik
EC ₅₀	Etkili Konsantrasyon
IC ₅₀	İnhibisyon Konsantrasyonu
ppm	Milyonda bir konsantrasyon
MA	Moleküler Ağırlığı
K	Kontrol
gDNA	Genomik DNA
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
DNA	Deoskiribonükleik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
RAPD	Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA
KOİ	Kimyasal Oksijen İhtiyacı
ICP-MS	İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi
GTS	Genomik Kalıp Stabilitesi
dNTP	Deoksinükleotik trifosfat
TAE	Tris-asetat-EDTA

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Boya endüstrisi atık sularından oluşan atık çamur, doğadaki bitki örtüsü ve yaşayan diğer canlılar için ve insan sağlığı için oldukça tehlike oluşturmaktadır. Bu atıkların toksisitesi belirlenmeli; uygun alıcı ortamlara verilmeden önce ekosistemin korunması açısından belirlenen arıtım yöntemi ile arıtımı yapılmalı, sonra deşarj edilmelidir. Boya endüstrisi atıklarının başarıyla arıtılabilmesi için söz konusu atık çamurun öncelikle karakterizasyonu yapılmalıdır.

Bilindiği üzere ağır metaller endüstriyel atıkların uzaklaştırılması gibi farklı fiziksel ve kimyasal prosesler kullanılır. Ancak bu yöntemlerin çoğu zaman ekonomik olmaması, bu alanda önemli bir potansiyele sahip mikroorganizmaların kullanılmaya başlanmasına neden olmuştur (Wang ve Chen, 2009). Bazı mikroorganizmalar yüksek bir metal ilgisine sahip biyomoleküller içermesi sebebiyle biyosorpsiyon kapasitesini arttırmaktadırlar (Kapoor ve Viraraghavan, 1998). Bu özellikte olan mikroorganizmalar, atık çamurların ağır metalleri adsorpsiyonu için kullanılırlar. Çeşitli ağır metalleri içerdği düşünülen boya endüstrisi atık sularında, endüstriyel atık sulardan izole edilmiş, metal adsorbe yeteneğinde olan ölü mikroorganizmalar ile Krom (Cr), Bakır (Cu), Nikel (Ni), Kurşun (Pb), Kadmiyum (Cd), Çinko (Zn), Mangan (Mn), Civa (Hg) ve Demir (Fe) ağır metallerinin, biyosorpsiyonu gerçekleştirilmiştir.

Kimyasal maddelerin ve çevresel örneklerin mutasyonlara, DNA hasarlarına sebep olup olmadığını tespit etmek amacıyla RAPD-PCR ve Mikrotoks yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışma da boya endüstrisi atık çamurunun toksik etkisi, RAPD-PCR ve Mikrotoks yöntemleri ile analiz edilmiştir. Elde edilen veriler bir matematiksel model kullanılarak değerlendirilmiştir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Boya Endüstrisinin Genel Özellikleri

İnsanlık, tarih öncesi çağlardan beri doğal renklendiriciler kullanmıştır. Ancak 1856'da Perkin'in modern sentetik boya endüstrisinin başlangıcını belirleyen leylak rengi keşfidir. Renklendiriciler, görünür aralıkta (400-700nm) ışığı emme veya yayma yetenekleriyle karakterize edilir. Boyaların, renkli görünmelerinin nedeni budur. Kimyasal yapı bakımından renklendiriciler, organik ve inorganik renklendiriciler olmak üzere iki gruptan oluşur. Bu grupların her biri ayrıca doğal ve sentetik bileşiklere ayrılabilir (Hunger, 2007).

Renklendiriciler hem boyaları hem de pigmentleri içerir. Pigmentler, renklendirmek için kullanıldıkları maddelerde çözünmezken, boyaların çoğu bu maddelerde çözünür. Pigmentler ve boyalar arasındaki en önemli fark, pigmentlerin üretildikleri fiziksel formda renklendirici olarak kullanılmalarıdır. Pigment parçacıkları, bir boya içindeki bir polimer gibi ek bileşiklerle alt tabakalara bağlanmalıdır. Boyalar ise çeşitli substratlara (tekstil malzemeleri, deri, kağıt ve saç), içinde tamamen veya en azından kısmen çözündükleri sıvı ile uygulanır. Pigmentlerin aksine boyalar, kullanıldıkları substratlara özel bir afiniteye sahiptirler (Zollinger vd., 2000).

Boyalar, tekstil, deri, boya, kağıt hamuru ve kağıt gibi çeşitli endüstrilerde kullanılan doğal veya sentetik renklendiricilerdir. (Sun ve Yang, 2003). Boyama işlemi sırasında, atık suda boyanın %10 ila 15'i kaybolur. Boyama endüstrilerinden boşaltılan atık sular oldukça renklidir ve alıcı su kütlelerindeki su yaşamı için oldukça toksiktir. (Ravikumar vd., 2005).

Boya, temel olarak bir cismin alt yüzeyine bağlanan ve ona renk veren bir kimyasaldır. Boyanın rengi farklı kromofor gruplarına göre değişir (Sudha vd., 2014). Tekstil, kağıt, boya, kozmetik, deri ve gıda endüstrileri çeşitli boyaları büyük miktarda kullanmaktadır (Porobic vd., 2020).

Boyalar, kullanım alanlarına ve kimyasal yapılarına göre sınıflandırılabilir. Boya genellikle yüksek biyotoksisite, kompleks yapı içeren bir substrattır ve bazı boyalar teratojenik, kanserojen veya mutajeniktir (Jiang vd., 2019).

Boyalar, biyobozunurlukları ve sudaki stabil özellikleri nedeniyle doğa için birincil tehlike olarak bildirilmiştir (Fatima vd., 2017; Zhang vd., 2020). Boyama işlemi sırasında, renklerin yaklaşık yüzde on ila on beşi atıklarla boşaltılır. Boyalar, potansiyel olarak kanserojen olan benzen, piren, P-nitrophenol vb. maddeler içerebilirler. Azo boyaları, indigo boyalar, ksanten boyaları, fitalasiyanin boyaları, nitratlanmış boyalar, difenilmetan boyaları, tripenilmetan boyaları, polimetinik boyalar ve şarbon boyaları kimyasal yapılarına göre boya tipleridir. Vat boyası, asit boyası, orta derecede boya, temel boya, doğrudan boya ve benzeri boyalar uygulamaya dayalı boya türleridir (Berradi vd., 2019).

2.2. Boya Endüstrisi Atık Çamurunun Biyolojik ve Çevresel Etkileri

Boya endüstrilerinden boşaltılan atık su metaller, boyalar ve diğer kirleticilerin bir karışımını içerir. Üretim süreçleri nedeniyle genellikle iki tip endüstriyel atık (sıvı ve katı) oluşur. Sıvı atıklar (yani endüstrilerden salınan atık sular) farklı toksik kirleticiler taşıdığı için mevcut canlı organizmalar için olduğu kadar çevre için de tehlikelidir. Bununla birlikte, endüstriyel atık suların özellikleri ve doğası, üretim sürecine ve ürünlerin türüne dayanmaktadır (Saxena ve Bharagava, 2017).

Proses atıkları farklı endüstriyel üretim prosedürleri sırasında üretilir. Bu tür atıklar oldukça kirlidir ve yüksek KOİ ve BOİ seviyeleri vardır; renk pigmentleri, yüksek pH ve tuz konsantrasyonu içerir (Yaasen ve Scholz, 2018).

Geleneksel atık çamur bertaraf yöntemleri arasında boşaltma, yakma, tuğla ve çimento yapımında kullanma yer alır. Ancak bu araçlar sera gazları üretir ve dolayısıyla çevresel ve ekonomik kaygılara yol açar (Liu vd., 2013). Ayrıca, çamur arazi uygulamasının çevresel tehlikeleri göz ardı edilemez (Zuloaga vd., 2012). Çünkü çamur faydalı besinler içermesine rağmen aynı zamanda ağır metaller, patojenler ve organik kirleticiler de içerir (Kapanen vd., 2013). Bu nedenle çamur tehlikeli atık olarak kabul edilir (Filipovic vd., 2013).

Kararlılıkları ve yüksek toksisiteleri nedeniyle ağır metaller canlı organizmalarda birikebilir (Filipovic vd., 2013). Bununla birlikte, çamur arazi uygulaması için toksisite tehlikesini değerlendirmek için sadece kimyasal analiz kullanmak yetersizdir. Çünkü çamurun kalitesi de yüzlerce farklı organik kirleticiden önemli ölçüde etkilenir (Kapanen vd., 2013). Bu kirleticiler eser düzeyde olmasına rağmen, kimyasal ve biyolojik bozulmaya önemli ölçüde direnç gösterirler ve yüksek çevresel etkinin yanı sıra insan ve hayvan dokularında güçlü bir birikim eğilimine sahiptirler. Bu nedenle, yalnızca kirleticilerin atık sudan uzaklaştırılması düşünülürse, ekolojik tehlikeler hafife alınabilir, çünkü bu kirleticiler çamur tarafından emilebilir (Katsoyiannis ve Samara, 2007).

Boya sanayide oluşan atıklar geri kazanım üniteleriyle üretimin sonraki aşamalarında tekrar kullanılırlar. Endüstride meydana gelen ve sıvı atık olarak adlandırılan atıklar ise su ve solvent bazlı boyaların hatalı üretiminden, ağır metal içerikli yıkamalar esnasında, su ve kostik bazlı yıkamalardan meydana gelmektedir (Nemerow ve Agardy, 1998).

Boya çeşitli faktörlerden (pH, sıcaklık, boya konsantrasyonu, besinler, tuzlar, ajitasyon, oksijen vb.) etkilenebilir. Endüstriyel ölçekli arıtma tesislerinin geliştirilmesi için bir optimizasyon çalışması gereklidir. Endüstriyel atık çamur kütlelerinin su ekosistemine girmesi, deniz ortamının derinliklerine güneş ışığının nüfuz etmesinin azalması, çevreye, insanlara ve diğer yaşam formlarına (hayvanlar/bitkiler/suda yaşayan canlılar) genotoksosite göstermesi gibi çeşitli sorunlara yol açabilir. Atık sularda boya kirleticilerinin varlığı, pH, KOİ, AKM ve BOİ yüksek derecede renklenme ve dalgalanmaya yol açar. Su ortamının diğer organik kirletici kaynakları tarımsal atıklar, diğer antropojenik faaliyetler ve kanalizasyon tesisleridir. Benzen, 2-naftalin, p-aminobenzoik asit, kloroanilin, p-nitrophenol, etilen dibromid ve piren gibi organik bileşikler boya endüstrisinde oldukça kullanılmaktadır ve su kütlelerinde bulunmuştur. Ağır metal kirliliği ile karşılaştırıldığında, organik kirleticiler daha karmaşık ve kapsamlıdır. Organik kirleticilerin çevreye (hava, su ve toprak) sürekli eklenmesi, çevre ve halk sağlığı konusundaki endişeyi artırmaktadır (Varjani vd., 2020).

Ağır metallerle kirlenmiş su ve toprağın genotoksitesini değerlendirmek için çeşitli test yöntemleri uygulanmıştır. Örneğin Ames testi, Comet testi, Kardeş Kromotit Değişimi testleri, Drosophila'da Somatik Mutasyon testi ve transgenik fare tabanlı sistem birçok

memeli sitogenetik ve gen mutasyon testleri ağır metallerin genotoksik etkilerini tespit etmek için kullanılır (Liu vd., 2007).

Bakterilerde yüksek boya konsantrasyonu enzimlerin aktif bölgesini engelleyebilir ve mikroorganizmalar üzerinde toksik bir etki gösterebilir (Varjani vd., 2021).

2.3. Boya Üretimi Sırasında Oluşan Atık Çamurun Karakterizasyonu

Boya sanayi kaynaklı atıklar sadece sıvı olarak karşımıza çıkmaz. Atık sularda olduğu kadar çeşitli proseslerde oluşan farklı nitelikte tehlikeli katı atıklar da söz konusudur. Atık, direkt ya da dolaylı olarak, fabrika kaynaklı olduğu kadar evsel aktiviteler sonucu da oluşabilen, faydasız yan ürünler, yeniden kullanılabilir ürünler ve endüstriyel katı maddeler için kullanılan geniş kapsamlı bir terimdir (Wu, 2012).

Boya üretim tesislerinde, atık suyun yüksek toksisitesinden sorumlu sabunlar, nitratlar, asetik asit, kükürt, krom, vat boyaları ve naftalin bileşikleri ve kadmiyum, nikel, kobalt, kurşun, bakır, arsenik ve civa gibi ağır metaller gibi birçok kimyasal ürün kullanılır (Kant, 2011). Renklendiricilerin yaklaşık yüzde kırkı, kanserojen olan organik olarak bağlanmış klor içerir (Gita vd. 2017). Bu işlenmemiş atık suyun su kütlelerine doğrudan boşaltılması sıcaklığı, bulanıklığı artırabilir, kötü koku verebilir, pH ve renk değiştirebilir ve ayrıca insanlar ve hayvanlar tarafından içme amacıyla kullanılan suyun kalitesini etkileyebilir (Hicham vd., 2019). Bulanıklık ve değişen renk güneş ışığının suya yayılmasını önler, çözünmüş oksijeni azaltır ve sucul organizmaları olumsuz etkiler (Lellis vd., 2019).

Endüstriyel atık su arıtma prosesinden elde edilen çamur genellikle kadmiyum, krom bakır, kurşun, nikel ve çinko gibi önemli miktarda metal biriktirir. Metalin ortamlardaki toksisitesi, kimyasal formlarına kritik olarak bağlıdır. Çamurdaki başlıca metal formları normalde çözünür, çöktürülmüş ve birlikte çöktürülmüş oksitler, adsorbe edilmiş ve biyolojik kalıntılarla ilişkilidir (Yuan ve Weng, 2006).

Boya üretim tesislerinde su tankı içerisinde bulunan atık su bertarafı gerçekleştirilmek üzere ilgili prosese aktarılır. İlgili proseste atıksuya eklenen kimyasallarla ya da filtrasyon işlemleri uygulanarak suyun içerisindeki kalıntı boyanın çamur haline

getirilip sudan ayrılmasını sağlar. Susuzlaştırma işlemi sonucunda oluşan malzemeyi artık atık çamur olarak tanımlayabiliriz. Boya endüstrisinden alınan atık çamur, birincil kategori de olup, çöktürmeden çıkan çamur gri, yapışkan ve çoğu zaman yoğun kokuludur. Bu çamur kolaylıkla çürütülebilir (Metcalf ve Eddy, 1991).

2.4. Biyosorpsiyon Yöntemi ile Biyosorpsiyon Uygulaması

Biyosorpsiyon işlemi, belirli biyokütle türleri tarafından organik veya inorganik kirleticilerin etkili bir şekilde tutulmasını ifade eder. Pratik uygulamalar için, özellikle fermentasyon işleme tesislerinden doğal olarak bol biyokütle türleri veya endüstriyel biyokütle atıkları seçmek önemlidir. Ağır metallerin adsorpsiyonu ve uzaklaştırılması için biyokütlenin kullanılması, şu anda biyokütleyi boşa harcayan endüstriler için gelir sağlayabilir. Ayrıca, biyokütle, basit fermentasyon yöntemleri ve uygun yetiştirme ortamlarında kullanılarak büyütülebilir (Wang & Chen 2009).

Bakteriler, algler, mantarlar ve maya dahil olmak üzere mikroorganizmaların, hem canlı hem de ölü halde ağır metalleri verimli bir şekilde biriktirebildiği bulunmuştur. Canlı biyokütlenin metal iyonlarını bağlamadaki performansı sadece besin ve çevresel duruma değil, aynı zamanda hücre yaşına da bağlıdır. Ayrıca canlı hücreler, belirli bir düzeye ulaşabilen ve hücre ölümü ile sonuçlanabilen ağır metallerin toksik etkisine maruz kalmaktadır (Yan & Viraraghavan 2000). Canlı olmayan biyokütleleri kullanmanın birçok avantajı vardır. Bakım ve beslenme ihtiyaçları yoktur; performansları üzerinde herhangi bir olumsuz etki olmaksızın uzun süre saklanabilir; halkı tehlikeye atacak hiçbir metabolik toksin salınmaz (Zhou, 1999).

Biyosorpsiyonda kullanılan biyokütlenin seçimi yapılırken, biyokütlenin kökeni önemlidir. Bu biyokütleler, endüstriyel atıklardan elde edilen ve hızlı üreyebilen mikroorganizmalardan seçilmelidir. Alg, fungus ya da bakteri gibi doğada oldukça fazla bulunan biyokütleler asit yada baz çözeltisi içerisinde öldürülür, ardından kurutma işlemi uygulanarak eleme yapılır ve biyosorbent elde edilir (Volesky ve Vieira, 2000).

Düşük maliyetli ve kolayca bulunabilen adsorban arayışı, potansiyel metal emici olarak tarımsal ve biyolojik kökenli malzemelerin araştırılmasına yol açmıştır.

Biyosorpsiyon olarak tanımlanan metal giderimi için biyolojik kaynakların uygulanması basit, ekonomik, verimli ve çevre dostu bir teknik olarak önerilmiştir. Seyreltilmiş çözeltilerden metal çıkarmanın düşük maliyeti ve nispeten daha yüksek verimliliği, biyosorpsiyonun ana avantajları arasındadır (Javanbakht vd., 2011). Ayrıca, tehlikeli çamur yan ürünü olmayacaktır ve biyosorbentler birden fazla yeniden kullanım için kolayca yeniden üretilebilir (Volesky, 2001).

2.5. Genetik ve Yapısal Varyasyonlar

Genetik varyasyon, bir popülasyon içerisindeki bireylerin DNA dizilerindeki farklılıklardır. Genetik varyasyonun başlıca kaynakları mutasyon ve rekombinasyondur. Mutasyonlar, DNA dizilerindeki kalıcı değişikliklerdir. Mutasyonlar, DNA replikasyonu sırasında DNA onarım enzimleri tarafından düzeltilemeyen bir hata olduğunda veya DNA üzerinde fiziksel ve kimyasal ajanların etkisi nedeniyle ortaya çıkarlar. Mutasyonların organizmaya hiçbir etkisi olmayabilir veya faydalı/zararlı etkileri olabilir (Fletcher ve Hickey, 2013; Eichler vd., 2019).

Rekombinasyon, genetik varyasyonun bir başka önemli kaynağıdır. Her birey, ebeveynlerinden gelen genetik materyal karışımına sahiptir. Bu genetik materyalin karıştırılması, ökaryotlarda kromozom kopyaları arasındaki kromozomal parça değişimiyle oluşur. Varyant sözcüğü, iki genom arasında çeşitlilik gösteren genom üzerinde belirli bir kısmı belirtmek için kullanılır. Aynı varyantın farklı tiplerine ise “Alel” adı verilir. Varyantlar hücre tipine ve değişim tipine göre sınıflandırılırlar. Hücre tipine göre olan varyantlar, gametik ve somatik olarak ayrılırlar (Eichler vd., 2019). Gametik varyantlar, yumurta veya sperm hücrelerindeki varyantlardır ve ebeveynlerden yavrulara geçebilirler. Somatik varyantlar ise sadece belirli hücrelerde bulunurlar ve genellikle kalıtsal olmayıp çevresel faktörler veya hücre bölünmesindeki hatalar nedeniyle meydana gelirler. Alterasyon tipine göre ise, kromozom sayısı alterasyonları, yapısal alterasyonlar (> 1000 bp) ve dizi alterasyonları (< 1000 bp) olarak sınıflandırılabilirler (Hosler vd., 2014).

Nokta mutasyonları, tek bir baz çiftinde veya az sayıdaki komşu baz çiftlerinde meydana gelen değişimlerdir. Genelde replikasyon sırasında oluşurlar. Nokta mutasyonları baz değişikliği ve baz eklenmesi/çıkarılması şeklinde ortaya çıkabilirler. Baz değişikliği

Transisyon ve Transversion olmak üzere iki farklı şekilde olabilir. Transisyonunda, bir pürin yerine başka bir pürin ($A \leftrightarrow G$) veya bir pirimidin yerine başka bir pirimidin gelir ($C \leftrightarrow T$). Transversiyonda ise bir pürin yerine pirimidin veya bir pirimidin yerine bir pürin gelir ($A \leftrightarrow C$, $A \leftrightarrow T$, $G \leftrightarrow C$, $G \leftrightarrow T$). Diğer şekilde ise bir baz çiftinin eklenmesi (insersiyon) veya çıkarılması (delesyon) söz konusudur. Eklenme veya silinme sayısı üçe tam bölünmüyor ise bu mutasyonlar çerçeve kayması (frameshift)'na neden olurlar. Nokta mutasyonlar, kodlama yapan bölgelerde meydana geliyorsa, protein dizileri üzerindeki etkilerine göre kategorize edilebilir. Sinonim (sessiz) mutasyonlarda, baz değişikliği amino asit değişikliğine yol açmaz. Anlamsız (nonsense) mutasyonlarda, baz değişikliği kodonun “Dur” kodonuna dönüşmesine yol açar. Yanlış anlamlı (missense) mutasyonlarda, baz değişikliği kodonun farklı bir amino asit kodlamasına yol açar. Eğer kodlanan amino asit orijinal amino aside kimsayal olarak benzer ise mutasyon koruyucu (conservative), benzer değilse koruyucu olmayan (non-conservative) olarak adlandırılır. Kodlama yapmayan bölgelerdeki nokta mutasyonlar ise çoğu zaman ya fenotipik değişikliğe sebep olmaz ya da çok az sebep olur ve bu mutasyonların etkilerini tahmin etmek daha zordur. Kodlama yapmayan bölgelerdeki nokta mutasyonlar sessiz olarak adlandırılır (Griffiths vd., 2005).

Terminolojide mutasyon ve polimorfizm terimleri (aynı zamanda nokta mutasyon ve tek nükleotid polimorfizmi; single nucleotide polymorphism-SNP) aynı olayları ifade etmek için kullanılmaktadır. Etimolojik açıdan baktığımızda ise mutasyon bir olay, polimorfizm ise bir durumdur (Karki vd., 2015).

Tek nükleotid polimorfizmleri ve basit dizi uzunluk polimorfizmleri (simple sequence length polymorphism-SSLP) sık kullanılan DNA belirteçleridir. Genomda iki tip tekrar dizileri bulunmaktadır. Bunlar, dağınık (dispersed) tekrar dizileri ve ardışık (tandem) tekrar dizileridir. Dağınık tekrar dizileri genom boyunca dağılmışlardır; ardışık tekrar dizileri ise ard arda dizilmişlerdir. SSLP'ler değişken baz uzunluklarına sahip tekrarlayan bölgelerdir. SSLP'ler iki tipte incelenebilir; minisatelitler, değişken sayıda tandem tekrarları (variable number tandem repeats-VNTR) olarak da adlandırılırlar, tekrar birimleri 20-25 bp uzunluğa sahiptirler. Mikrosatelitler ise, basit/kısa ardışık tekrarlar (simple/short tandem repeats - STR) olarak da adlandırılırlar, genellikle 5-50 kere ardışık olarak tekrarlanan 1-7 bazlık DNA dizileridir. STR'lar hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda yaygın şekilde bulunmaktadır ve canlıların DNA'sını polimorfik yapan özelliklerden biridir. Tekrarlanan

dizi uzunluğuna göre STR'lar mono-, di-, tetra-, petra-, penta- ve hexa- nükleotid tekrarları şeklinde sınıflandırılabilirler (Akbar, 2018).

Yapısal varyasyonlar, 1 kilobaz ve daha büyük, genomik alterasyon içeren DNA bölgeleridir. Mikroskopik ve submikroskopik varyasyon tiplerini (delesyon, duplikasyon, kopya sayısı varyasyonları, insersiyon, inversiyon, translokasyon) içerir. Mikroskopik varyasyonlar optik mikroskop ile tespit edilebilen varyasyonları tanımlamaktadır. Submikroskopik varyasyonlar ise yaklaşık 3 megabazdan daha küçük bölgelerdir. Kopya sayısı varyasyonları (CNVs), referans genomla karşılaştırıldıklarında, farklı sayılarda bulunan, duplikasyon veya delesyon şeklinde ortaya çıkan DNA bölgeleridir. Kromozomal varyasyonlar iki farklı şekilde incelenebilir: Kromozom sayısındaki değişiklikler ve kromozomun yapısındaki değişiklikler. Kromozomun yapısındaki değişiklikler şu beş şekilde özetlenebilir:

1. Delesyon: Kromozomun bir kısmı silinebilir.
2. Duplikasyon: Kromozomun bir kısmı çoğaltılır.
3. Translokasyon: Kromozomun bir kısmı başka bir kromozoma taşınır. İki türü bulunur: Resiprokal translokasyon, iki farklı kromozomdan ayrılan parçaların yer değiştirmesi sonucu meydana gelir; Robertsonian translokasyon ise bir kromozomun başka bir sentromere tutunmasıyla oluşur.
4. Inversiyon: Kromozomun bir kısmı ters çevrilir.
5. İnsersiyon: Bir kromozomun bir kısmı silinir ve başka bir kromozoma eklenir.

Kromozom sayısı varyasyonları ise, bir kromozomun tamamının ya da bir kısmının eklenmesi (anöploidi), bir kromozom setinin kaybı (monoploidi), bir ya da daha fazla kromozom setinin kazanılması (euploidi) şeklinde ortaya çıkabilir. Bu koşulların her biri kromozom sayılarını etkilediğinden, fenotip üzerinde ciddi etkiler gösterebilir. (Temizkan ve Arda, 2017).

2.6. Toksikoloji ve Toksik Etki Mekanizmaları

Toksikoloji kelime olarak “zehir bilimi”dir. Bu yüzyılın baina kadar yeterli olan bu tanım, özellikle son 40-50 yılda bilim ve teknolojiye hızlı gelişiminin toksikoloji bilimine

de yansıması sonucunda yetersiz kalmıştır. “Toksikoloji, kimyasallar ile biyolojik sistem arasındaki etkilemeleri zararlı sonuçları yönünden inceleyen bilim dalıdır” veya “toksikoloji kimyasalların zararsızlık limitlerini belirleyen bilim dalıdır” ekindeki tanımlar toksikolojinin günümüzdeki illevini daha kolay anlatabilmektedir. Ancak toksikolojinin, tanımlayıcı toksikoloji, klinik toksikoloji, çevre toksikolojisi, endüstri toksikolojisi, adli toksikoloji, analitik toksikoloji ve ekotoksikoloji gibi alt dalları düşünülündünde her dalın illevine göre ayrı ayrı tanımlar getirilmesinin gerekliliği ortaya çıkmaktadır (Koeman, 1996).

Toksikoloji amacı, kimyasal maddelerin canlı sistemler üzerindeki zıt etkilerin doğasını incelemek, Bu zıt etkilerin meydana gelme, ortaya çıkma olasılıklarını öngörmek, yarar/zarar oranını ortaya koymak ve risk değerlendirmesini yapmaktır. Bu amaçla farklı tanımları kullanır:

1. Doz: Zehirlenmeyi belirleyen faktördür. Uygun kullanılmadı takdirde her madde zararlı, olumsuz etkiler meydana getirir. Ksenobiyotiklerin (vücuda giren besin aldığı madde) geni bir doz spektrumu vardır. Zararlı etki oluşturma potansiyelleri farklıdır. Her zaman olmasa da çoğunlukla toksisiteyi doz belirler.
2. Akut Etki: Kısa bir süre maruz kalma sonucu etki kendini gösterir.
3. Kronik etki: Tekrarlanan maruz kalmalar sonucu ortaya çıkar. Maruz kalma balangıcıyla etkinin ortaya çıkışı arasında bir süreç vardır.
4. LD50: Bu tanım, üzerinde deney yapılan canlıların yarısının ölmesi için yeterli olan madde miktarını belirtir (ağırlık). Solunum yolu dışında diğer tüm bütün yollarla organizmaya girerek etki gösteren katı veya sıvı haldeki kimyasal maddelerin belirli koşullarda bir kez verildiğinde hayvan popülasyonunun %50’sini öldüren dozdur. LD50 maddelerin toksisite mukayesesini sağlar. Bu ifade ile bir maddenin hangi artlarda zararlı olduğunu da anlamak mümkündür. LD50 veya LC50 değerleri azaldıkça toksisite potansiyeli artar.
5. LC50: Bu tanım, üzerinde deney yapılan canlıların yarısının ölmesi için yeterli olan derişimi belirtir (konsantrasyon). LC değerleri genellikle ortam havasındaki kimyasal madde için bulunur. Ayrıca çevre için de sudaki kimyasal madde konsantrasyonu için kullanılır.
6. Akut toksik etki: Bir kimyasala maddeye tek bir kez ya da 24 saat içinde birkaç kez maruz kalınması sonucunda ortaya çıkan salık üzerindeki olumsuz etki.

Akut maruz kalma: Bir maddeye tek bir kez ya da 24 saat içinde bir kaç kez maruz kalınması (Duffus ve Worth, 1996).

Canlı içinde toksik maddeler etki gösterebilmeleri için öncelikle belli bir konsantrasyondan fazla olması gerekir. Bunun içinde vücuda girmesi gerekmektedir. Vücuda giren toksik maddelerin vücuda girme hızı tamamen toksik maddelerin özelliği ve organizmanın kendi özelliği absorpsiyon hızına balıdır. Vücuda girişi için toksik maddelerin belirli bir konsantrasyonda vücut membranlarını geçmesi gerekir. Bir maddenin fiziksel, kimyasal özellikleri hücre içine giriini belirler. Örnein küçük ve yüksüz moleküller(O₂, CO₂, CO, NO) yüklü ve büyük maddelere göre çok daha hızlı hücre membranından çeker (Choy, 2001).

Ekosistemde bulunan tüm maddeler canlı yapısına girebilir. Çevresini sahip tutmaya çalışan canlıya hem canlı için gereken maddeler hem de canlı yapısın da olmayan yada canlıya zarar veren maddeler aynı anatomik, metabolik yollarlı kullanarak girer. Toksik maddeler vücuda dört ayrı yolla girerler:

1. (ABS=Absorption)Absorpsiyonla deriden,
2. (ABS=Absorption)Absorpsiyonla gözden,
3. (ING=Ingestion) Sindirim ile ağızdan,
4. (INH=Inhalation) Solunum ile akciğerden.

Her kimyasal madde için vücuda giriş yolu veya yolları farklıdır. Bu maddenin özelliği ile canlının özelliğine göre büyük ölçüde değıim gösterir. Toksik maddelerin organizmaya giriş yolunda hangi yollar içinde en büyük yüzey 300 metre kare sindirim sistemin önde gelmektedir (Ramoutsaki vd., 2000). Toksisite, zararın meydana gelmesi için geçen süreye göre akut (kısa süreli etki 24 saat 7 gün) ve kronik (uzun süreli etki 7 gün) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Ford, 1998).

Metabolik toksik: Metabolik zehirlenme denildiinde ise; dokuların etkisiz hale gelmesi anlatılmaktadır. Siyanür ve flor gibi kimyasallar bu tür etkiler yapmaktadırlar (Wax, 1998).

Nörotoksinler: Zehirli maddeler beyin ve sinirleri hedef aldıklarında nörotoksisite olarak tanımlanmaktadır. Bu etkiyi yapabilen kimyasal madde örnekleri olarak; DDT, klorlu hidrokarbon pestisitleri, malathion, pa-rathion, GB ve VX gibi organofosfat pestisitler ve sinir gazları verilebilir (Wax, 1998).

Biyokonsantrasyon bir organizmada bir kimyasal konsantrasyon hava veya su ortamlarına göre organizmanın çevresinden daha yüksek konsantrasyonu biyolojik birikim yapmasıdır. Bu süreç hem doğal ve yapay kimyasallar için aynı olmasına ramen biyokonsantrasyon genellikle organizmaya yabancı kimyasal maddeler gözlenir. Solungaçları (veya bazen deri) yoluyla alım sonra balık ve diğer sucul hayvanları, biyokonsantrasyon için genellikle en önemli biyolojik birikim sürecidir (Wax, 1996).

2.7. Genetik Toksisite

Mutasyonlar, bir somatik hücrede veya bir germ hücresinde, yapısal DNA içeriğindeki kalıtsal değişikliklerdir. Çoğu kanserojenin DNA hasarı oluşturarak ve mutasyonlara neden olarak çalıştığı iyi bilinmektedir. Mitokondriyal ve nükleer DNA hasarları, Alzheimer, Huntington ve Parkinson hastalıkları ile birlikte ataksiler dahil olmak üzere nörodejeneratif bozukluklarla ilişkilidir. Ayrıca, DNA hasarı infertilite, kardiyovasküler hastalık, erken yaşlanma, kök hücre disfonksiyonu, kronik inflamatuvar durumlar ve metabolik sendromlar dahil olmak üzere diğer sayısız insan patolojilerinde nedensel bir rol oynar.

Genotoksisite, insan güvenliğini sağlanması süreci boyunca yeterince değerlendirilmesi gereken önemli bir toksikolojik hedef noktasıdır. Bir dizi güncel in vitro ve in vivo testler, bu tehlikenin tanımlanması, maddelerin incelenmesi için araçlar sağlar. Genetik toksikoloji testleri, tüm yeni kimyasal maddeler ve diğer birçok materyal için kanserojen olmaları nedeniyle tüm dünyada gelişmiş ülkelerde düzenleyici bir gereklilik haline gelmiştir ve bu kimyasalların kalıtsal etkileri büyük bir kamu endişesi olarak kabul edilmektedir (Turkez vd., 2017).

2.8. Genotoksisite Testlerinin Kullanım Alanları

Genetik toksisite ya da genotoksisite testleri 1970'lerden beri kullanılmaktadır ve günümüze kadar mutajenik ve genotoksik maddelerin karsinojenik potansiyellerini ölçebilmek için birçok genotoksisite testi geliştirilmiştir. Bu testler, çeşitli mekanizmalarla doğrudan ya da dolaylı olarak genetik materyalde meydana gelen hasarları saptamak amacıyla geliştirilmiş in vitro ve in vivo testlerden oluşurlar. Genotoksisite testleri ile mutajenlerin tanımlanması, insanda risk tayininin yapılması ve bu maddelere gereksiz maruziyetin önlenmesi genetik toksikolojinin başlıca amaçlarını oluşturmaktadır. Genellikle kısa dönem mutajenite testleri tarama amaçlı kullanılırken, memeli testleri ise insanda risk tayini için kullanılmaktadır. (Gallo, 2001)

Ağır metallerle kirlenmiş su ve toprağın genotoksisitesini değerlendirmek için çeşitli test yöntemleri uygulanır. Örneğin Ames testi, Comet testi (veya alkali tek jel elektroforez testi), kardeş kromatit değişimi, *Drosophila*'da somatik mutasyon testi ve transgenik fare tabanlı sistem gibi. Birçok memeli sitogenetik ve gen mutasyon testlerinin ağır metallerin genotoksik etkilerini tespit etmek için yararlı olduğu bilinmektedir. Bakteri bazlı çeşitli testlerde, metal bileşiklerin çoğu son derece yüksek konsantrasyonda bile hiçbir etki göstermediği görüldü. *Vicia faba* kromozom sapması ve mikronükleus testleri ve *Tradescantia* testleri vb. bu testlerin geniş kullanımı, nispeten düşük hassasiyetleri ve toksik metallerin DNA seviyesindeki etkileri hakkında yeterli bilgi veremeyebilirler. (Liu vd., 2007).

2.9. RADP (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA) Yöntemi

Genotoksisite incelemelerinin metotları devamlı olarak gelişme göstermektedirler. Büyük delesyonlar, insersiyonlar, inversiyonlar, yeniden düzenlenimler ve rekombinasyon gibi değişimler rutin olarak yapılan genotoksisite çalışmalarında kullanılan mikroskobik metotlar kapsamında kromozomal seviyede belirlenebilmektedir. Bu metotlar büyük ölçüde güvenilir olmasına rağmen genetik hasarları ve değişimleri belirlemede zahmet ve uzun süre gerektiren çalışmalardır, üstelik DNA seviyesindeki genom çapında minör değişiklikler kromozomal metotlar yoluyla belirlenememektedir (Noel ve Rath, 2006).

Genotoksisitenin tespiti, kontrol (maruz kalmamış) ve maruz kalan numuneler tarafından üretilen amplifikasyon ürünlerinin karşılaştırılmasına dayanır. Genetik materyalin ekstraksiyonunu takiben, DNA şablonları rastgele sekansın bir oligonükleotid primeri kullanılarak çoğaltılır. RAPD ve benzeri teknikler olmasına rağmen, bu teknikler arasında prosedürel farklılıklar mevcuttur (Meunier ve Grimont, 1993).

RAPD testi ve ilgili teknikler, hibridizasyon tabanlı protokoller gibi geleneksel yöntemlere göre çok sayıda avantaj sunmaktadır. Özellikle, incelenen genom hakkında önceden bilgi sahibi olmak gerekmez. Bu testler çok az kaynak materyal gerektirir ve belirli koşullar altında gerçekleşir. Ayrıca analiz değerli numunelerin taranması için yararlı ya da zararsız olabileceklerini görebilmek açısından değerlendirilir. Ek olarak, tek bir rastgele oligonükleotid primer kullanılır, bu da farklı primerler kullanılarak, karmaşıklık bakımından farklılık gösteren bantlama profillerinin hızla üretilebileceği anlamına gelir. Diğer dikkat çekici avantaj ise, tekniğin genel hassasiyetinin yüksek seviyesidir. Bununla birlikte, bu teknolojiler nispeten ucuzdur ve özel ya da pahalı ekipmanların kullanılmasını gerektirmez. Diğer bir avantaj, optimizasyondan sonra RAPD testinin çok güvenilir olmasıdır. Ve son olarak, RAPD yöntemi, çok çeşitli DNA hasarlarını (örneğin DNA addüktörleri, DNA kırılması) ve mutasyonları (nokta mutasyonları ve büyük yeniden düzenlemeler) tespit etme potansiyeline sahiptir. Kanser araştırmaları alanında, RAPD testi ve ilgili teknikler, değiştirilmiş bölge hakkında önceden bilgi sahibi olmadan, genomik değişikliklerin eşzamanlı olarak tespit edilmesine ve klonlanmasına sağlar (Atienzar ve Jha, 2006).

RAPD testini kullanarak genotoksik etkileri tespit eden ilk çalışma Savva vd. (1994) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, benzo (a) pirene maruz kalan sıçanlardan üretilen RAPD profilleri, kontrol modellerine kıyasla bantların görünümünü ve kaybolmasını ortaya koymuştur. Maruz kalan hayvanların parmak izlerinde gözlenen bu değişiklikler, DNA addüktörlerinin, mutasyonların veya DNA iplikçik kırılmalarının varlığından kaynaklandığını göstermiştir (Savva vd., 1994).

Bir primer bağlanma bölgesinde DNA hasarının ve mutasyonların varlığı, hasar görmemiş ancak başka türlü aynı DNA'dan elde edilen DNA parmak izini değiştirecektir. Bununla birlikte, böyle bir durumun, primer bağlanma bölgeleri arasında bulunan DNA içindeki DNA hasarının doğrudan etkisinin bir sonucu olarak ortaya çıkan RAPD

modellerindeki değişikliklerden daha az sıklıkta ortaya çıkması beklenmektedir. Bunun ana nedeni, primer bağlanma bölgelerinin, amplikonun müdahale eden DNA'sına (maksimum 3-4 kb) kıyasla küçük (10 bp) olmasıdır. DNA lezyonlarının doğrudan etkisinin (örneğin Taq DNA polimeraz bir tür DNA hasarı ile karşılaştığında), RAPD profilleri üzerinde nokta mutasyonlarından daha büyük bir etkiye sahip olması beklenir, çünkü bu tür mutasyonların kalıpları doğrudan etkilemek için primer bağlanma bölgesinde ortaya çıkması gerekir. Bu ifade, nokta mutasyonlarının yapısal etkilerinin profillerde bazı değişikliklere neden olabileceği gerçeğini dikkate almamaktadır (Atienzar ve Jha, 2006).

Jones ve Kortenkamp'a (2000) göre, mutant DNA dizilerine karşılık gelen polimorfik bir bant, mutant olmayan DNA'nın 1/50'lik bir konsantrasyonunda belirginleşmeye başlamıştır (Jones ve Kortenkamp, 2000). Sonuç olarak, daha önce de belirtildiği gibi, DNA'nın en az % 2'si etkilenirse yeni bir bant ortaya çıkabilir. Oluşma olasılığı açısından, yeniden düzenlemeler RAPD profillerini ve özellikle bant görünümünü etkileyen başlıca faktörlerdir. Nokta mutasyonları da RAPD modellerini etkileyebilir, ancak primer bölgelerinde nokta mutasyonlarına sahip olma olasılığı, yeniden düzenlemelerin ortaya çıkmasına kıyasla düşüktür. DNA'ya zarar veren ajanlar, kromozomal lezyonlar ve yeniden düzenlemeler açısından genomun instabilitesine katkıda bulunur ve bu da sonunda RAPD profillerindeki bantların ortaya çıkmasına veya kaybolmasına yol açar (Atienzar ve Jha, 2006).

İkincil yapıyı stabilize eden veya dengesizleştiren mutasyonların, primer bağlanma bölgesinde bulunmasalar bile RAPD polimorfizmleri olarak tespit edilebileceği bildirilmiştir. Bu durumlarda, RAPD testi potansiyel olarak DNA hasarını ve ikincil yapıyı etkileyen mutasyonları, primer bağlanma bölgelerinin kapladığından çok daha büyük bir alanda tespit edebilir. Bu aynı zamanda, müdahale eden DNA'ya kıyasla küçük olan primer bağlanma bölgesinin dizisinin, RAPD polimorfizmlerinde sıklıkla değişmediğini göstermektedir (Bowditch vd., 1993). Son olarak, çalışmalarımızdan birinin sonuçları, kimyasal kaynaklı DNA hasarına ve mutasyonlarına ek olarak, gen ekspresyonundaki varyasyon, sabit genetik değişiklik seviyeleri ve metabolik süreçlerdeki değişiklikler gibi faktörlerin RAPD modellerinde bazı değişikliklere neden olabileceğini öne sürmemize neden oldu. Bununla birlikte, DNA hasarı ve mutasyonları, RAPD modellerini etkileyen ana faktörler gibi görünmektedir (Atienzar vd., 2002). DNA değişikliklerini ve mutasyonlarını

tespit etmek için RAPD yönteminin başarılı bir şekilde uygulanması, genotoksin kaynaklı DNA hasarının rastgele oluşmaması gerçeğiyle ilgilidir (Vogelstein ve Kinzler, 1992).

Bilindiği üzere, genetik ekotoksikoloji çalışmaları ya genotoksinlerin DNA üzerindeki doğrudan etkilerine ya da dolaylı etkilere bağlı genetik çeşitliliğe odaklanmıştır. Ancak Theodorakis'e (2001) göre her iki yaklaşımın da kullanılmasının üç nedenden dolayı avantajlı olacağı açıktır. İlk olarak, popülasyon düzeyinde, popülasyon genetik yapısındaki değişiklikler ile yüksek DNA hasarı seviyeleri arasındaki eşzamanlı tepkiler, popülasyon genetik değişikliklerinin genotoksik kimyasallara maruz kalmaktan etkilendiğine dair kanıt sağlayabilir. İkincisi, alellerin veya diğer genetik belirteçlerin frekansları genotoksikan-kontamine olmuş ve referans popülasyonlar arasında farklılık gösteriyorsa, göreceli miktarda DNA hasarı ile genotip arasındaki ilişkiler, bu değişikliklerin genotoksikan kaynaklı seleksiyondan kaynaklandığına dair kanıt sağlayabilir. Üçüncüsü, gen akışının genetik analizi, kontamine ve referans popülasyonlar arasındaki farklılıkları gizleyebilecek dağılım kalıpları hakkında fikir verebilir (Theodorakis, 2001).

Ekotoksikoloji bölümünde, birçok RAPD çalışması, bant yoğunluğundaki farklılıklar ve RAPD bantlarının kazancı ya da kaybı gibi RAPD değişikliklerini tanımlar. RAPD paternlerinin fenetik ve genetik analizi nadiren denenmiştir. Fenetik analiz durumunda, tanısal olup olmadıklarına bakılmaksızın tüm tekrarlanabilir RAPD bantları dikkate alınır. Genel olarak, eksik RAPD bantları benzerlik ve / veya çeşitlilik ölçümlerini tahmin etmek için kullanılır. Eksik olan bir RAPD bantı sadece "0" olarak puanlanır ve sonuçta benzerlik ya da çeşitlilik endekslerine değer verilmiştir. Genetik analizde (fenetik analizin aksine), bulunmayan bir bant "fenotipik olarak eksprese edilmemiş bir lokus" a karşılık gelir ve çift resesif heterozigotik genotip olarak puanlanır. RAPD tekniğinin ekotoksikolojik bağlamda nasıl uygulanabileceğini açıklayan ve toksik maddelerin popülasyonların genetik yapısını etkileyebileceği tüm doğrudan ve dolaylı yollar hakkında bilgi sağlayan bir derleme yayınlanmıştır (De Wolf vd., 2004).

2.10. Akut Toksisite Testi ile Toksisitenin Araştırılması

Mikrotoks testi, bir toksinin, biyolüminisans özellikli bir bakteri olan *Vibrio fischeri* tarafından ışık üretimi üzerindeki etkisini ölçen hızlı bir toksisite testidir. Testler, ıslak sediment kullanılarak gerçekleştirilir. Mikrotoks toksisite değerlerinin kuru ağırlık bazında ifade edilmesine izin vermek için, her sedimentin sıvı bölüntü kısmı, önce o haliyle tartılmakta, sonra sediment kurutulmakta ve daha sonra tekrar tartılmaktadır. Bu testi uygulamak için NaCl solüsyonu kullanılmaktadır (Grant ve Briggs, 2002).

Vibrio fischeri, parlaklığı metabolizmalarının doğal bir parçası olan patojenik olmayan deniz bakterileridir. *Vibrio fischeri*'nin toksik bir maddeye maruz kalması sırasında, bakteri solunum sistemi bozulur ve bu da biyolüminesans yoğunluğunun azalmasına neden olur. Bu sürece ek olarak, toksik maddeler bakteriyel hücre reseptörleri ile etkileşime girebilir, hücre zarını bozabilir ve enzimatik yolları etkileyebilir (Wilk ve Szalińska, 2011). *Vibrio fischeri*, biyoanalitik testlerde kullanılır, çünkü çok çeşitli toksik maddelere karşı hassastırlar. Toksik bir bileşiğe maruz kaldığında, biyolüminesansa bir azalma gözlenebilir ve lüminesansa yüzde bir değişiklik toksisite ile doğrudan ilişkili olabilir. Bu test sonucunda, EC50 değerleri elde edilir. Bu test hızlı, uygun maliyetli, tekrarlanabilir ve dünya çapında etkili bir toksisite testi olarak kabul edilmektedir. Bu bakteriyel biyotahlil, bitkilerden doğrudan akış, liç veya dikkatsiz bertaraf yoluyla su ortamına ulaşabilen herbisidal tuzların ve iyonik sıvıların ekotoksitesini değerlendirmek için sıklıkla kullanılır (Oliveira vd., 2011).

Akut toksisite testi genellikle kalıcı organik kirleticiler (KOK) içeren endüstriyel atık suların arıtılmasında kullanılan atık çamurun toksisitesini değerlendirmek için kullanılır (Sponza ve Kuscı, 2011). Bazı araştırma sonuçları, arıtma çamuru kompostlaştırıldıktan sonra, çamurun akut toksisitesinin ve genotoksitesinin, bazı refrakter kirleticilerin azaltılması veya verimli bir şekilde uzaklaştırılmasıyla önemli ölçüde azaldığını göstermektedir (Kapanen vd., 2013). Bu nedenle, Mikrotoks testi, atık çamurların ekolojik tehlikelerini değerlendirmek için en etkili yöntemdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Boya çamurunun eldesi ve analizi

Atık çamur numunesi Bozüyük-Eskişehir yolu üzerinde faaliyet gösteren boya üretim tesisinden izin alınarak Şekil 3.1. de görülen depolama alanından temin edilmiştir. EPA 3051-A standartlarına göre konteynerde bekletilen atık çamur alınarak zaman kaybetmeden laboratuvara getirilip, etiketleme yapılarak -20 °C’de buzdolabına konulmuştur. Ardından WTW-Inolab ile pH değeri kontrol edilmiş ve ICP-MS cihazı ile içeriğindeki ağır metallerin analizleri için ESOĞU/ARUM araştırma laboratuvarı ve uygulama merkezine gönderilmiştir.



Şekil 3.1. Atık çamurun alındığı depo

3.1.2. Toksisite çalışmasında kullanılan mikroorganizmalar

Çalışmada *Klebsiella pneumoniae* suşlarının genotoksik, *Vibrio fischeri* suşlarının ise sitotoksik aktivitesini belirlemek için kullanılmıştır.

3.1.3. Çalışmada kullanılan besiyerleri

3.1.3.1. Malt Ekstrat Agar (MEA)

Maya ve küf sayımında kullanıldı. Bakteri florasının baskılanması için, filtre ile sterilize edilen %10 laktik asit veya %5 tartarik asit çözeltisi ile pH 3,5'e düşürülmüştür. Dehidre besiyeri, 48,0 g/L olacak şekilde saf su içerisinde ısıtılarak çözündürüldü ve otoklav da 121°C 10 dk sterilize edilerek steril plaklara 12,5'er ml dökülmüştür.

3.1.3.2. Üst Agar

Sitotoksik konsantrasyonların belirlenmesi yönteminde kullanılmıştır. Üst agar besiyeri bileşikleri:

Agar	6 g/l
NaCl	5 g/l

Tüm çözünenler 2 litrelik bir erlenin içerisine konmuş, üzerine 1 litre saf su ilave edilmiş ve 121 °C de 15 dk otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

3.1.3.3. Nutrient Agar (NA)

Sitotoksik etkinin belirlenmesi için kullanılmıştır. Dehidre besiyeri 23,0 g/1000 ml olacak şekilde saf su içinde ısıtılarak çözündürülmüştür. 121 °C de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

3.1.3.4. Nutrient Broth (NB)

Klebsiella pneumoniae'nin büyüülmesi için ve sitotoksik etkinin belirlenmesi kullanılmıştır. Dehidre besiyeri 8,0 g/1000 ml olacak şekilde saf su içinde ısıtılarak çözündürülmüştür. 121 °C de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

3.1.3.5. Eozin Metilen Blue Agar (EMB Agar)

Klebsiella pneumoniae identifikasyonunda seçici (selektif) besiyeri olarak kullanılmıştır.

Peptone	10 g
K ₂ HPO ₄	2 g
Laktoz	5 g
Sükroz	5 g
Metilen Mavisi	0,07 g
Agar Agar	13,5 g
Eozn Y Yellowish	0,4 g
Distile Su	1000 ml

Tüm bileşenler 2 l'lik erlennin içerisine konulmuştur. Üzerine 1 l distile su eklenmiş ve 121 °C de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.4. Çalışmada kullanılan çözeltiler

3.1.4.1. Serum Fizyolojik (SF)

1 litre de 9 gram NaCl ilave edilerek, distile su içerisinde çözündürülmüş ve homojen hale getirilmiştir. Bulunan tüplere 9 ml olacak şekilde dağıtılarak, otoklav da 121°C'de 15 dk olarak steril edilmiştir.

3.1.4.2. pH ayarlamasında kullanılan çözeltiler

pH ayarlaması olan deneylerde Sodyum hidroksit (4/100 ml) ve %37'lik Hidrojen klorür çözeltisi (8,4/91,6 ml) 1 N olarak kullanılmıştır.

3.1.4.3. KOİ analizinde kullanılan çözeltiler

Potasyum Bikromat Çözeltisi (Parçalama Çözeltisi): KOİ tayini için kullanılmıştır. 10,216 g potasyum bikromat ($K_2Cr_2O_7$) saf su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır. 1 l'lik balon joje içerisine 167 ml derişik sülfirik asit (H_2SO_4) ve 33 g civa sülfat ($HgSO_4$) konmuştur. İyice karışması sağlanmıştır. Daha sonra potasyum bikromat çözeltisi bunun üzerine yavaş yavaş (bekleyip dökmek suretiyle) eklenmiştir. Manyetik karıştırıcının üzerinde yavaş yavaş ve dikkatli bir şekilde bu ekleme yapılmıştır. Soğuduktan sonra saf su ile 1 l'ye tamamlanmıştır. 500 ml'lik potasyum bikromatlı balon jojenin de tamamen aktarımını sağlamak amacıyla pisetle iyice yıkanıp temizlenmiştir.

Gümüş sülfat ($AgSO_4$) Çözeltisi (Asit Çözeltisi): 11 g $AgSO_4$, H_2SO_4 ile 1 l'ye tamamlanıp çözünmesi sağlanmıştır. Çözünmesi için sıcaklık artırmadan manyetik karıştırıcıda bir gün beklenmiştir.

3.1.4.4. DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler

Genomik DNA izolasyonu, hem manuel olarak hem de ticari DNA İzolasyon Kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Genomik DNA izolasyon işlemi için kullanılan reaktif ve kimyasallar Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Genomik DNA izolasyonu için kullanılan reaktifler ve kimyasallar

DNA izolasyonu bileşenleri	
Lizozim	SDS (Sodyum dodesil sülfat)
Proteinaz K	Magnezyum Klorür Çözeltisi
Etil Alkol	Ekstraksiyon Tamponu
Ultra Saf Su	NaCl Çözeltisi
Kloroform: İzamilalkol: Fenol	CTAB (Setrimonyum bromür)
Sıvı Azot	RNAse A Solüsyonu
Etil Asetat Çözeltisi	İzopropanol

3.1.4.5. RAPD yönteminde kullanılan çözeltiler

RAPD işlemi için gerekli bileşenler Çizelge 3.2 de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. RAPD işlemi için gerekli bileşenler

Moleküler Grade Su
1x TAE Tampon
Primerler (OPAR 3, OPAR 8, AP 4, Primer 640)
Taq Polimeraz Enzimi
dNTP
gDNA (genomik DNA)
Agaroz
EtBr (Etidyum Bromür)
GoT aq® G2 Hot Start Green Master Mix
Nuclease Free Water

Agaroz jel (%1): 1 g agaroz tartılıp 99 mL saf suya eklendi ve homojen karışımını sağlamak için mikrodalga fırında 2-3 dk ısıtıldı.

Tris çözeltisi: 500 mM Tris pH: 8.0 'e HCl ile ayarlandı.

EDTA çözeltisi: 500 mM EDTA (Etilendiamin–tetra asetik asit disodyum tuzu), 5 M NaOH (Sodyum Hidroksit) ile pH:8.0 'e ayarlandı.

TBE tamponu: 54 g Trisma base, 27,5 g Borik Asit ve 20 ml 0,5 M EDTA, 800 ml distile suda çözülür, 1000 ml'ye tamamlandı.

3.1.4.6. Akut toksisite testinde (Mikrotoks) kullanılan çözeltiler

Diluent: Seyreltici, numuneyi ve reaktifi seyreltmek için kullanılan, özel olarak hazırlanmış, toksik olmayan bir %2 Sodyum klorür (NaCl) çözeltisidir. Reaktifteki deniz bakterisi, %2 NaCl tarafından sağlanan ozmotik korumaya ihtiyaç duyar.

Osmotik Ayarlama Sıvısı (OAS): Osmotik Ayar Çözeltisi (OAS), numunenin ozmotik basıncını yaklaşık %2 NaCl'ye ayarlamak için kullanılan, özel olarak hazırlanmış, toksik olmayan bir %22 Sodyum klorür (NaCl) çözeltisidir. Bir numuneyi ozmotik olarak ayarlamak için, on kısım numuneye bir kısım OAS eklenir. ($X \text{ ml numune} \times 0.1 = \text{ml OAS}$)

Sulandırma Solüsyonu: Özel olarak hazırlanmış toksik olmayan Ultra Saf Su için alternatif bir solüsyondur. Oda sıcaklığında saklandığında raf ömrü bir yıldır.

3.1.5. Çalışmada kullanılan cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazların listesi Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışma kapsamında kullanılan cihazlar

Cihaz adı	Markası
Sterilizatör	MEMMERT
Otoklav	HİRAYAMA
Buzdolabı	ARÇELİK
Derin dondurucu	THERMO SCIENTIFIC
Etüv	BINDER
Spektrofotometre	SCHIMADZU UV-VIS SPECTROPHOTOMETER UV-2550
Saf su cihazı	MES
pH/EC metre	WTW INOLAB PH-ION 735
ICP-MS	PERKİN-ELMER
Su banyosu	LAB COMPANION BS-31
Analitik terazi	SARTORIUS
Mikrodalga fırın	ARÇELİK
Real Time-PCR	ROCHE
Koloni sayıcı	STUART SC6PLUS
Mikroskop	OLYMPUS
Multi pipet	GİLSON
Pipet	GİLSON
Manyetik karıştırıcı	HEIDOLPH MR3001
Vorteks	BIO-COTE
Jel elektroforez sistemi	CLIEVER SCIENTIFIC
Microtox©	SDI M 500

3.2. Yöntem

3.2.1. Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ) Analizi ile Kirliliğin Belirlenmesi

Endüstrilerin tahmini sonucunda, üretilen malzemenin kullanım alanına bağlı olarak, ürün yapısının dış etkilere karşı dirençli olması beklenmektedir. Boya maddesi değişik çevre koşullarına karşı (nem, güneş ışığı gibi) malzemeyi dayanıklı hale getirecek şekilde üretilmiştir. Bu direnç karşısında aynı zamanda başka bir problemi de ortaya çıkararak, oluşmuş olan atık suda biyosorpsiyonun güçlüğüne neden olmaktadır. Atık çamurdan elde edilen atık su karakteri sert ve kalıcı kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ)'na sahiptir.

3.2.1.1. Stok KOİ çözeltilerinin hazırlanması

850 mg potasyum dihidrojen fitalat, 500 mL saf suya tamamlanarak çözülmesi sağlanır. Bu çözeltinin kullanım süresi maksimum 1-2 gündür. Her spektrofotometre değişiminde yapılması gereken standart eğri hazırlanacağı esnada hazırlayıp kullanmak en sağlıklı olanıdır. Hazırlanan bu potasyum dihidrojen fitalat çözeltisinin KOİ'si 2000 mg/l'dir. Bu değer dikkate alınarak; içinde 50, 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1000 mg/l KOİ olacak şekilde numuneler hazırlanır. 100 ml'lik balon jojeler için $N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$ formülü kullanılarak hazırlanmıştır. KOİ tüpleri içerisine konulan maddeler ve miktarları Şekil 3.4'de gösterilmiştir.

	KÖR 2 ml asit 1 ml parçalama 1.5 ml saf su		STANDART 2 ml asit 1 ml parçalama 1.5 ml standart ya da örnek
---	--	---	---

Şekil 3.2. KOİ tüpleri içerisine konulan maddeler ve miktarları

KOİ analizleri için spektrometre de okuma yapılması için 16 mm'lik yuvarlak küvetler kullanılmıştır. Bu esnada ekzotermik reaksiyon meydana gelerek küvetin dış kısmına asit bulaşmamasına da dikkat edilerek kapağı dikkatli bir şekilde kapatılıp çalkalanarak, 3 ml olacak şekilde küvetlere konulduktan sonra 148 °C sıcaklıkta bulunan termoreaktöre konulmuştur. 2 saat tutulmuştur. Sürenin sonunda ise soğutulan küvet UV görünür spektrometreye yerleştirilerek absorbans değeri okunmuştur.

3.2.2. Sitotoksik konsantrasyonların belirlenmesi

3.2.2.1. Atık çamur içinde küf-maya ve bakteri kontrolü

Malt Ekstrat Agar (MEA), küf ve maya sayımı için; Nutrient Agar (NA) bakteri sayımı için kullanılmıştır. 9'ar ml % 0.9'luk NaCl (sodyum klorür) çözeltisi içeren tüpler hazırlanmış ve steril edilmiştir.

Serum fizyolojik ile dilüe edilmiş atık çamurdan 10^{-6} 'ya kadar bir seri seyretlme hazırlanır. NA ve MEA petrilerinden ikişer tane olmak üzere besiyerlerin üzerine 100 µl aktarıldı ve drigalski spatülü ile yayılmıştır. Bir süre bekledikten sonra MEA'lar 30°C ye, NA'lar ise 37°C deki inkübatöre yerleştirilmiştir. MEA'da üreme gözlenmemiş, ancak NA'larda az sayıda üremeler görülmüştür.

3.2.2.2. Atık çamurunun sitotoksik konsantrasyonunun belirlenmesi

Toksisite değerlendirilmesi amacıyla Cycon vd. (2005) yapılan bir çalışmaya göre atık çamurun dilüsyon işlemleri uygulandı. Önce %0.9'luk serum fizyolojik hazırlanmıştır. Daha sonra 10 g atık çamur üzerine 90 ml serum fizyolojik ilave edilerek erlen içine koyulmuş ve 180 rpm de 30 dakika boyunca çalkanarak homojen hale getirilmiştir.

Aseptik şartlarda stok *Klebsiella pneumoniae*'den hazırlanan Nutrient Broth tüplerine ekim yapılarak 1 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kültürden 1 ml alınarak 9 ml SF içine aktarıldı ve bu şekilde 10^{-6} 'ya kadar seyreltmeler hazırlandı. Bakteri ekimleri 10^{-6} seyreltme üzerinden yapıldı. MacFarland 3'e göre ayarlandı. 100 µl 100 bakteri

olacak şekilde ayarlandı. Her konsantrasyon için (%100, %75, %50, %25, %10, %5, %1, %0.1) üç petri olmak üzere ekim yapıldı. İlgili atık çamur konsantrasyonundan 100'er µl 3 üst agar tüpüne ilave edildi, tüpler çalkalanarak her biri bir nutrient agar plağına döküldü. Homojen bir şekilde dağılması sağlandı. Her konsantrasyon için bu işlemler gerçekleştirildi. Kontrol için başta ve sonda olmak üzere toplamda 6 petri kullanıldı. Plaklar 37 °C'de 1 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda plaklarda koloni sayımı yapıldı. Hiçbir konsantrasyon sitotoksik etkili bulunmadı. Ortalamaları alındı. Genotoksisite belirlemek için şu konsantrasyonlar seçildi: %100, %50, %25, %10, %1. Çizelge 3.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Atık çamur konsantrasyonlarının hazırlanışı

%100	100 ml atık çamur
%50	50 ml atık çamuru + 50 ml saf su
%25	25 ml atık çamuru + 75 ml saf su
%10	10 ml atık çamur + 90 ml saf su
%1	1 ml atık çamur + 99 ml saf su

3.2.2.3. Stok *Klebsiella pneumoniae* türlerinin büyütülmesi

Atık çamur konsantrasyonları (%100, %50, %25, %10 ve %1) ile steril olarak hazırlanan sıvı besiyerlerine (NB) aseptik koşullarda *Klebsiella pneumoniae* inokülasyonu yapıldı. 1 gün 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.

3.2.3. *Klebsiella pneumoniae*'nin DNA ekstraksiyonu

Yabanıl tip (herhangi bir madde ile muamele edilmemiş) ve Çizelge 3.4.'e göre hazırlanmış atık çamur dilüsyonlarında üretilen *Klebsiella pneumoniae* kültürlerinin genomik DNA izolasyon işlemleri gerçekleştirildi.

İzolasyon işleminin başarısını kontrol amaçlı PCR yapılarak jel elektroforezde yürütülerek kontrol edildi. Aynı zamanda Cifuentes vd. (2000) ve Nogales vd. (2009)'a göre

tez çalışmasına ve laboratuvar koşullarına uygun olacak şekilde değişiklikler yapılarak DNA izolasyon işlemi gerçekleştirildi. Manuel olarak yapılan DNA izolasyon prosedürü:

1. Hem saf su ile hem de atık çamur konsantrasyonları ile hazırlanan Nutrient brothda üretilen *Klebsiella pneumoniae* kültürlerin her birinden 2 ml alındı ve 10 dk 13.000 rpm 4 °C de santrifüj yapıldı. Pellet oluşumu gözlemlendi. 600 µl ekstraksiyon tamponundan (100 mM Tris- HCL pH: 8, 100 mM EDTA) eklendi, resüspanse edildi.
2. 9 µl lizozim (3 mg/ml) eklendi. 37 °C de 30 dk inkübe edildi.
3. %10 SDS (60 µl), 12 µl proteinaz K (150 mg/ml) eklendi ve bu karışım 37 °C 'de 60 dk inkübe edildi.
4. Sonra 120 µl 5 M NaCl eklendi ve ters-düz edilerek resüspanse edildi.
5. 90 µl CTAB (%10 CTAB, 0.7 M NaCl) resüspanse karışıma eklendi. 10 dk 65 °C lik su banyosunda bekletildi.
6. Su banyosundan alınan karışım 1-2 dk sıvı azotta bekletildi.
7. Donan tüp yeniden 65 °C lik su banyosunda bekletilerek çözünmesi sağlandı.
8. Tekrar sıvı azot işlemi gerçekleştirildi.
9. Bu işlem 5 kez tekrar edildi.
10. 900 µl fenol: kloroform: isoamil alkol (25:24:1) karışıma eklendi ve 5 dk 4 °C de 13.000 rpm de santrifüj edildi.
11. Santrifüj sonrası üstteki sıvı faz alındı ve alınan miktar kadar fenol: kloroform: isoamil alkol (25:24:1) sıvı faza eklendi.
12. Bu işlem protein ara fazı indirgenene kadar devam ettirildi.
13. 80 µl sodyum asetat (3M pH: 4.8), 480 µl isopropanol, 8 µl MgCl₂ (1 M) eklendi ve 30 dk 13.000 rpm de 4 °C de santrifüj edildi.
14. Süpernetant atıldıktan sonra -20 °C 'de bekletilmiş olan %70'lik alkolden 100 µl pellet üzerine eklendi. 15 dk 13.000 rpm 'de 4 °C 'de santrifüj edildi.
15. Alkol pipet ile uzaklaştırıldıktan sonra kuruması beklendi. Pellet 50 µl moleküler grade su ile resüspanse edildi.

DNA varlığını kontrol etmek için 3 µl örnek %1'lik agaroz jele yüklendi ve 1 x TAE tamponunda yürütüldü.

Biyosorpsiyon sonrasında hazırlanan atık çamur konsantrasyonlarında büyütülmüş *Klebsiella pneumoniae* DNA'ları "Invitrogen by Thermo Fisher Scientific PureLink Microbiome DNA Purification Kit User Guide" kullanılarak gerçekleştirildi.

Hazırlanma Prosedürü: XS Pack (10 örneklik): başlamadan önce, 100 µl dd-su proteinaz K tüpüne, 25 µl dd-su lysozyme tüpüne, 30 µl dd-su RNase tüpüne ve 9,6 ml 96-99% etanol Washing Buffer şişesine eklenir.

Yukarıdaki prosedür izlenerek genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Çalışmanın başarısı kontrol edilmek üzere agaroz jel elektroforezinde yürütme işlemi gerçekleştirildi. 2 µl boya ve 3 µl genomik DNA olmak üzere toplamda 5 µl ve buna ek olarak referans kaynağı olması açısından da 2 µl Marker elektroforezde kuyucuklara yüklenmiştir. Ardından 100 V 70 dk elektroforez işlemi gerçekleştirilip yapılan izolasyon çalışmasının başarılı olduğu gözlenmiştir.

3.2.4. RAPD yöntemi ile genotoksisitenin belirlenmesi

3.2.4.1. *Klebsiella pneumoniae*'nin genel özellikleri

Klebsiella'nın patolog Karl Friedlander tarafından 1882'de zatürree nedeni olarak ilk tanımlanmasından bu yana en çok çalışılan bakterilerden biri olmuştur (Eisenstadt ve Crane, 1994). Çizelge 3.5'de taksonomik sınıflandırılması gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. *Klebsiella pneumoniae*'nin sınıflandırması

Alem	Bacteria
Şube	Protoebacteria
Sınıf	Gammaproteobacteria
Takım	Enterobacterales
Familya	Enterobacteriaceae
Cins	<i>Klebsiella</i>
Tür	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

Katı besiyerinde *Klebsiella* kolonileri büyük, sarı-gri renkte ve tipik mukoid kolonilerdir. Kapsülsüz suşlar S tipi kolonileri oluştururlar. MacConkey Agar da laktozu fermente ettiği için pembe-kırmızı renkte, 3 mm çaplı ve mukoid kolonileri oluştururlar (Forbes vd., 2002).

Klebsiella pneumoniae, hem serbest yaşayan hem de konakçıyla ilişkili çok sayıda ekolojik niş içinde hayatta kalabilir. Bu nişler arasında toprak, su, çeşitli bitki türleri, böcekler, kuşlar, sürüngenler ve birçok farklı memeli bulunur. Ancak, *Klebsiella pneumoniae*'nin farklı nişlerdeki yaygınlığı, bolluğu ve özellikleri hakkındaki bilgilerimizi sınırlayan sistematik örnekleme eksiklikleri bulunmaktadır. Ayrıca, çoğu çalışma, dizi verileri olmadan standart tanımlama tekniklerine dayandırılmıştır. Ancak, *Klebsiella pneumoniae*'yi diğer *Klebsiella pneumoniae* kompleks üyelerinden ayıramamıştır. Bununla birlikte, kültüre dayalı tahminler, *Klebsiella pneumoniae*'nin memeli bağırsak yolunun ortak bir kolonize edicisi olduğunu (köpeklerde ve süt sığırlarında sırasıyla %39 ve %44 prevalans), 16S rRNA sekansına dayalı olarak göstermiştir. Ayrıca, kuşların ve çeşitli böcek türlerinin bu mikroorganizma taşıdığı gösterilmiştir (Wyres vd., 2020).

3.2.4.2. RAPD-PCR işleminin yapılışı

Atık çamur tüm konsantrasyonları (%100-50-25-10-1) ile *Klebsiella pneumoniae* wild-type kontrol grubu için dört farklı primer (OPAR3, OPAR8, Primer640, AP4) kullanıldı. RAPD-PCR koşulları, protokol ve gerekli kimyasallar aşağıda belirtilmiştir.

RAPD çalışması için GoT aq® G2 Hot Start Green Master Mix ve Nuclease Free Water ile primer ve gDNA'lar kullanılmıştır. RAPD-PCR çalışması için kullanılan primerlerin özellikleri Çizelge 3.6'da, RAPD-PCR koşulları Çizelge 3.7'de ve PCR protokolü Çizelge 3.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. *Klebsiella pneumoniae*'nin 10 bp izolatının rastgele amplifiye polimorfik DNA (RAPD) profillerini taramak için kullanılan primerler

Primer	Sekans (5'→3')	Sıra sı (bp)	% (G+C)	TM *	Ürün Boyutu (kb)	Referans
OPAR3	CCAGGAGAAG	10	60	32	0.2–4	<u>Haryani et al. (2007)</u>
OPAR8	TGGGGCTGTC	10	70	34	0.3– 3.5	<u>Haryani et al. (2007)</u>
Primer640	CGTGGGGCCT	10	80	36	0.3–4	<u>Haryani et al. (2007)</u>
AP4	TCACGATGCA	10	50	30	0.4–4	<u>Gori et al. (1996)</u>

Çizelge 3.7. RAPD-PCR koşulları

94 °C 4 dk ön denatürasyon (DNA zincirlerinin ayrılması)
94 °C 15 sn denatürasyon
36 °C 1 dk bağlanma (primerlerin bağlanması) 30 döngü
72 °C 1 dk polimerizasyon (zincirlerin uzaması)
72°C 9 dk polimerizasyon son döngü

Çizelge 3.8. RAPD-PCR protokolü

Kullanılan Kimyasallar	Her örnek için kullanılan miktar (µl)
ddH ₂ O	8,875
Buffer (10x) + MgCl ₂	2,5
dNTP	2,5
Primer(100pmol/ µl)	10
Taq DNA polimeraz	0,125
gDNA	1

Toplam hacim 3 µl PCR örnekleri (DNA) % 1.8'lik agaroz jele yüklenerek 100 V da 70 dk yürütüldü. Jel görüntüleri, görüntüleme cihazı ile alındı ve kaydedildi. Deneyler sonucunda elde edilen veriler (değişimler, bant kayıpları ve yeni bantların ortaya çıkması) ImageLab ve PyElph istatistik programlarına işlenerek analizleri yapıldı.

3.2.5. Biyosorpsiyon yöntemi ile atık çamurun biyosorpsiyonu

Biyosorpsiyon çalışmaları Tunalı vd. (2006)'nin yaptıkları çalışmaya göre gerçekleştirilmiştir. Endüstriyel atık sulardan elde edilen bir mikroorganizma nutrient broth besiyerinde büyütülmüştür (Tunalı vd., 2006). Biyolojik arıtım, 200 devir/dk karıştırma hızındaki çalkalamalı inkübatörde 250 ml'lik erlenler içerisinde 50 ml olarak hazırlanan hacimde yapılmıştır. Bu çalışmalarda pH değeri 6,0'a ayarlanmış 50 ml'lik atık çamur çözeltileri 0,25 g biyokütle ile muamele edilmiştir.

Biyosorpsiyon işlemi uygulanan atık çamurdan tekrar giderim öncesindeki gibi konsantrasyonlar (100-50-25-10-1) hazırlanmış ve tüm konsantrasyonlara RAPD-PCR işlemi uygulanmıştır.

Önceden organize sanayi bölgesi atık suyundan izole edilen mikroorganizma nutrient broth besiyerinde çoğaltıldı. Ardından kültür santrifüj edildi, supernatant atıldı, fırında 60° C'de kurutuldu, bu biyokütle biyosorpsiyon çalışmasında biyosorbent olarak kullanıldı. Ardından biyosorpsiyon protokolüne geçilmiştir. Bu protokol şu şekildedir:

İnkübasyon Sıcaklığı	25°C
Hız	125 rpm
Atık Çamur Miktarı	50 ml
Biyokütle miktarı	0,1 g
İnkübasyon süresi	120 dk

İnkübasyon sonrası 6000 rpm de 20 dakika santrifüj yapıldı ve biyokütlenin çökmesi sağlandı. 60 derecede 1 gün kurumaya bırakıldıktan sonra spatül yardımıyla kazınarak havanda ezilmiştir.

3.2.6. Atık çamurun toksik etkisinin Mikrotoks ile test edilmesi

Boya endüstrisi atık çamurunun biyosorpsiyon öncesi ve sonrası konsantrasyonları Mikrotoks yöntemiyle *Vibrio fischeri* kullanılarak test edilmiştir. Yöntem SDI marka M500 Microtox® cihazında aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanarak yapılmıştır.

Microtox® akut toksisite testinde, denizel biyoluminesans bakteri olan *Vibrio fischeri* (NRRL B-11177) kullanılarak ilgili testin üretici protokolüne göre uygulanmıştır. (Microtox® Manual, 1992). Bu prosedüre göre, %45 Basic Test seçilmiş olup; 10 µl bakteri kültürü %2'lik NaCl içeren (Diluent, SDI) numunelere maruz bırakılmıştır. Yöntem gereği, biyoluminesans bakterinin toksik madde ile karşılaştıktan sonraki ışık çıkışı ile numune içermeyen kontrolün (kör-%2'lik NaCl) ışık çıkışı kıyaslanarak ölçüm yapılmıştır. Kör olarak %2'lik NaCl kullanılmış olup; test 2 seri halinde tekrar edilmiştir. Kör ve numunenin ışık çıkışı arasındaki fark, numunenin organizma üzerindeki etkisine dayanmaktadır (Microtox® Manual, 1992).

Bu akut toksisite testinde, örneklerin *Vibrio fischeri* üzerine toksisitesi, 5. ve 15. dakikalık maruz kalma sürelerinde çalışılmıştır. Organizmanın tepkisini etkilememesi açısından, organizmanın maruz kaldığı sıcaklık, ölçüm zamanı süresince cihaz tarafından otomatik olarak ayarlanmıştır. Microtox® Omni yazılımı sayesinde kaydedilen değerler, yine bu yazılım sayesinde sonuçlar EC₅₀ değeri olarak sunulmuştur.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Fizikokimyasal Analizlerin Sonuçları

4.1.1. KOİ analiz sonuçları

Spektrofotometrede yapılan okumalar sonucunda aşağıdaki formül ile bir değerlendirme yapılmıştır. Şekil 4.1’de spektrometre de okumaları yapılan numuneler gösterilmiştir.

$$Y = 3803.06 \times WL_{600} - 51.22 \text{ (Denklem 4.1.)}$$



Şekil 4.1. Spektrometre cihazında okumaları yapılan numuneler

Atık çamur için formülde yer alan $WL_{600}=1850$ absorbans değerini, $Y= 6984 \text{ mg O}_2/\text{l}$ KOİ değeri olarak bulunmuştur (APHA, 1998).

4.1.2. pH ölçüm sonuçları

Biyosorpsiyon öncesi pH değeri 7.86 olarak boya atık çamuru için belirlenmiştir. Biyosorpsiyon sonrası bu değer 7.92 olarak görülmüştür.

4.1.3. Ağır metal analiz sonuçları

ICP-MS analizi ile ölçülen ağır metal miktarları Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. ICP-MS analizi sonuçları

	Biyogiderim Öncesi	Biyogiderim Sonrası	
Element	Konsantrasyon(ppm)	Konsantrasyon(ppm)	Biyosorpsiyon %
Hg	0.000575	0.000036	%93.73
Cr	0.160000	0.035940	%77.53
Zn	1.336950	0.308196	%76.94
Mg	0.321550	0.073740	%77.06
Ni	0.023500	0.005124	%78.19
Cu	1.369750	0.031308	%97.72
As	0.003825	0.001032	%73.01
Cd	0.001000	0.000072	%92.80
Pb	0.007500	0.004452	%40.64
Mn	0.016025	0.002592	%83.82
Fe	11.430200	2.552640	%77.66

Biyosorpsiyon ile sağlanan metal gideriminin yüzde olarak ifadesi (4.2) eşitliği kullanılarak belirlenmiştir.

$$\% \text{ Biyosorpsiyon} = \frac{C_0 - C_e}{C_0} \times 100 \quad \text{Denklem (4.2)}$$

C_0 : Başlangıçtaki ağır metal konsantrasyonu (mg/lt)

C_e : Adsorpsiyondan sonra çözeltide kalan ağır metal konsantrasyonu (mg/lt)

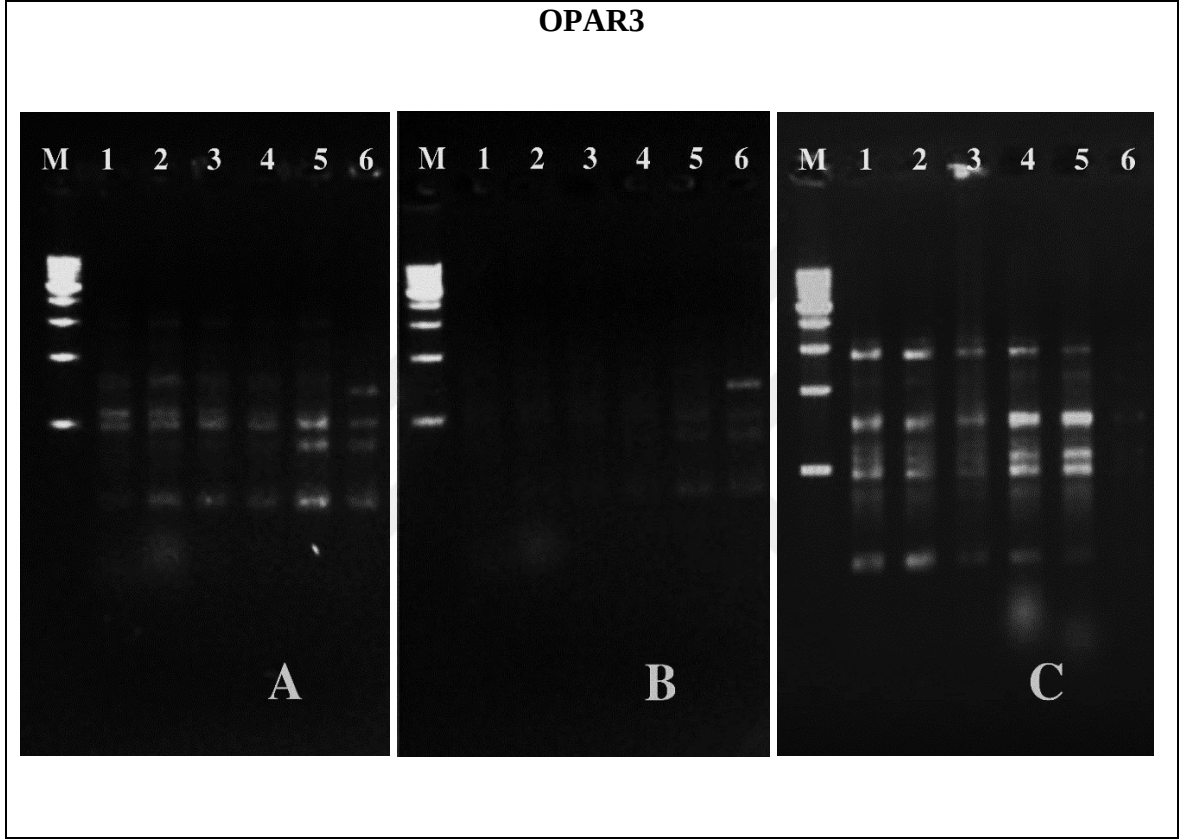
ICP-MS analizi sonuçlarına bakıldığında boya atık çamurunda Cu (bakır), Mn (mangan), Cd (kadmiyum) ve Hg (civa) metallerinde biyosorpsiyon değerleri yüksektir. Javanbakht ve arkadaşlarının (2014) biyosorbentle yaptıkları çalışmada yine bu metallerde arıtım bulunmaktadır. Boya atık çamurunda yüksek konsantrasyonlarda görülen ağır metallerin üretim sırasında gerçekleşen yoğunlaşma işleminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Çelebi ve Kendir (2002) yaptıkları bir çalışmada boya atık çamurunun içeriğinde Cd değeri en düşük, Zn değeri ise en yüksek görülmüştür. Yaptığımız çalışmada da boya atık çamuru örneklerimizde ağır metallerden Cu (bakır)'ın en fazla miktarda olduğu görülmüştür (Çizelge 4.1.).

4.2. Toksisite Testleri Sonuçları

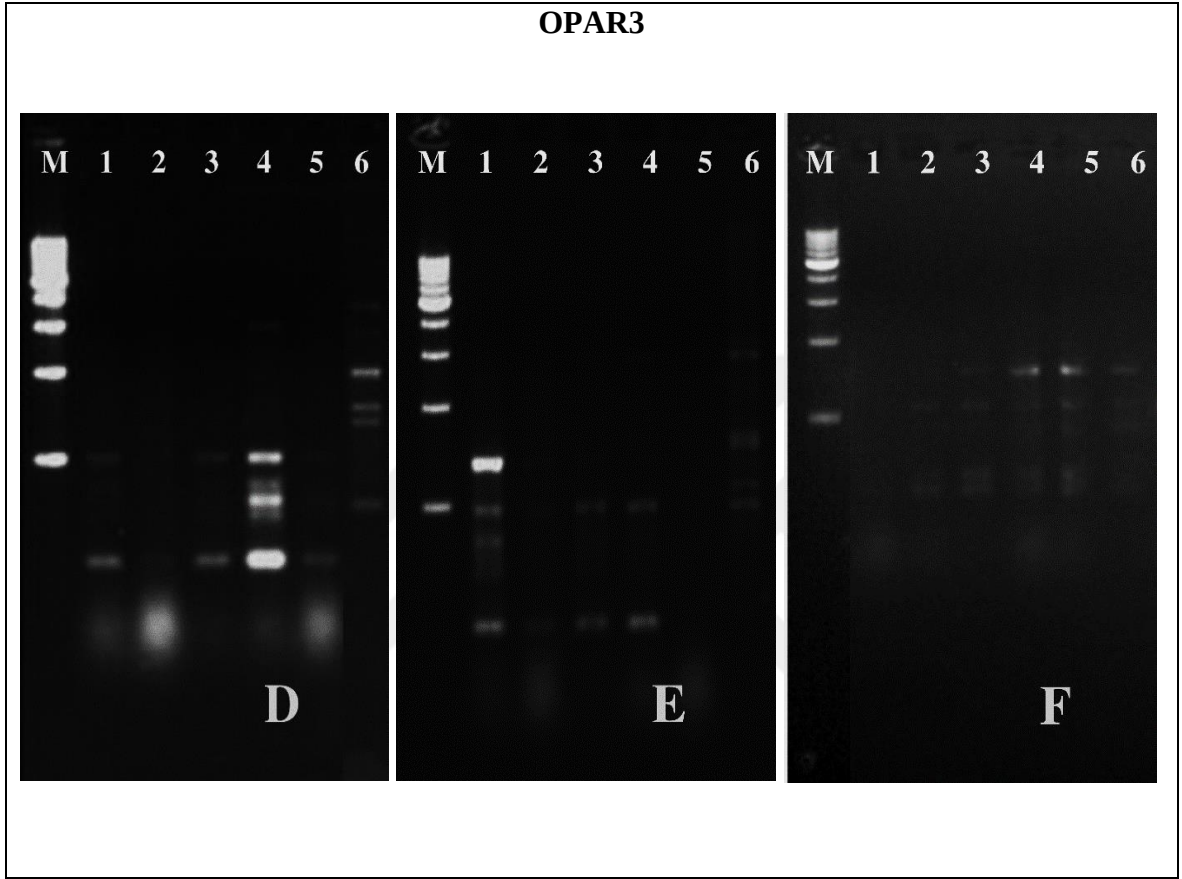
4.2.1. RAPD Profillerinin Analizi ve Değerlendirilmesi

RAPD analizi için 4 adet 10 bazlık primer *Klebsiella pneumoniae* ile yapılan diğer RAPD çalışmalarında en çok kullanılan ve sonuç alınan primerler arasından belirlenmiştir. Elde edilen çoğaltım ürünleri %1 oranındaki agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Jel görüntüleri BioRad-GelDocit jel görüntüleme cihazı ile çekilmiştir. RAPD sonuçlarının analizi ve sonuçların değerlendirilmesi çekilen jel görüntüleri üzerinden yapılmıştır. Bantların değerlendirilmesi kontrollerle karşılaştırılarak yapılmıştır.

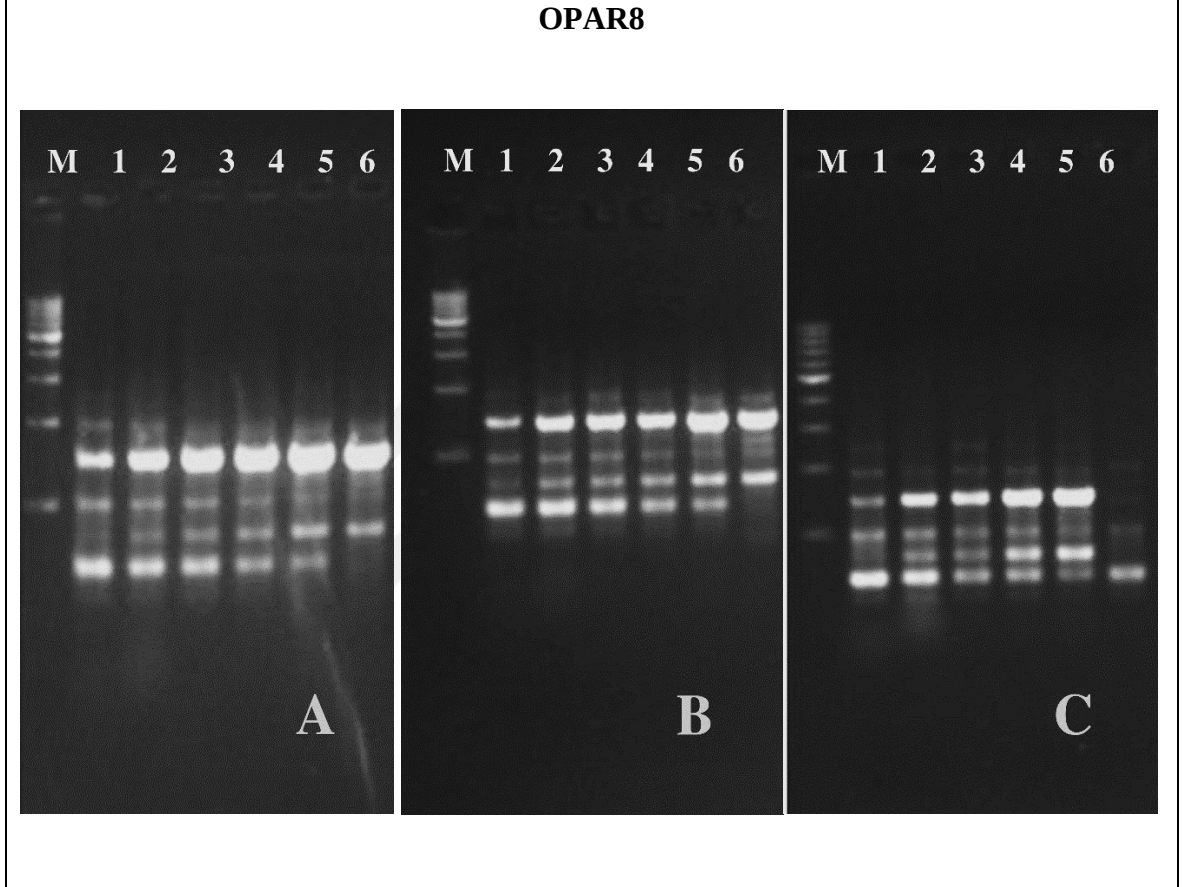
Farklı atık çamur konsantrasyonları ile muamele edilmiş *Klebsiella pneumoniae* DNA'larının 4 adet RAPD primeri ile taranması sonucunda, tüm gruplar arasında kontrol grubuna göre polimorfik bant profilleri görülmüştür. Tüm primerler ile elde edilen agaroz jel görüntüleri incelendiğinde 3 farklı uygulama grubu için görüntülenen bantlar Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9 da gösterilmiştir.



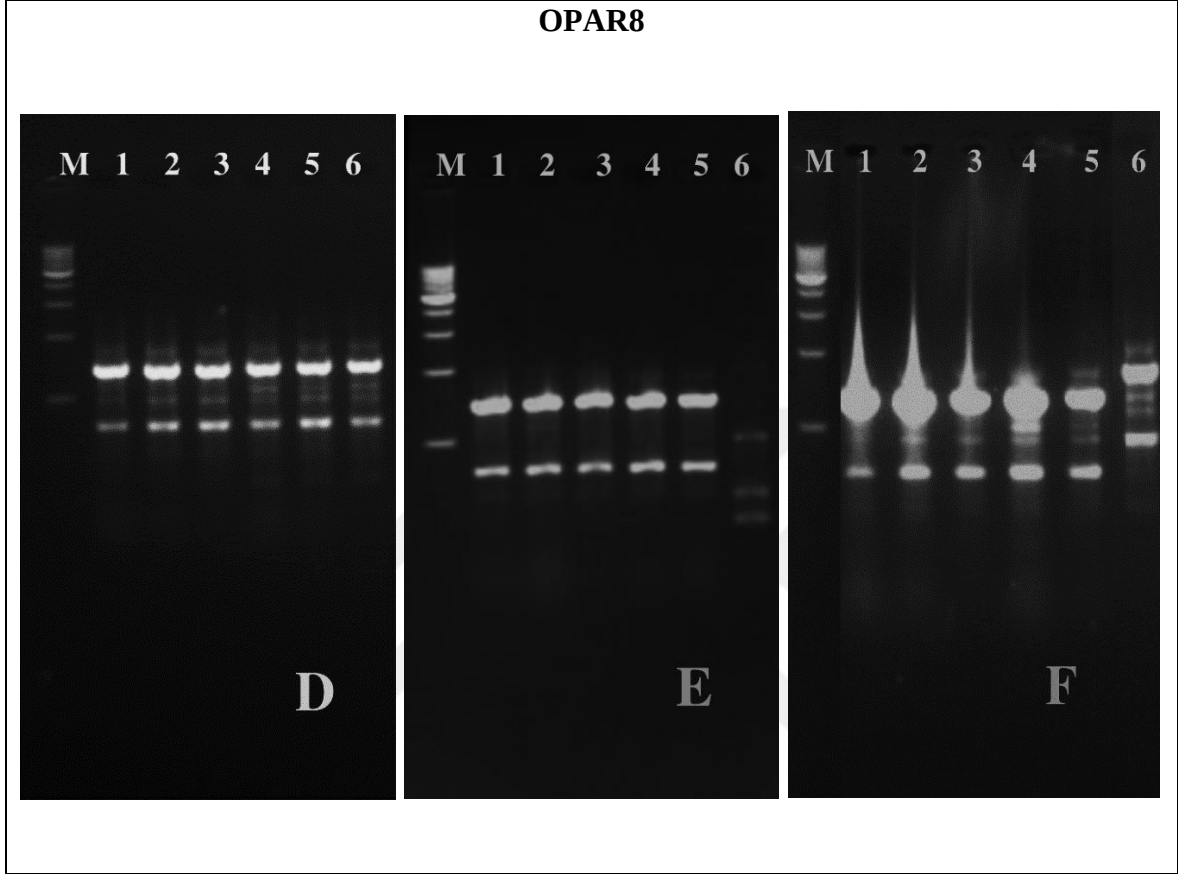
Şekil 4.2. Biyosorpsiyon öncesi OPAR3 jel görüntüleri (M: Marker, 1: %100, 2: %50, 3: %25, 4: %50, 5: %100, 6: Kontrol, A: 1.Deneme, B: 2.Deneme, C: 3.Deneme)



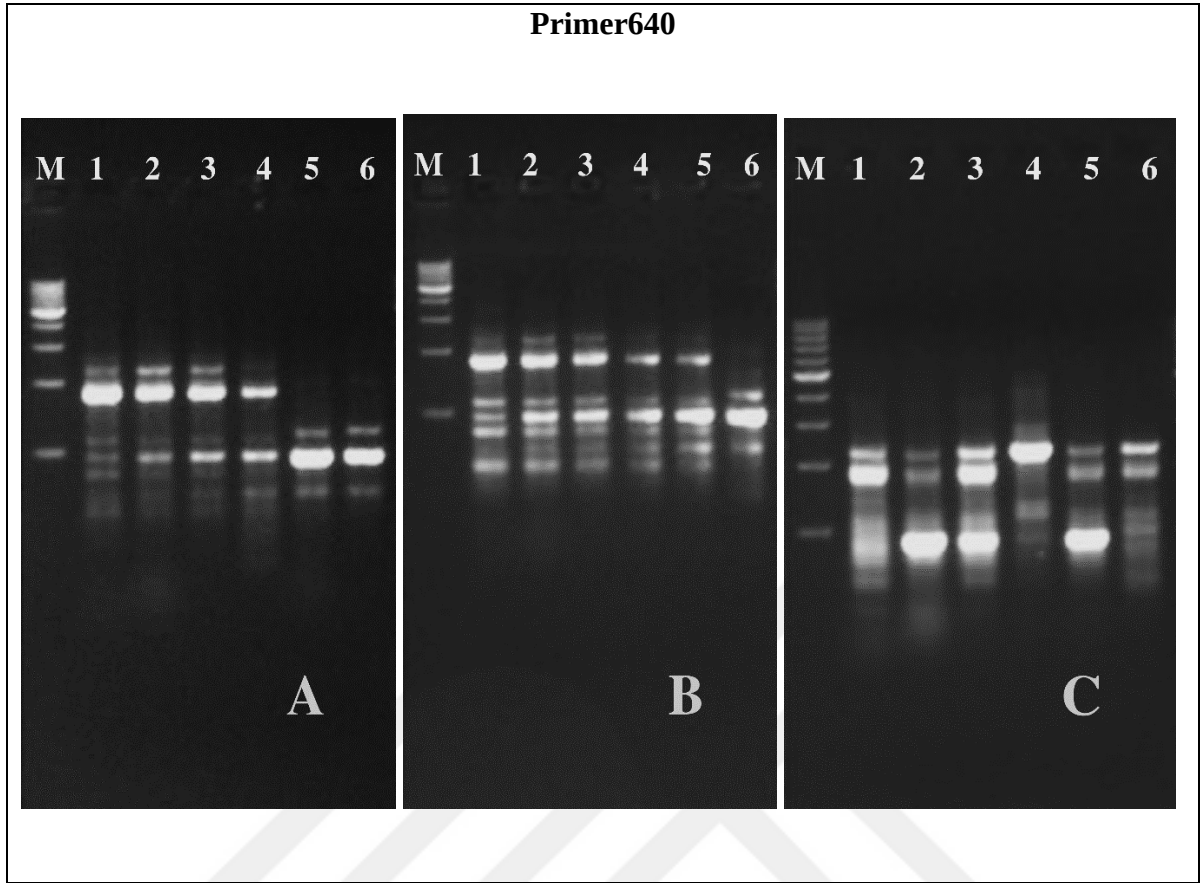
Şekil 4.3. Biyosorpsiyon sonrası OPAR3 görüntüleri (M: Marker, 1: %100, 2: %50, 3: %25, 4: %50, 5: %100, 6: Kontrol, D: 1.Deneme, E: 2.Deneme, F: 3.Deneme)



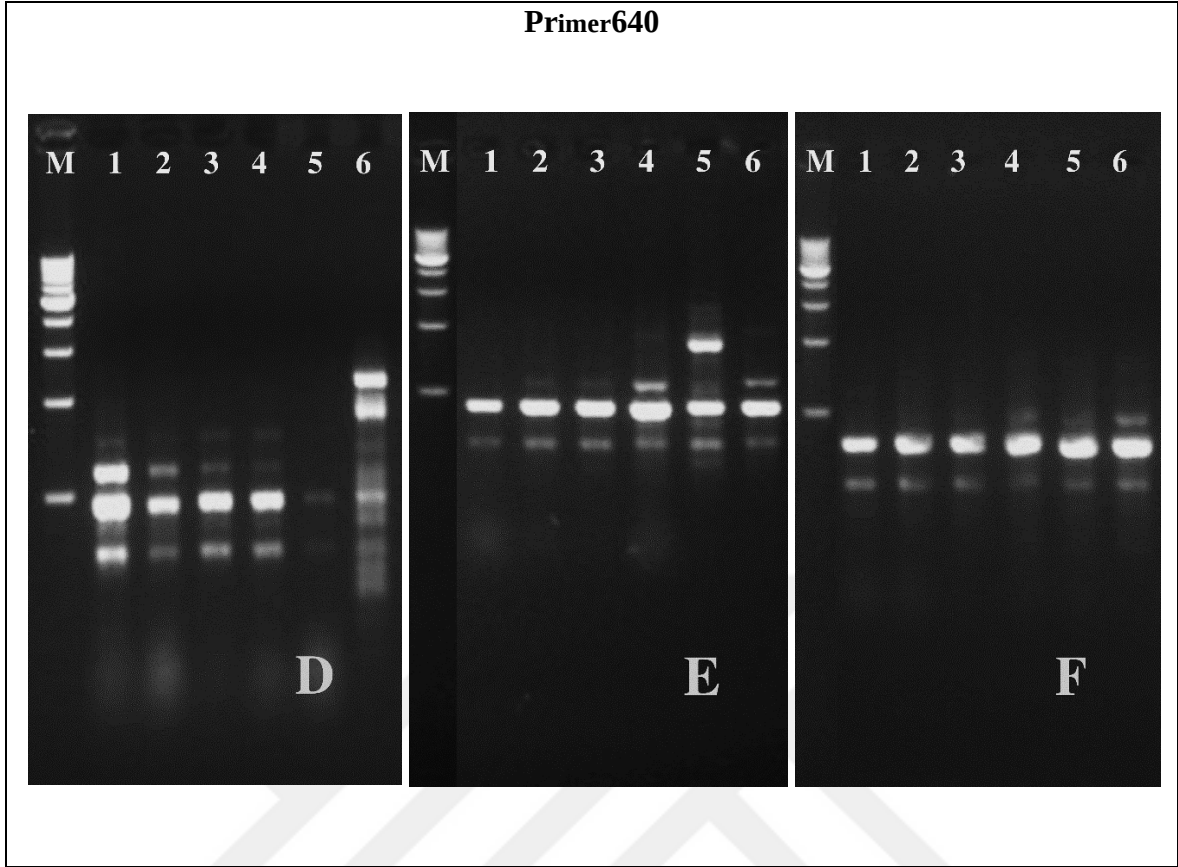
Şekil 4.4. Biyosorpsiyon öncesi OPAR8 görüntüleri (M: Marker, 1: %100, 2: %50, 3: %25, 4: %50, 5: %100, 6: Kontrol, A: 1.Deneme, B: 2.Deneme, C: 3.Deneme)



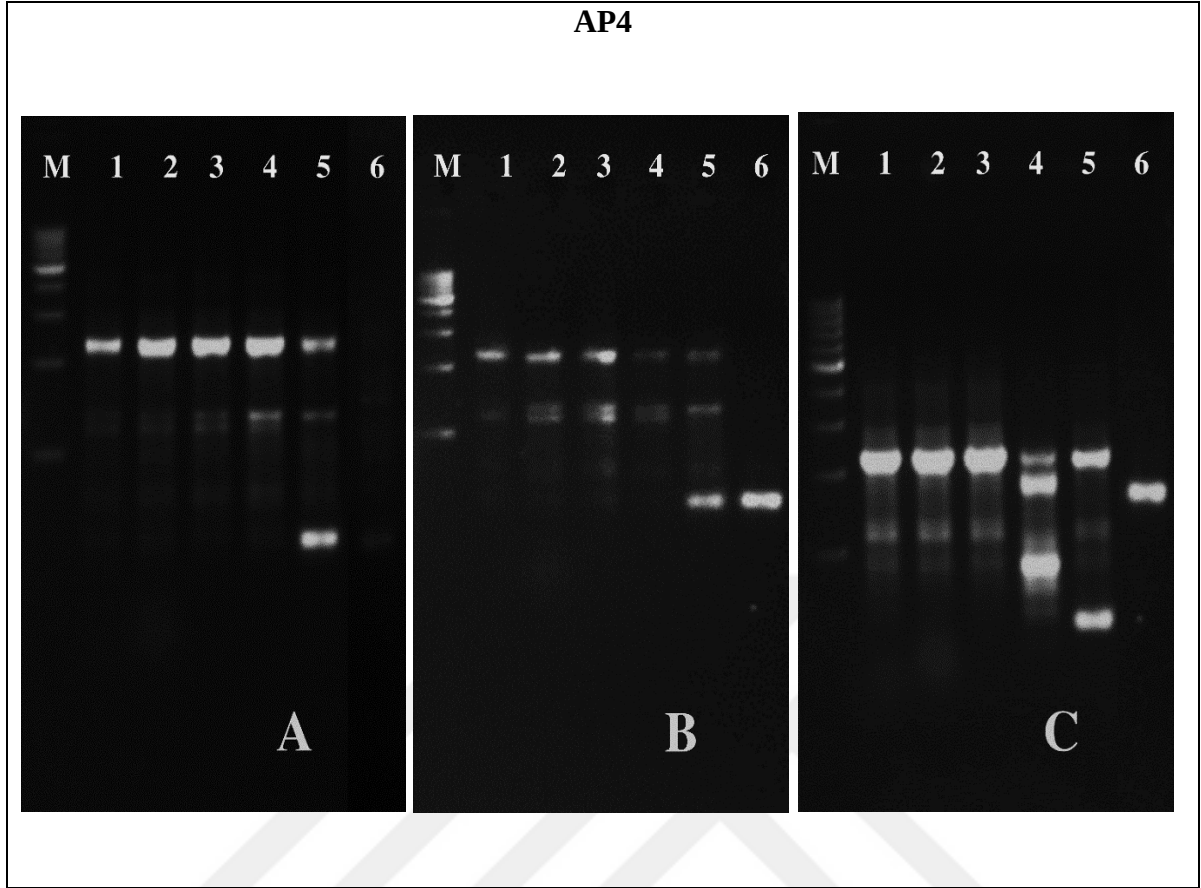
Şekil 4.5. Biyosorpsiyon sonrası OPAR8 görüntüleri (M: Marker, 1: %100, 2: %50, 3: %25, 4: %50, 5: %100, 6: Kontrol, D: 1.Deneme, E: 2.Deneme, F: 3.Deneme)



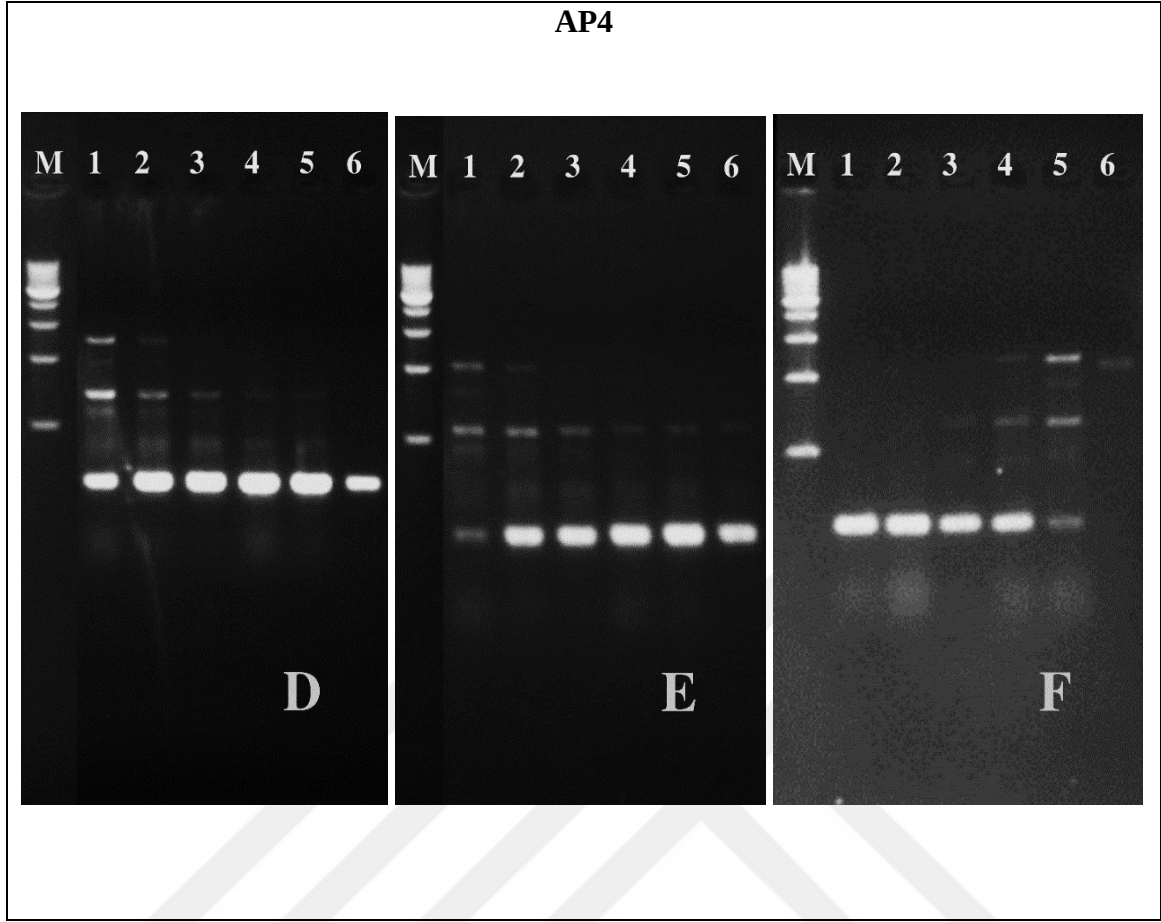
Şekil 4.6. Biyosorpsiyon öncesi Primer640 görüntüleri (M: Marker, 1: %100, 2: %50, 3: %25, 4: %50, 5: %100, 6: Kontrol, A: 1.Deneme, B: 2.Deneme, C: 3.Deneme)



Şekil 4.7. Biyosorpsiyon sonrası Primer640 görüntüleri (M: Marker, 1: %100, 2: %50, 3: %25, 4: %50, 5: %100, 6: Kontrol, D: 1.Deneme, E: 2.Deneme, F: 3.Deneme)



Şekil 4.8. Biyosorpsiyon öncesi AP4 görüntüleri (M: Marker, 1: %100, 2: %50, 3: %25, 4: %50, 5: %100, 6: Kontrol, A: 1.Deneme, B: 2.Deneme, C: 3.Deneme)



Şekil 4.9. Biyosorpsiyon sonrası AP4 görüntüleri (M: Marker, 1: %100, 2: %50, 3: %25, 4: %50, 5: %100, 6: Kontrol, D: 1.Deneme, E: 2.Deneme, F: 3.Deneme)

4.1.1.1. Matris sonuçları

PyElph 1.4. ve Image Lab 5.0 programları kullanılarak jel görüntüleri analiz edilerek çıkarılan matrisler Çizelge 4.2, Çizelge 4.3, Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5. de gösterilmiştir. Bantların bulunduğu yerler “1” ve bantların kaybolduğu yerler “0” olarak kodlanmıştır.



Çizelge 4.2. Biyosorpsiyon öncesi OPAR3 primeri ile yapılan çalışmada ortaya çıkan matrisler

OPAR3 (A)					
%100	%50	%25	%10	%1	K
1	1	1	0	1	0
1	1	1	0	1	0
0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	1	1
0	1	1	1	1	1
0	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0

OPAR3 (B)					
%100	%50	%25	%10	%1	K
0	0	0	0	1	0
0	0	0	0	1	1
0	1	1	0	0	0
1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	1	1
0	0	1	1	1	1
0	1	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0

OPAR3 (C)					
%100	%50	%25	%10	%1	K
1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	1	0
0	1	1	1	1	1
1	0	1	1	1	1
1	1	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1

Çizelge 4.3. Biyosorpsiyon öncesi OPAR8 primeri ile yapılan çalışmada ortaya çıkan matrisler

OPAR8 (A)					
%100	%50	%25	%10	%1	K
1	0	0	0	0	1
1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	0
0	1	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0

OPAR8 (B)					
%100	%50	%25	%10	%1	K
1	0	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	0
1	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0

OPAR8 (C)					
%100	%50	%25	%10	%1	K
1	0	1	0	0	0
1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1
0	1	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1
0	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.4. Biyosorpsiyon öncesi Primer640 primeri ile yapılan çalışmada ortaya çıkan matrisler

Primer640 (A)					
%100	%50	%25	%10	%1	K
1	1	1	1	0	0
0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	0	1
1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1
1	1	1	0	0	0
0	0	1	1	1	1
1	0	1	0	0	0

Primer640 (B)					
%100	%50	%25	%10	%1	K
1	1	1	0	0	0
1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	1	1
0	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	0
0	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	0

Primer640 (C)					
%100	%50	%25	%10	%1	K
0	0	0	1	0	0
1	1	1	1	1	1
1	1	1	0	1	1
1	0	0	1	0	1
0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	1	1
1	0	1	0	0	1
0	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.5. Biyosorpsiyon öncesi AP4 primeri ile yapılan çalışmada ortaya çıkan matrisler

AP4 (A)					
%100	%50	%25	%10	%1	K
1	1	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	1	0
0	0	0	0	1	1
0	1	1	0	0	1
1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1

AP4 (B)					
%100	%50	%25	%10	%1	K
1	1	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	1
0	1	1	1	1	1
0	1	1	0	1	1
0	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0

AP4 (C)					
%100	%50	%25	%10	%1	K
1	1	1	0	0	1
0	0	0	0	0	1
1	1	1	0	1	0
1	1	1	1	1	1
0	0	0	1	0	1
1	1	1	1	1	0
1	1	1	1	1	0
0	0	0	1	0	0
0	0	0	1	1	0
0	1	0	0	0	0

Çizelge 4.6. Biyosorpsiyon sonrası OPAR3 primeri ile yapılan çalışmada ortaya çıkan matrisler

OPAR3 (D)					
%100	%50	%25	%10	%1	K
0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	1
1	0	1	1	1	1
0	0	0	1	0	0
0	0	0	1	0	0
1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0
0	1	0	1	1	0

OPAR3 (E)					
%100	%50	%25	%10	%1	K
0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	1
1	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0
1	0	1	1	0	1
0	0	0	0	1	0
1	0	0	0	0	0

OPAR3 (F)					
%100	%50	%25	%10	%1	K
0	0	0	0	1	1
0	0	1	1	1	1
0	0	0	1	1	1
1	1	1	0	0	1
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	1	1	1	0
0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	1	0

Çizelge 4.7. Biyosorpsiyon sonrası OPAR8 primeri ile yapılan çalışmada ortaya çıkan matrisler

OPAR8 (D)					
%100	%50	%25	%10	%1	K
0	0	0	1	1	0
0	0	0	0	1	1
0	1	1	0	0	0
1	1	1	1	1	1
1	0	0	1	1	1
0	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	1	1
0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	1

OPAR8 (E)					
%100	%50	%25	%10	%1	K
0	0	0	1	1	1
1	1	1	1	1	1
0	1	0	0	0	0
1	0	0	1	0	1
0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	0
0	1	1	0	0	0
1	1	0	1	1	1
0	0	0	0	0	1
1	1	1	0	0	1

OPAR8 (F)					
%100	%50	%25	%10	%1	K
0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	1	1
1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	1
0	0	0	1	1	0
0	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	0
0	1	0	1	0	0
0	0	0	1	0	1

Çizelge 4.8. Biyosorpsiyon sonrası Primer640 primeri ile yapılan çalışmada ortaya çıkan matrisler

Primer640 (D)					
%100	%50	%25	%10	%1	K
0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	1
0	0	0	1	1	0
1	0	1	0	0	1
1	1	1	1	0	1
1	1	1	1	1	1
1	0	0	1	0	1
0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	1

Primer640 (E)					
%100	%50	%25	%10	%1	K
0	0	0	0	1	0
0	0	0	1	1	1
0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	1	0
1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	1	0

Primer640 (F)					
%100	%50	%25	%10	%1	K
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	1
0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.9. Kontrollerle RAPD amplifikasyonlarını gösteren biyosorpsiyon sonrası AP4 primeri ile yapılan çalışmada ortaya çıkan matrisler

AP4 (D)					
%100	%50	%25	%10	%1	K
0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1
0	1	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	0
1	1	1	0	0	1
1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0

AP4 (E)					
%100	%50	%25	%10	%1	K
1	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0
0	1	1	0	1	1
1	1	1	1	1	1

AP4 (F)					
%100	%50	%25	%10	%1	K
0	0	0	1	1	1
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1

4.1.1.2. GKS (genomik kalıp stabilitesi) analizi

Kontrol grubunun GKS (Genomik Kalıp Stabilitesi) yüzdesi 100 olarak kabul edilmektedir. ‘n’ değeri kontroldeki toplam bant sayısını, ‘a’ değeri ise atık çamur ile muamele edilen her bir kosantrasyondaki polimorfik bant sayısını ifade etmektedir (Gjorgieva vd., 2012).

Formül: $GKS = (1 - a/n) \times 100$ (Denklem 4.3.)

GKS değerlerinin hesaplanması için gereken a ve n değerlerinin ortalamaları ise Çizelge 4.10 ve Çizelge 4.11 de gösterilmiştir.

Çizelge 4.10. Biyosorpsiyon öncesi GKS analizleri için yapılan üç farklı denemede elde edilen a ve n değerlerinin ortalamaları

		<u>%100</u>	<u>%50</u>	<u>%25</u>	<u>%10</u>	<u>%1</u>
	n	a	a	a	a	a
OPAR3	4,66	3,66	4,33	3,66	2,33	2,33
OPAR8	4,66	2,33	3,33	2,66	2,00	2,00
AP4	5,33	4,00	4,33	3,66	4,66	3,66
Primer640	5,33	4,00	3,33	3,33	3,00	2,66

a: Polimorfik bant sayısı, **n:** Kontroldeki toplam bant sayısı

Çizelge 4.11. Biyosorpsiyon sonrası GKS analizleri için yapılan üç farklı denemede elde edilen a ve n değerlerinin ortalamaları

		<u>%100</u>	<u>%50</u>	<u>%25</u>	<u>%10</u>	<u>%1</u>
	n	a	a	a	a	a
OPAR3	4,33	3,33	4,33	3,33	4,00	2,00
OPAR8	6,33	4,00	5,00	5,33	4,00	3,00
AP4	3,33	2,33	1,66	0,66	1,33	1,00
Primer640	5,33	2,33	2,66	2,33	1,66	3,33

a: Polimorfik bant sayısı, **n:** Kontroldeki toplam bant sayısı

Biyosorpsiyon öncesi ve sonrası Denklem 4.2'e göre hesaplanmış Genomik Kalıp Stabilite (GKS) yüzdeleri Çizelge 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Biyosorpsiyon öncesi ve sonrası Genomik Kalıp Stabilitesi yüzdeleri

	<u>OPAR3</u> GKS (%)		<u>OPAR8</u> GKS (%)		<u>AP4</u> GKS (%)		<u>Primer640</u> GKS (%)	
Konsantrasyon	BÖ	BS	BÖ	BS	BÖ	BS	BÖ	BS
%100	12	24 ^a	50	36 ^b	87	31 ^b	75	56 ^b
%50	7	0 ^b	29	21 ^b	81	51 ^b	62	51 ^b
%25	12	24 ^a	43	16 ^b	68	80 ^a	62	47 ^b
%10	50	8 ^b	57	37 ^b	87	60 ^b	56	69 ^a
%1	50	22 ^b	57	53 ^b	68	70 ^a	49	38 ^b

BÖ: Biyosorpsiyon öncesi, **BS:** Biyosorpsiyon sonrası, ^a: Biyosorpsiyondan sonra artan GKS değerleri,

^b: Biyosorpsiyondan sonra azalan GKS değerleri

Çizelge 4.12 de biyosorpsiyon öncesi OPAR3 primeri ile yapılan çalışmada %100 ve %25 konsantrasyonda %12 GKS hesaplanmıştır. % 10 ve %1 konsantrasyonlarda ise bu değer %50 GKS olarak aynı değerler bulunmuştur. %1 konsantrasyonda ise %12 değeri görülmüştür. OPAR8 primeri ile yapılan çalışmada %1 ve %10'luk atık çamur konsantrasyonlarında %57 GKS hesaplanmıştır. %25 konsantrasyonda %43 iken, %50 konsantrasyonda bu değer %29 olarak hesaplanmıştır. %100 konsantrasyonda ise %50 değeri görülmüştür. AP4 primeri ile yapılan çalışmada GKS değeri %25 ve %1 için %68, %100 ve %10 atık çamur konsantrasyonlarında ise %87 olarak hesaplanmıştır. %50 konsantrasyonunda ise GKS değeri %81'dir. Primer640 ile yapılan çalışmada %50 ve %25 atık çamur konsantrasyonlarında %62 GKS değerleridir. %100 de %75, %10 ve %1 atık çamur konsantrasyonunda ise sırasıyla %56 ve %49 olarak birbirine yakın GKS değerleri belirlenmiştir.

Çizelge 4.12 de biyosorpsiyon sonrası OPAR3 primeri ile yapılan çalışmada %50 ve %10 olan konsantrasyonlarda sırasıyla %0 ve %8 GKS değerleri hesaplanmıştır. %100 ve %25 konsantrasyonlarında ise %24 GKS ile aynı değerler bulunmuştur. %1 konsantrasyonda ise %22 GKS değeri görülmektedir. OPAR8 primeri ile yapılan çalışmada %100 konsantrasyonunun GKS değeri %36 olarak belirlenmiştir ve biyosorpsiyon öncesine göre bir fark görülmemiştir. %50 ve %25 konsantrasyonlarında ise biyosorpsiyon sırasıyla %21 ve %16 GKS değerlerini göstermiştir. %10 konsantrasyonda GKS değeri %37 iken, %1 konsantrasyonda GKS değeri artarak %53 olarak hesaplanmıştır. AP4 primeri için yapılan çalışmada biyosorpsiyon %50, %25, %10, %1 konsantrasyonlarının GKS değerlerini sırasıyla %51, %80, %60, %70 olarak belirlenmiş bu değerlerin biyosorpsiyon öncesine göre yüksek olduğu görülmüştür. %100 konsantrasyonunda ise GKS değeri %31'dir. Primer640 primeri ile yapılan çalışmada atık çamurun biyosorpsiyonu %100, %50, %25, %10 konsantrasyonlarında %56, %51, %47, %69 GKS değerleri olarak toksisiteyi düşürmüştür. %1 konsantrasyonda ise GKS değeri %38 olarak belirlenmiş, biyosorpsiyon öncesine göre düşük bir değer verdiği görülmüştür. Bu değerlere bakıldığında kontrole göre bantlarda meydana gelen değişimlerin konsantrasyonlara bağımlı olmadığı gözlenmiştir. Kullandığımız boya atık çamurunun genotoksik etkisi primerlere bağlı olarak farklılık göstermiştir.

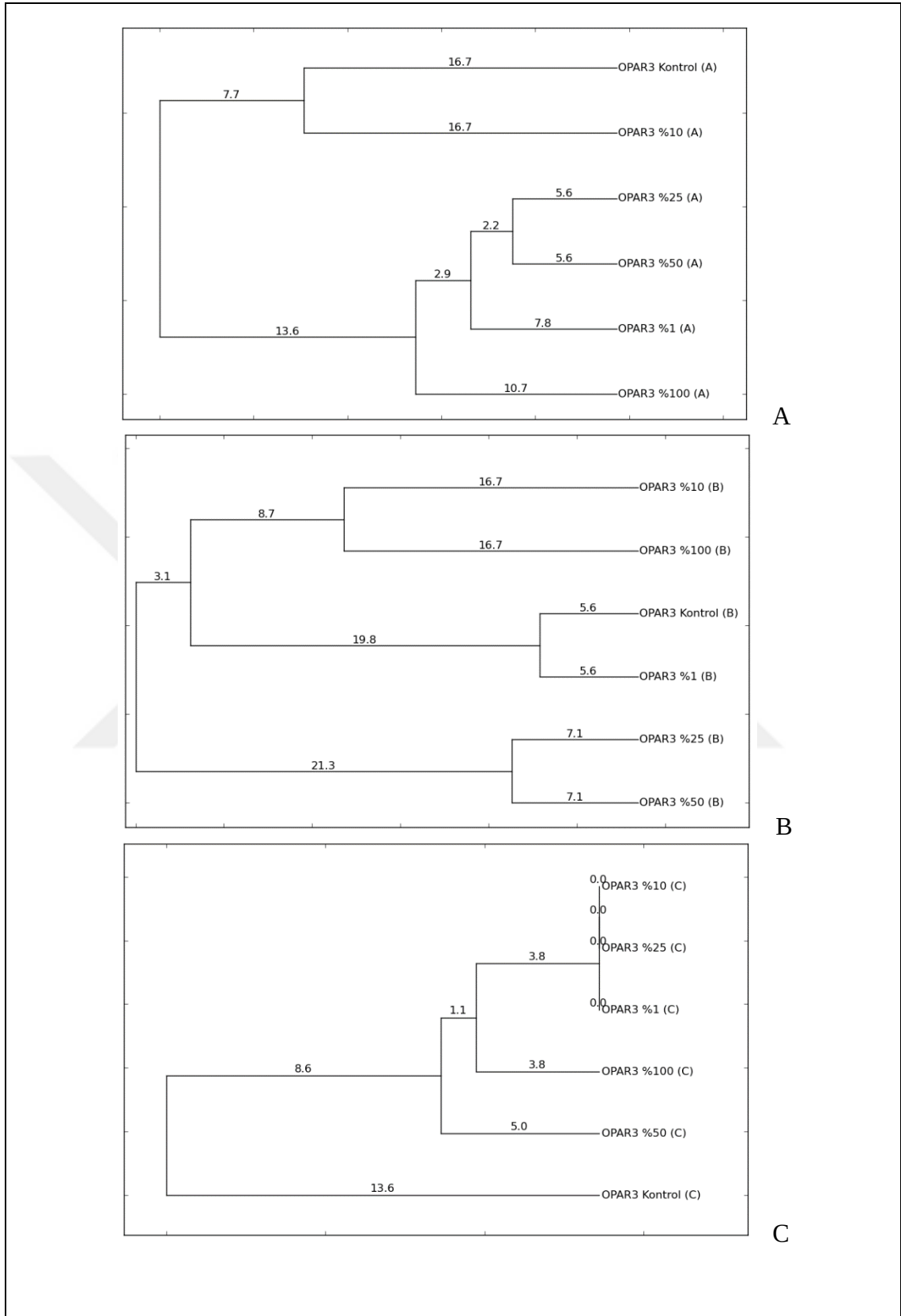
Genomik Kalıp Stabilite (GKS) değerlerine bakıldığında, biyosorpsiyon sonrası OPAR3 primeri ile yapılan denemelerde tüm konsantrasyonlarda GKS değerlerinin düştüğü görülmüştür. Biyosorpsiyon sonrası OPAR8 primeri ile yapılan denemelerde ise genotoksisite belirgin bir şekilde yükselmiştir. AP4 primeri ile yapılan denemelerde %100, %50 ve %10 konsantrasyonlarında biyosorpsiyon sonrasında GKS değeri düşmüş, buna karşın %25 ve %1 konsantrasyonlarında GKS değeri belirgin bir şekilde artış göstermiştir. Primer640 primeri ile yapılan denemelerde ise sadece %10 konsantrasyonda biyosorpsiyon sonrasında GKS değeri artmış, diğer tüm konsantrasyonlarda GKS değerlerinin düşüş göstermesi bu konsantrasyonlarda genotoksisitenin artmış olmasına işaret eder.

RAPD analizlerinin çevresel kirleticilerin neden olduğu DNA hasarının tespiti için oldukça hassas bir yöntem olduğu Gjorgieva vd. (2012) tarafından desteklenmektedir. Bu yöntemle ilgili olarak Becerril vd. (2001) kaybolan bantların, oluşan yeni bantların veya bant yoğunluklarının değişimini, primer bağlanma bölgelerindeki madde maruziyetine bağlı olarak oluşan hasar olarak ifade etmişlerdir. Eisen vd. (1995) yaptıkları çalışmada ise RAPD

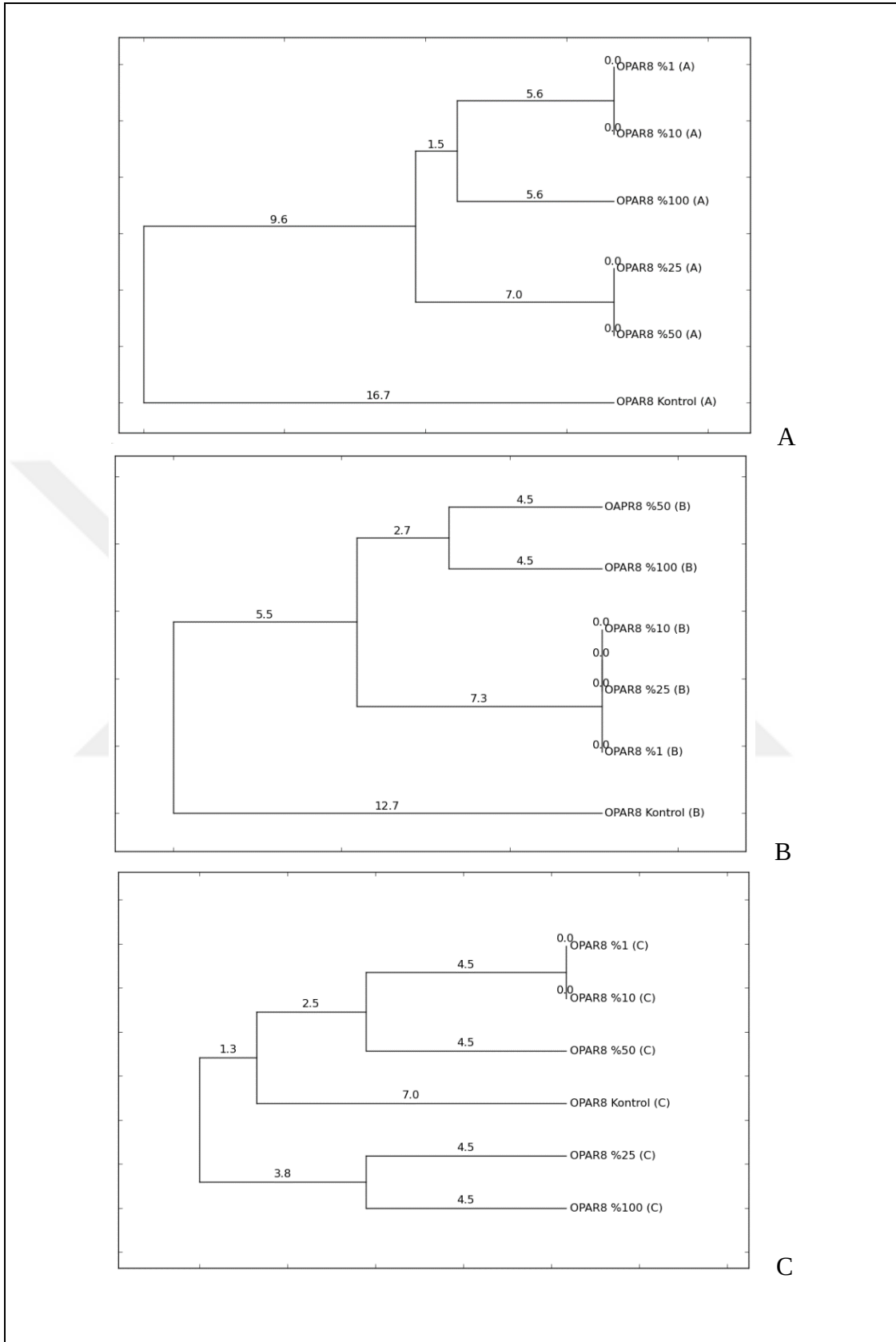
bant profilleri oluşumunu etkileyen en önemli faktörün DNA'nın saflığı olduğunu bildirilmişlerdir.

4.1.1.3. Filogenetik analiz

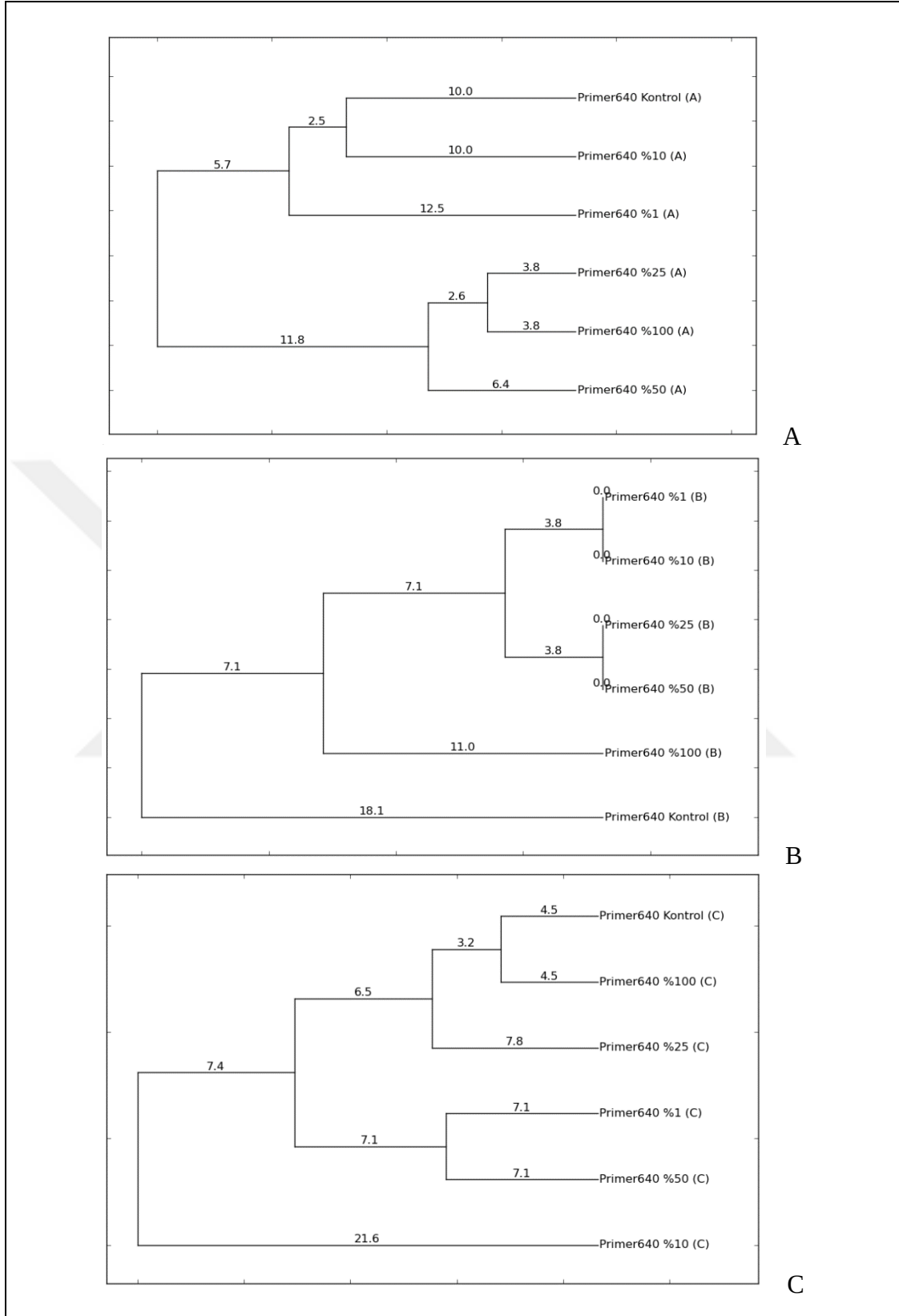
Benzerlik katsayıları kullanılarak fenetik ilişkileri belirlemek için UPGMA (Aritmetik Ortalama ile Ağırlıklandırılmış Çift Grup Yöntemi) analizi ile dendrogramlar oluşturuldu. Dendrogramlarda, biyosorpsiyon öncesi ve sonrası değerler kontrole göre karşılaştırıldı (Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16 ve Şekil 4.17). RAPD bantlarındaki değişiklikler ile biyosorpsiyon, muamele edilmeyen ve muamele edilen organizmalar arasındaki fenetik farklılıklar hakkında bilgi sağladığı önceki çalışmalar (Cenkci vd., 2010) ile uyumluydu.



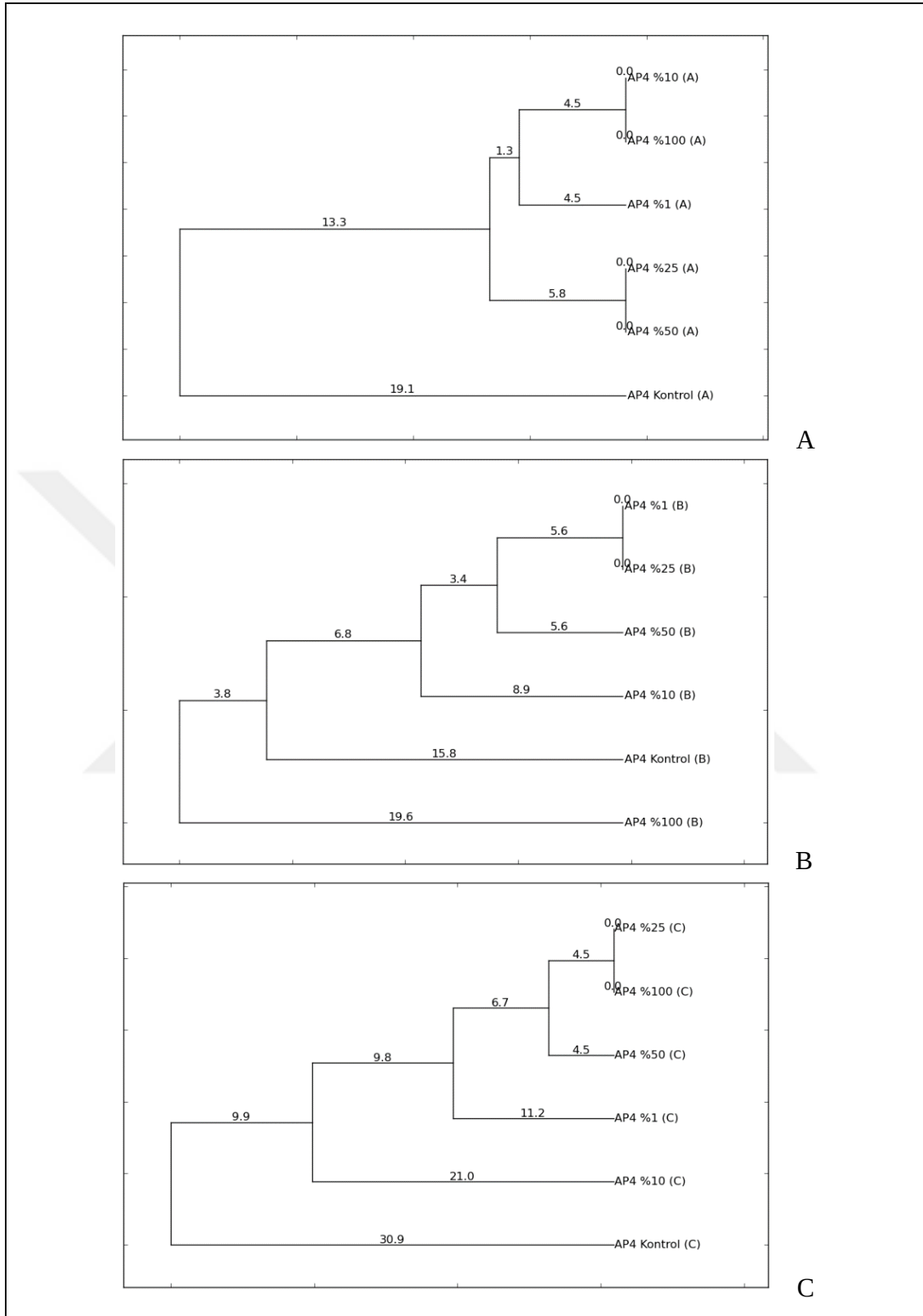
Şekil 4.10. Biyosorpsiyon öncesi OPAR3 primeri ile yapılan üç denemenin kümeleme analizi sonucunda elde edilen dendrogramı (A: 1. Deneme, B: 2. Deneme, C: 3. Deneme)



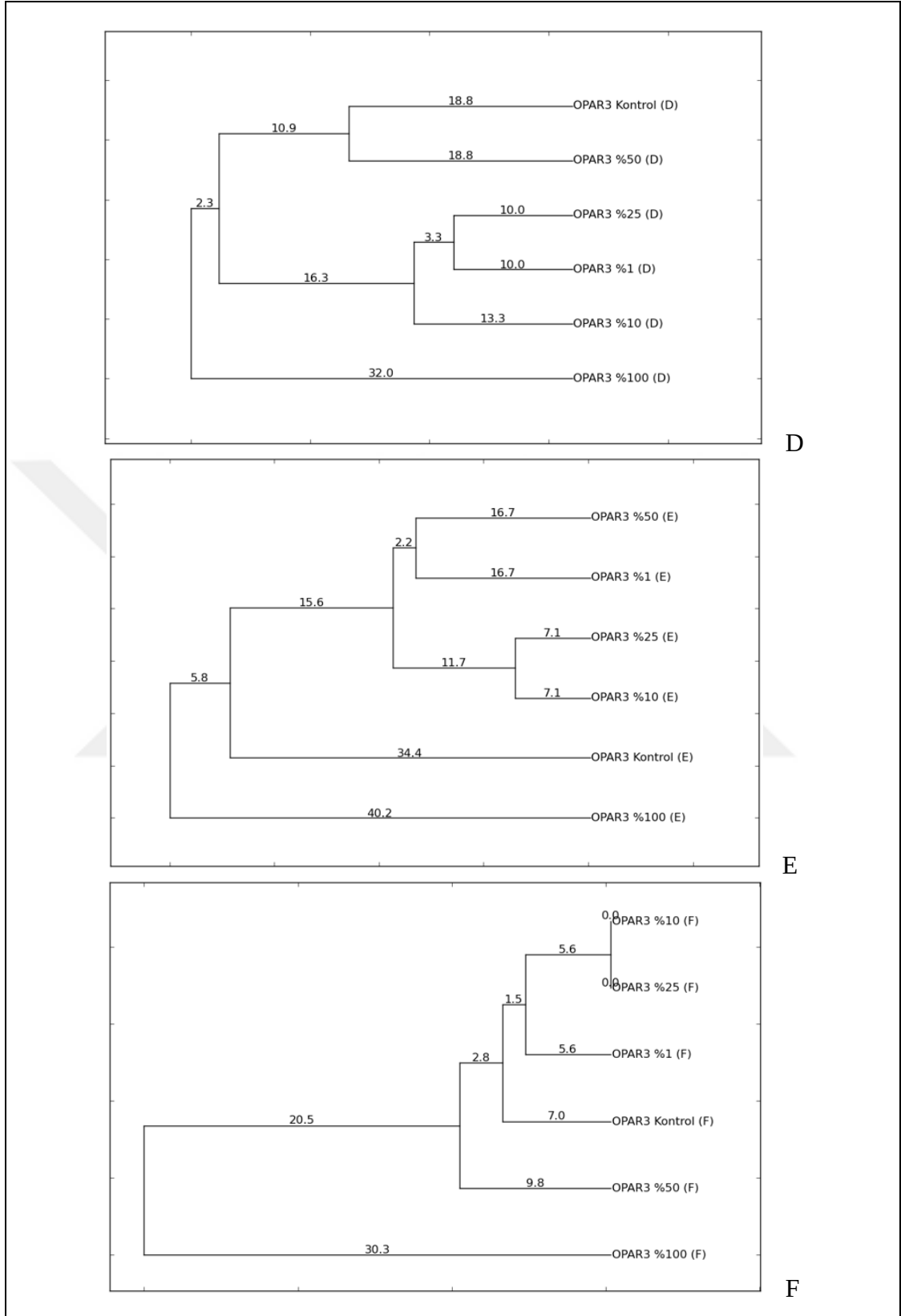
Şekil 4.11. Biyosorpsiyon öncesi OPAR8 primeri ile yapılan üç denemenin kümeleme analizi sonucunda elde edilen dendrogramı (A: 1. Deneme, B: 2. Deneme, C: 3. Deneme)



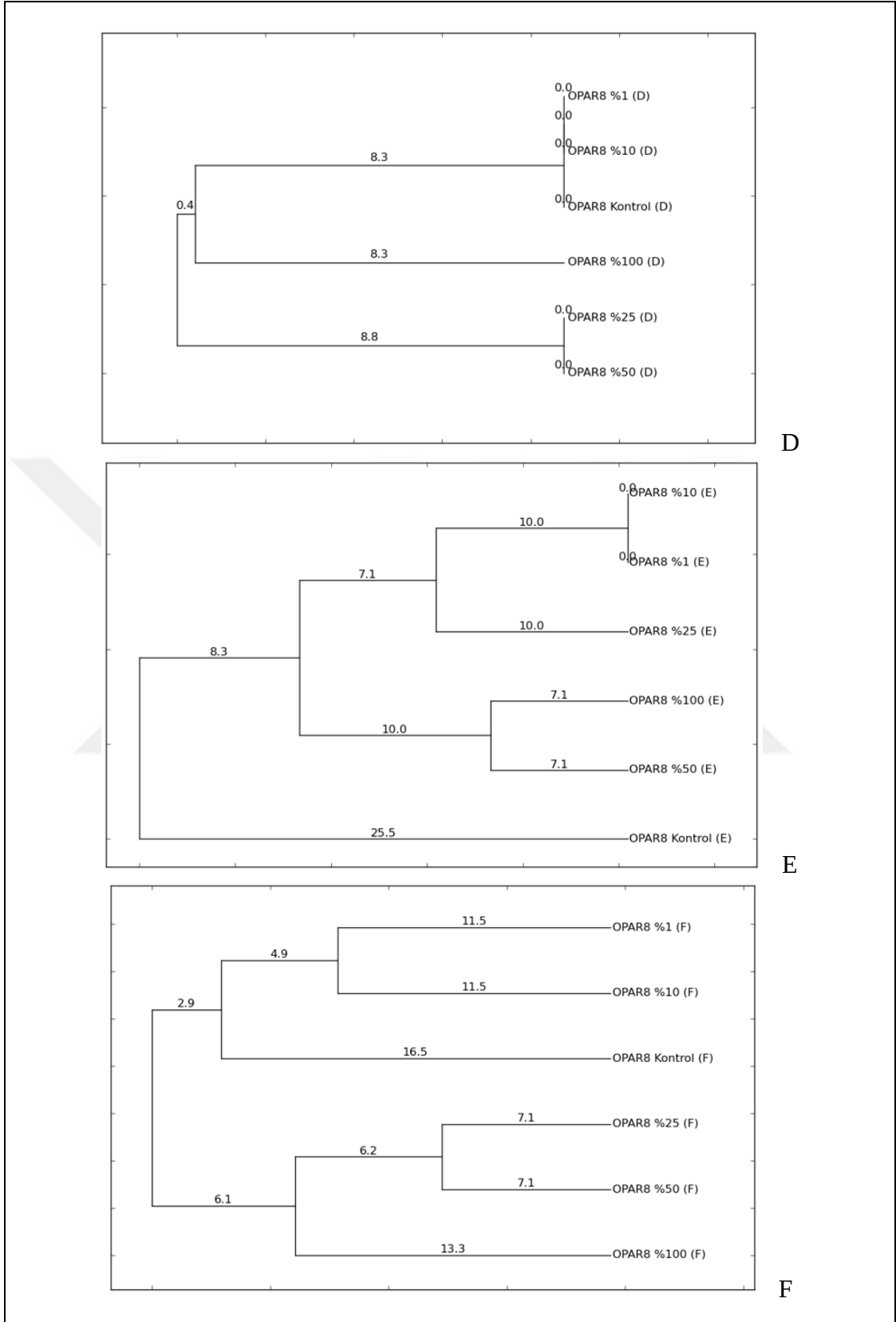
Şekil 4.12. Biyosorpsiyon öncesi Primer640 primeri ile yapılan üç denemenin kümeleme analizi sonucunda elde edilen dendrogramı (A: 1. Deneme, B: 2. Deneme, C: 3. Deneme)



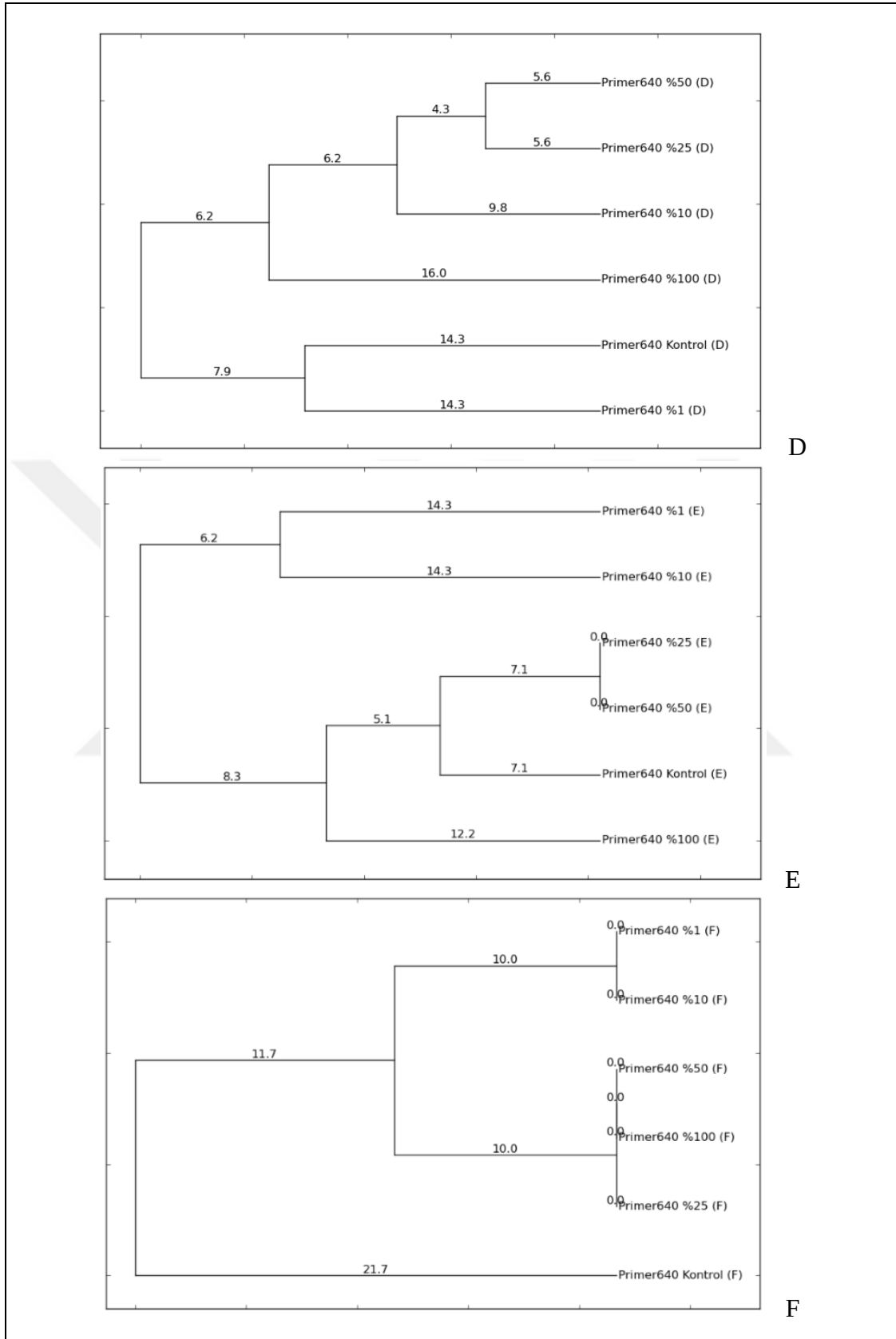
Şekil 4.13. Biyosorpsiyon öncesi AP4 primeri ile yapılan üç denemenin kümeleme analizi sonucunda elde edilen dendrogramı (A: 1. Deneme, B: 2. Deneme, C: 3. Deneme)



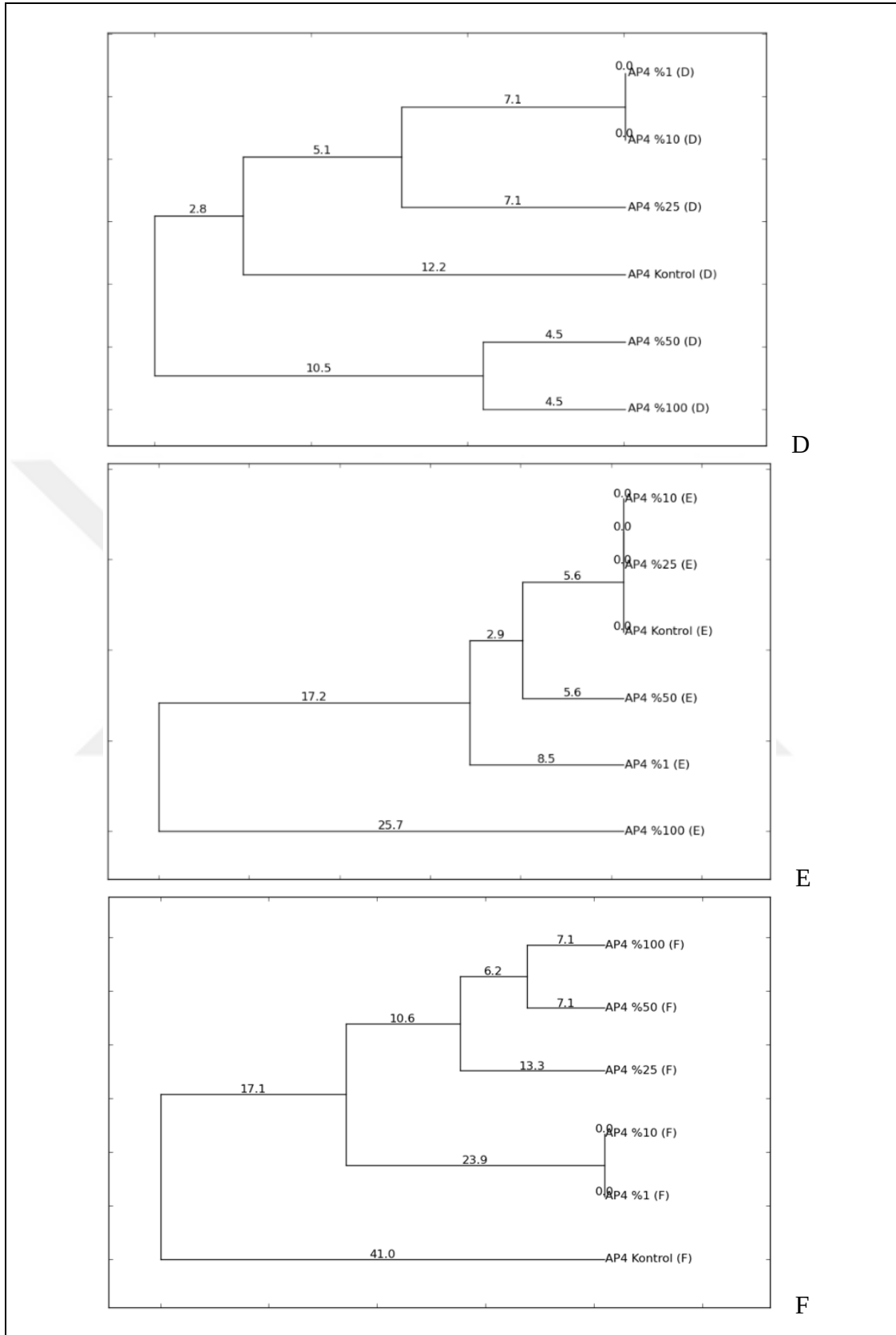
Şekil 4.14. Biyosorpsiyon sonrası OPAR3 primeri ile yapılan üç denemenin kümeleme analizi sonucunda elde edilen dendrogramı (D: 1. Deneme, E: 2. Deneme, F: 3. Deneme)



Şekil 4.15. Biyosorpsiyon sonrası OPAR8 primeri ile yapılan üç denemenin kümeleme analizi sonucunda elde edilen dendrogramı (D: 1. Deneme, E: 2. Deneme, F: 3. Deneme)



Şekil 4.16. Biyosorpsiyon sonrası Primer640 primeri ile yapılan üç denemenin kümeleme analizi sonucunda elde edilen dendrogramı (D: 1. Deneme, E: 2. Deneme, F: 3. Deneme)



Şekil 4.17. Biyosorpsiyon sonrası AP4 primeri ile yapılan üç denemenin kümeleme analizi sonucunda elde edilen dendrogramı (D: 1. Deneme, E: 2. Deneme, F: 3. Deneme)

Dendogramlara bakıldığında biyosorpsiyon öncesinde OPAR3 primeriyle yapılan çalışmada ilk denemede kontrole göre en fazla farklılık gösteren konsantrasyonlar %100 ve %25'dir. Diğer denemelerde %10 konsantrasyonu kontrole göre daha farklı durumdadır. OPAR8 primeriyle yapılan çalışmada ilk denemede %1, %10 ve %100 konsantrasyonlar diğer konsantrasyonlara göre kontrolden daha fazla farklılık göstermiştir. İkinci denemede %50 konsantrasyonu dışındaki konsantrasyonlar kontrolden farklı durumdadır. Üçüncü denemede ise %1 ve %10 konsantrasyonları kontrole olan uzaklıklarını korumuşlardır. AP4 primeriyle yapılan çalışmada birinci denemede kontrole göre en fazla farklılığı %10 konsantrasyonu göstermiştir. İkinci denemede en fazla farklılık yine %10 ve %1 konsantrasyonlarında görülmüştür. Üçüncü denemede tüm konsantrasyonlar kontrolden farklı durumdadır. Primer640 primeriyle yapılan çalışmada ilk denemede tüm konsantrasyonlar kontrolden farklı durumdadır. İkinci denemede de tüm konsantrasyonlar kontrolden farklı durumdadır. Üçüncü denemede diğer denemelerde olduğu gibi tüm konsantrasyonlar kontrolden farklıdır.

Biyosorpsiyon sonrası AP4 primeriyle yapılan çalışmada üç denemede kontrole göre en fazla farklılık gösteren konsantrasyon %100 olarak belirlenmiştir. Diğer denemelerde tüm konsantrasyonlar kontrolden farklı durumdadır. OPAR3 ve OPAR8 primeriyle yapılan biyosorpsiyon sonrası oluşturulan dendogramda yine yüksek konsantrasyonlarda %100 de kontrole olan uzaklık fazladır. OPAR8 primeriyle yapılan çalışmada ise üçüncü deneme de %1 ve %10 konsantrasyonlarının kontrole olan uzaklıkları azdır. Primer640 ile yapılan çalışmada ise tüm denemelerde konsantrasyonlar farklı durumdadır.

4.2.2. Mikrotoks sonuçlarının değerlendirilmesi

Mikrotoks analizi sonucunda (Çizelge 4.13) boya atık çamurunun biyosorpsiyon öncesi %10 konsantrasyonda hormesis etkisi gözlemlenmiştir. Potansiyel toksik maddelerin düşük konsantrasyonlarının uyarıcı etkiye neden olması ve kontrol grubuna göre daha yüksek ışık salınımı yapması olgusu hormesis olarak ifade edilmektedir (Ferraz vd., 2011).

Çizelge 4.13. Mikrotoks testi sonucunda atık çamur konsantrasyonlarında elde edilen akut toksisite değerleri

Atık Çamur Konsantrasyonları	Akut Toksisite Değeri (%) 5 dk		Akut Toksisite Değeri (%) 15 dk	
	BÖ	BS	BÖ	BS
% 100	29	18	24	13
% 50	99	17	99	19
% 25	72	41	70	44
% 10	Hormesis	10	Hormesis	12
% 1	99	-4	99	23

BÖ: Biyosorpsiyon öncesi, **BS:** Biyosorpsiyon sonrası

5 ve 15 dakikalık periyod içerisinde boya atık çamurunun toksisitesi incelenmiştir. Hormesis olan %10 biyosorpsiyon öncesi boya atık çamuru konsantrasyonu için 15 dk yapılan uygulamada az da olsa toksik etkinin olduğu görülmektedir. Biyosorpsiyon %1 olan ortamlarda ise toksisiteyi oldukça düşürmüştür. Buna göre biyosorpsiyondan önce toksik olan %100, %50, %25’lik konsantrasyonların toksisitesi, biyosorpsiyon sonucunda belirgin düzeyde düşüş göstermiştir. Başlangıçta çok toksik olan %50 konsantrasyonun toksisitesi, her iki uygulama sonucunda da düşüş göstermiştir. %100 konsantrasyonu için yapılan uygulamalarda ise çok fazla toksik bir etki gözlenmemiş ve biyosorpsiyon öncesi ve sonrasında belirgin bir farklılık olmadığı görülmüştür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ekosistemler üzerine önemli zararları olan boyar maddelerin gideriminde fiziksel ve kimyasal yöntemler uygulanabilmektedir. Boyaların kimyasal stabilitesinden dolayı fizikokimyasal arıtım teknolojilerinin, boya endüstrisi atık çamurlarının arıtımında çok etkili olmadığı bilinmektedir. Bundan dolayı fizikokimyasal yöntemlere göre çevre dostu olan, düşük maliyet ve mineralizasyon avantajları bulunan biyolojik giderim yöntemleri önem kazanmıştır (Mani vd., 2019). Bu nedenle bu çalışmada mikroorganizmalarla atık çamurun inorganik kirleticilerden uzaklaştırılması için biyosorpsiyon uygulaması gerçekleştirilmiş ve en yüksek miktarda giderimin bakırda (Cu) olduğu gözlenmiştir. Pamukoğlu ve Kargı (2006) yaptıkları çalışmada, boya atık çamurlarında Cu (II) iyonları biyosorpsiyon kapasitesinin yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Bu da bizim çalışmamızı desteklemektedir.

Boya atık çamurunun mikroorganizma kullanılan toksisite sistemleri ile araştırılmış olması bu çalışmayı ön plana çıkarmaktadır. Bu şekilde yapılan başka bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu çalışma, çalışmada kullanılan toksisite sistemlerinin boya üretim tesislerinde açığa çıkan atık çamurların toksik etkisini belirlemek için uygun olduğu ve ilgili sektörlere önerilebileceğini ortaya koymuştur.

Liu vd. (2005), toksik maddelere maruz kalma sonucunda meydana gelen RAPD profillerindeki değişikliklerin genomik DNA kalıp stabilitesindeki değişiklikler olarak kabul edilebileceğini bildirmektedirler. Bu çalışmada benzerlik indeksleri ile dendogramlar oluşturularak, genotoksisitenin belirlenmesi için kullandığımız RAPD verilerinin daha iyi anlaşılabilmesi sağlanmıştır. Mikrotoks deney sistemi ile belirlenen EC₅₀ 15 dakika değerleri ise, boya atık çamurunun farklı toksisite seviyelerini açıkça ortaya koymuştur.

Bu çalışmada endüstriyel atık sulardan izole edilen bir mikroorganizmanın kullanıldığı biyosorpsiyon işlemi uygulanmıştır. Boya atık çamurunda biyosorpsiyon ile giderim potansiyellerinin belirlenmesi ve ağır metal miktarlarının belirlenerek karakterize edilmesi çalışmamızı özgün kılmaktadır.

Biyosorpsiyon işleminden sonraki RAPD-PCR verilerine bakıldığında bazı konsantrasyonlarda genotoksisitede herhangi bir düşme görülmemiştir. Bu da, bu çalışmada

biyosorpsiyonu gerçekleştirilen ağır metaller dışında başka maddelerin de genotoksisiteden sorumluğu olabileceğini dışındırmektedir. Aynı zamanda literatürde de atık çamurların farklı biyolojik arıtma yöntemleriyle ardışık olarak arıtılması gerektiği vurgulanmaktadır (Eason vd., 2001).

İleriki çalışmalarımız bu atık çamur örneklerinin farklı yöntemlerle arıtılması ve aynı zamanda genotoksisitelerinin de başka yöntemlerle çalışılarak daha geniş bir bilgiye sahip olmak amacını taşıyacaktır.



KAYNAKLAR DİZİNİ

Acuña, M., Jorquera, H., Armanet Bernales, L., & Cifuentes Ovalle, L. (2000). Gene frequencies for four hypervariable DNA loci in a Chilean population of mixed ancestry.

Akbar, H. (2018). Kısa Ardışık Tekrar Bölgelerinin (“Short Tandem Repeats”-STR) Analizi Doku Karışıklığına Çözüm Olabilir Mi ve Aynı Hastada Non-Neoplastik ve Neoplastik Bölgeler Arası STR Profilinin Karşılaştırılması? – Ön Çalışma.

APHA, A. W. W. A. (1985). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (p. 1268). Washington: APHA.

Atienzar, F. A., Evenden, A. J., Jha, A. N., & Depledge, M. H. (2002). The use of random amplified polymorphic DNA assay as a biomarker for the detection of diverse genetic alterations: possible implication of confounding factors. *Biomarkers*, 7(1), 94-101.

Atienzar, F. A., & Jha, A. N. (2006). The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 613(2-3), 76-102.

Becerril, C., Acevedo, H., Ferrero, M., Sanz, F., & Castaño, A. (2001). DNA fingerprint comparison of rainbow trout and RTG-2 cell line using random amplified polymorphic DNA. *Ecotoxicology*, 10(2), 115-124.

Berradi, M., Hsissou, R., Khudhair, M., Assouag, M., Cherkaoui, O., El Bachiri, A., & El Harfi, A. (2019). Textile finishing dyes and their impact on aquatic environs. *Heliyon*, 5(11), e02711.

Booth, G., Zollinger, H., McLaren, K., Sharples, W. G., & Westwell, A. (2000). Dyes, general survey. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 5.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Bowditch, B. M., Albright, D. G., Williams, J. G., & Braun, M. J. (1993). [21] Use of randomly amplified polymorphic DNA markers in comparative genome studies. In *Methods in enzymology* (Vol. 224, pp. 294-309). Academic Press.

Carr, E., Eason, H., Feng, S., Hoogenraad, A., Croome, R., Soddell, J., ... & Seviour, R. (2001). RAPD-PCR typing of *Acinetobacter* isolates from activated sludge systems designed to remove phosphorus microbiologically. *Journal of applied microbiology*, 90(3), 309-319.

Cenkci, S., Yıldız, M., Ciğerci, İ. H., Bozdağ, A., Terzi, H., & Terzi, E. S. A. (2010). Evaluation of 2, 4-D and Dicamba genotoxicity in bean seedlings using comet and RAPD assays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(7), 1558-1564.

Choy, W. N. (2001). Regulatory genetic toxicology tests. *Genetic toxicology and cancer risk assessment*, 93-113.

Çelebi, S., & Kendir, S. (2002). Toxicity assessment of a dye industry treatment sludge. *Waste management & research*, 20(6), 541-545.

De Wolf, H., Blust, R., & Backeljau, T. (2004). The use of RAPD in ecotoxicology. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 566(3), 249-262.

Duffus, J. H., & Worth, H. G. (Eds.). (1996). *Fundamental toxicology for chemists*. Royal Society of Chemistry.

Eichler, E. E. (2019). Genetic variation, comparative genomics, and the diagnosis of disease. *New England Journal of Medicine*, 381(1), 64-74.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Eisen, D., Russell, E. G., Tymms, M., Roper, E. J., Grayson, M. L., & Turnidge, J. (1995). Random amplified polymorphic DNA and plasmid analyses used in investigation of an outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of clinical microbiology*, 33(3), 713-717.

Element, C. A. S. (2007). Method 3051A microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils. *Z. Für Anal. Chem*, 111, 362-366.

Fatima, M., Farooq, R., Lindström, R. W., & Saeed, M. (2017). A review on biocatalytic decomposition of azo dyes and electrons recovery. *Journal of Molecular Liquids*, 246, 275-281.

Ferraz, E. R., Grando, M. D., & Oliveira, D. P. (2011). The azo dye Disperse Orange 1 induces DNA damage and cytotoxic effects but does not cause ecotoxic effects in *Daphnia similis* and *Vibrio fischeri*. *Journal of hazardous materials*, 192(2), 628-633.

Filipović, J., Grčić, I., Bermanec, V., & Kniewald, G. (2013). Monitoring of total metal concentration in sludge samples: Case study for the mechanical–biological wastewater treatment plant in Velika Gorica, Croatia. *Science of the total environment*, 447, 17-24.

Fletcher, H., Hickey, I., & Horstmann, C. (2013). *Genetik: für Biologen, Biochemiker, Pharmazeuten und Mediziner*. John Wiley & Sons.

Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS (2002). Enterobacteriaceae. In Bailey&Scott's Diagnostic Microbiology, 365-377.

Ford, D. (1998). *Toxicity Reduction: Evaluation and Control, Volume III* (Vol. 3). CRC Press.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Gallo, M. A. (2001). History and Scope of Toxicology in Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. ed. Curtis D. Klaassen.

Gita, S., Hussan, A., & Choudhury, T. G. (2017). Impact of textile dyes waste on aquatic environments and its treatment. *Environ. Ecol*, 35(3C), 2349-2353.

Gjorgieva, D., Kadifkova-Panovska, T., Mitrev, S., Kovacevik, B., Kostadinovska, E., Bačeva, K., & Stafilov, T. (2012). Assessment of the genotoxicity of heavy metals in *Phaseolus vulgaris* L. as a model plant system by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 47(3), 366-373.

Gori, A., Espinasse, F., Deplano, A., Nonhoff, C., Nicolas, M. H., & Struelens, M. J. (1996). Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified DNA polymorphism analysis for typing extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(10), 2448-2453.

Gupta R., Ahuja P., Khan S., Saxena R. K., and Mohapatra H. (2000). Microbial biosorbents: Meeting challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Current Science*.78,8:967-73.

Grant, A., & Briggs, A. D. (2002). Toxicity of sediments from around a North Sea oil platform: are metals or hydrocarbons responsible for ecological impacts?. *Marine Environmental Research*, 53(1), 95-116.

Griffiths, J. F., Griffiths, A. J., Wessler, S. R., Lewontin, R. C., Gelbart, W. M., Suzuki, D. T., & Miller, J. H. (2005). *An introduction to genetic analysis*. Macmillan.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Haryani, Y., Noorzaleha, A. S., Fatimah, A. B., Noorjahan, B. A., Patrick, G. B., Shamsinar, A. T., ... & Son, R. (2007). Incidence of *Klebsiella pneumonia* in street foods sold in Malaysia and their characterization by antibiotic resistance, plasmid profiling, and RAPD–PCR analysis. *Food Control*, 18(7), 847-853.

Hicham, Z., Bencheqroun, Z., El Mrabet, I., & Neves, I. (2019). Removal of basic dyes from aqueous solutions by adsorption onto Moroccan clay (Fez city). *Mediterranean Journal of Chemistry*, 8(3), 158-167.

Hosler, G. A., & Murphy, K. M. (2014). Basics of Nucleic Acids and Molecular Biology. In *Molecular Diagnostics for Dermatology* (pp. 5-26). Springer, Berlin, Heidelberg.

Hunger, K. (Ed.). (2007). *Industrial dyes: chemistry, properties, applications*. John Wiley & Sons.

Javanbakht, V., Zilouei, H., & Karimi, K. (2011). Lead biosorption by different morphologies of fungus *Mucor indicus*. *International biodeterioration & biodegradation*, 65(2), 294-300.

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.

Jiang, C., Wang, X., Qin, D., Da, W., Hou, B., Hao, C., & Wu, J. (2019). Construction of magnetic lignin-based adsorbent and its adsorption properties for dyes. *Journal of hazardous materials*, 369, 50-61.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Jones, C., & Kortenkamp, A. (2000). RAPD library fingerprinting of bacterial and human DNA: applications in mutation detection. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*, 20(2), 49-63.

Kant, R. (2011). Textile dyeing industry an environmental hazard.

Karki, R., Pandya, D., Elston, R. C., & Ferlini, C. (2015). Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. *BMC medical genomics*, 8(1), 1-7.

Kapanen, A., Vikman, M., Rajasärkkä, J., Virta, M., & Itävaara, M. (2013). Biotests for environmental quality assessment of composted sewage sludge. *Waste Management*, 33(6), 1451-1460.

Kapoor, A., & Viraraghavan, T. (1998). Biosorption of heavy metals on *Aspergillus niger*: effect of pretreatment. *Bioresource technology*, 63(2), 109-113.

Katsoyiannis, A., & Samara, C. (2007). Ecotoxicological evaluation of the wastewater treatment process of the sewage treatment plant of Thessaloniki, Greece. *Journal of Hazardous Materials*, 141(3), 614-621.

Koeman, J. H. (1996). Toxicology, history and scope of the field. *Toxicology: Principles and Applications*, CRC Press, Boca raton FL, 3-14.

Lellis, B., Fávaro-Polonio, C. Z., Pamphile, J. A., & Polonio, J. C. (2019). Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms. *Biotechnology Research and Innovation*, 3(2), 275-290.

Liu, W., Li, P. J., Qi, X. M., Zhou, Q. X., Zheng, L., Sun, T. H., & Yang, Y. S. (2005). DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis. *Chemosphere*, 61(2), 158-167.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Liu, W., Yang, Y. S., Zhou, Q., Xie, L., Li, P. A., & Sun, T. (2007). Impact assessment of cadmium contamination on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings at molecular and population levels using multiple biomarkers. *Chemosphere*, 67(6), 1155-1163.

Liu, B., Wei, Q., Zhang, B., & Bi, J. (2013). Life cycle GHG emissions of sewage sludge treatment and disposal options in Tai Lake Watershed, China. *Science of the Total Environment*, 447, 361-369.

Mani, S., Chowdhary, P., & Bharagava, R. N. (2019). Textile wastewater dyes: toxicity profile and treatment approaches. In *Emerging and eco-friendly approaches for waste management* (pp. 219-244). Springer, Singapore.

Marrero, P., Fregel, R., Cabrera, V. M., & Nogales, M. (2009). Extraction of high-quality host DNA from feces and regurgitated seeds: a useful tool for vertebrate ecological studies. *Biological Research*, 42(2), 147-151.

Manual, M. (1992). Microbics Corporation. *Carlsbad, California*.

Meunier, J. R., & Grimont, P. A. D. (1993). Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Research in Microbiology*, 144(5), 373-379.

Metcalf, L., Eddy, H. P., & Tchobanoglous, G. (1991). *Wastewater engineering: treatment, disposal, and reuse* (Vol. 4). New York: McGraw-Hill.

Nemerow, N. L., & Agardy, F. J. (1998). *Strategies of industrial and hazardous waste management*. John Wiley & Sons.

Noel, S., & Rath, S. K. (2006). Randomly amplified polymorphic DNA as a tool for genotoxicity: an assessment. *Toxicology and industrial health*, 22(6), 267-275.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Pamukoglu, M. Y., & Kargi, F. (2006). Removal of copper (II) ions from aqueous medium by biosorption onto powdered waste sludge. *Process Biochemistry*, 41(5), 1047-1054.

Piotrowska-Seget, Z., Cycoń, M., & Kozdroj, J. (2005). Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil. *Applied Soil Ecology*, 28(3), 237-246.

Porobić, S. J., Božić, B. Đ., Dramićanin, M. D., Vitnik, V., Vitnik, Ž., Marinović-Cincović, M., & Mijin, D. Ž. (2020). Absorption and fluorescence spectral properties of azo dyes based on 3-amido-6-hydroxy-4-methyl-2-pyridone: Solvent and substituent effects. *Dyes and Pigments*, 175, 108139.

Ravikumar, K., Deebika, B., & Balu, K. (2005). Decolourization of aqueous dye solutions by a novel adsorbent: application of statistical designs and surface plots for the optimization and regression analysis. *Journal of hazardous materials*, 122(1-2), 75-83.

Ramoutsaki, I. A., Ramoutsakis, Y. A., Tsikritzis, M. D., & Tsatsakis, A. M. (2000). The roots of toxicology: an etymology approach. *Veterinary and human toxicology*, 42(2), 111-111.

Savva, D., Castellani, S., Mattei, N., Renzoni, A., & Walker, C. H. (1994). The use of PCR and DNA fingerprints to detect the genotoxic effects of environmental chemicals. In *Proceedings of the 6th International Conference on Environmental Contamination. Delphi, Greece: CEP* (pp. 105-110).

Saxena, G., & Bharagava, R. N. (2017). Organic and inorganic pollutants in industrial wastes: ecotoxicological effects, health hazards, and bioremediation approaches. In *Environmental pollutants and their bioremediation approaches* (pp. 23-56). CRC Press.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Shindhal, T., Rakholiya, P., Varjani, S., Pandey, A., Ngo, H. H., Guo, W., ... & Taherzadeh, M. J. (2021). A critical review on advances in the practices and perspectives for the treatment of dye industry wastewater. *Bioengineered*, 12(1), 70-87.

Sudha, M., Saranya, A., Selvakumar, G., & Sivakumar, N. (2014). Microbial degradation of azo dyes: a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(2), 670-690.

Sun, Q., & Yang, L. (2003). The adsorption of basic dyes from aqueous solution on modified peat-resin particle. *Water research*, 37(7), 1535-1544.

Sponza, D. T., & Kuscü, Ö. S. (2011). Relationships between acute toxicities of para nitrophenol (p-NP) and nitrobenzene (NB) to *Daphnia magna* and *Photobacterium phosphoreum*: Physicochemical properties and metabolites under anaerobic/aerobic sequential. *Journal of hazardous materials*, 185(2-3), 1187-1197.

Temizkan G. and Arda N., editors. *Temel ve İleri Moleküler Biyoloji Yöntemleri*. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2017.

Theodorakis, C. W. (2001). Integration of genotoxic and population genetic endpoints in biomonitoring and risk assessment. *Ecotoxicology*, 10(4), 245-256.

Tunali, 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.

Turkez, H., Arslan, M. E., & Ozdemir, O. (2017). Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 13(10), 1089-1098.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Varjani, S., Rakholiya, P., Ng, H. Y., You, S., & Teixeira, J. A. (2020). Microbial degradation of dyes: an overview. *Bioresource Technology*, 314, 123728.

Varjani, S., Rakholiya, P., Shindhal, T., Shah, A. V., & Ngo, H. H. (2021). Trends in dye industry effluent treatment and recovery of value added products. *Journal of Water Process Engineering*, 39, 101734.

Vieira, R. H., & Volesky, B. (2000). Biosorption: a solution to pollution?. *International microbiology*, 3(1), 17-24.

Vogelstein B., & Kinzler, K. W. (1992). Carcinogens leave fingerprints. *Nature*, 355(6357), 209-210.

Volesky, B. (2001). Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. *Hydrometallurgy*, 59(2-3), 203-216.

Wang, J., & Chen, C. (2009). Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology advances*, 27(2), 195-226.

Wax, P. M. (1996). It's happening again—another diethylene glycol mass poisoning. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 34(5), 517-520.

Wax, P. M. (1998). Toxicologic plagues and disasters in history. *Goldfrank's toxicologic emergencies/Ed. LR Goldfrank.—6th ed.—Stamford, Connecticut: Appleton & Lange*, 19.

Wilk, P., & Szalińska, E. (2011). Microtox as a tool to evaluate sediments toxicity. *Environmental Engineering*, 6(108), 247-263.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Wyres, K. L., Lam, M., & Holt, K. E. (2020). Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Reviews Microbiology*, 18(6), 344-359.

Yaseen, D. A., & Scholz, M. (2018). Treatment of synthetic textile wastewater containing dye mixtures with microcosms. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(2), 1980-1997.

Yuan, C., & Weng, C. H. (2006). Electrokinetic enhancement removal of heavy metals from industrial wastewater sludge. *Chemosphere*, 65(1), 88-96.

Zhang, X., Wang, J., Dong, X. X., & Lv, Y. K. (2020). Functionalized metal-organic frameworks for photocatalytic degradation of organic pollutants in environment. *Chemosphere*, 242, 125144.

Zuloaga, O., Navarro, P., Bizkarguenaga, E., Iparraguirre, A., Vallejo, A., Olivares, M., & Prieto, A. (2012). Overview of extraction, clean-up and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: a review. *Analytica chimica acta*, 736, 7-29.