

Elektrospin yöntemi ile üretilmiş nanolif/nanoağ yapılara biyoremediasyon özelliği bulunan bakteri entegrasyonu ve bu biyokompozit malzemelerin farklı endüstriyel kirletici içeren atık su giderimindeki verimliliğinin araştırılması

Program Kodu: 2515

Proje No: 114Y264

Proje Yürütücüsü:

Doç.Dr. Tamer UYAR

Araştırmacılar:

Dr. NALAN OYA SAN KESKİN

Bursiyerler:

ÖMER FARUK SARİOĞLU (01/11/2015 - 01/05/2016, BİDEB burslusu)

Dr. ASLI ÇELEBİOĞLU (01/06/2016 - 31/10/2016)

Dr. AMARESH CHANDRA PRADHAN (15/02/2016 - 31/10/2016)

ZEHRİ İREM YILDIZ (16/02/2016 - 31/10/2016, BİDEB burslusu)

Dr. ANİTHA SENTHAMİZHAN (01/03/2015 - 31/10/2015, BİDEB burslusu)

Dr. BRABU BALUSAMY (01/03/2015 - 30/06/2016, BİDEB burslusu)

EKİM 2016

ANKARA

ÖNSÖZ

Ülkemizde endüstriyel atık suların çevreye olan zararlı etkisi, sanayi faaliyetlerinin artan kapasitesi ve kullanılan kimyasalların çeşitliliği nedeniyle her geçen gün artmaktadır. Bu nedenle, çok işlevli ve ileri teknolojiler ile üretilmiş ve geliştirilmiş teknolojilere olan ihtiyaç da eş zamanlı olarak artmaktadır. Günümüzde, elektrospin yöntemi ile elde edilen nanolif/nanoağ yapılı malzemeler atık su arıtımı alanında kullanılmaya başlanmıştır. Fakat bu nanoağların daha etkin bir şekilde kullanılabilmesi için çok daha fonksiyonel hale getirilmeleri gerekmektedir. Proje çalışması kapsamında, elektrospin yöntemi kullanılarak, ağır metal, tekstil boyar maddesi ve deterjan gibi kirleticilerin giderimini yapabilen bakterileri bünyesinde barındıran nanolif/nanoağ yapıları farklı entegrasyon yolları kullanılarak üretilmiş ve üretilen biyokompozitlerin atık su temizliğinde kullanılma potansiyelleri araştırılmıştır. Bakterilerin entegrasyonu için doğal tutunma, direkt enkapsülasyon ve çekirdek-kabuk enkapsülasyon yöntemleri kullanılmıştır. Bakterilerin üretilen nanoağ yapılarına entegrasyonu ile daha verimli ve kolay kullanılabilecek taşıyıcı malzemeler elde edilmiştir. Proje dahilinde, su tüketiminin çok yoğun olduğu sektörlerdeki atık sularda bulunan ağır metal, tekstil boyar maddesi ve deterjanların uzaklaştırılmasını sağlayacak nanolif/nanoağ yapılı yeni malzemeler geliştirilmiş ve atık su giderim potansiyelleri araştırılmış, ayrıca üretilen biyokompozitlerin tekrar kullanılabilirlik ve saklanabilirlik gibi özellikleri test edilerek değerlendirilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre bakteri entegre edilmiş fonksiyonel nanoağ yapıları atık sulardaki belirli kirleticileri giderme potansiyeline sahiptir, ayrıca tekrar kullanılabilirlik ve uzun süre saklanabilirlik gibi üstün özellikler taşıyabilmektedir. Proje çıktılarımızın fonksiyonel membran sistemlerinin geliştirilmesinin önünü açacağını düşünmekteyiz. Yaptığımız bu proje TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (Proje #: 114Y264).

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLOLAR DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1.GİRİŞ.....	1
2.LİTERATÜR ÖZETİ	2
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	8
4.BULGULAR ve TARTIŞMA/SONUÇ	11
5. SONUÇ	72
6.KAYNAKLAR	74

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Bakteri/PSU-NF için adsorpsiyon kinetik sabitleri.....	31
Tablo 2. Bakteri/PSU-NF kullanılarak Cr(VI) ve RB5 boyar madde gideriminde hesaplanan birinci, ikinci ve üçüncü eğriden elde edilen R^2 değerleri.....	31
Tablo 3. STB3/nCA, STB3/pCA, STB4/nCA ve STB4/pCA örneklerine uygulanan canlı hücre sayımı (VCC) değerlerinin farklı zaman aralıklarındaki sonuçları. Sonuçlar cfu/mL'ye göre hesaplanmıştır. Sayım yapılan her örnek için ağırlık/hacim (w/v) oranı aynı olup bu değer 0,5 mg/mL'dir.....	35
Tablo 4. STB3/pSA ve STB4/pSA örnekleri için adsorpsiyon kinetik sabitleri.....	37
Tablo 5. Bakteri/PSU-NF kullanılarak Cr(VI) ve RB5 boyar madde gideriminde hesaplanan birinci, ikinci ve üçüncü eğriden elde edilen R^2 değerleri.....	37
Tablo 6. Serbest bakteri, bakteri/PVA ve bakteri/PEO örneklerinin denge durumunda giderim işlemi sonrasında hesaplanan giderim kapasiteleri ve yüzde giderim değerleri. Sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 125 rpm, inkübasyon süresi: 48 saat.....	57
Tablo 7. Serbest bakteri, bakteri/PVA ve bakteri/PEO örneklerinin her izoterm modeli için hesaplanmış adsorpsiyon izoterm katsayıları.....	58
Tablo 8. Serbest bakteri, bakteri/PVA ve bakteri/PEO örneklerinin metilen mavisi gideriminde hesaplanan sıfırıncı, birinci, ikinci ve üçüncü düzenden elde edilen R^2 değerleri.....	58
Tablo 9. Bakteri/PVA ve bakteri/PEO örneklerinin 4°C veya 25°C'de farklı periyotlarda hesaplanmış canlı hücre sayımı (VCC) sonuçları. Sonuçlar cfu/mL olarak verilmiştir. Ağırlık/hacim (w/v) oranı her bir örnek için eşit tutulmuş (5 mg/mL), bakteriler eşit miktarda distile su içerisinde çözüldükten sonra VCC yöntemi uygulanmıştır.....	60
Tablo 10. Bakteri/SD-NF için Ni(II) adsorpsiyon izoterm katsayıları.....	67
Tablo 11. Bakteri/SD-NF için Cr(VI) adsorpsiyon izoterm katsayıları.....	68
Tablo 12. Bakteri/SD-NF için RB5 adsorpsiyon izoterm katsayıları.....	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Elektrospın düzeneği ve nanolif üretimi.....	5
Şekil 2. (a) Paralel diziliimli nanoliflerin SEM görüntüsü. (b) Koaksiyel elektrospın tekniği ile çekirdek-kabuk nanoliflerinin üretimi ve temsili TEM görüntüsü. (c) Gözenekli SA nanoliflerinin SEM görüntüsü.....	6
Şekil 3. (a) SA nanoliflerinin üretiminin şematik olarak gösterimi. (b) STB1 bakterileri tutundurulmuş SA nanoliflerin şematik olarak gösterimi.....	8
Şekil 4. (a-i) 4\1 (v\ v) DMAc\metanol (a-ii) 4\1 (v\ v) DCM\metanol çözelti karışımlarında 10% SA (w\ v) konsantrasyonu kullanılarak, elektrospın prosesi sonucu elde edilen boncuksu yapıların ve nanoliflerin SEM görüntüleri. Değişik çözelti konsantrasyonlarında elde edilen PEO nanoliflerinin SEM görüntüleri (b-i) %1, (b-ii) %2, (b-iii) %3,5.....	8
Şekil 5. (a) pSA, (b) PSU ve (c) PS nanoliflerine ait temsili SEM görüntüleri.....	12
Şekil 6. Elektrospın yöntemi ile SA nanoliflerinin eldesi, bakterilerin immobilizasyonu ve atıksu arıtımda kullanımının şematik gösterimi.....	12
Şekil 7. (a) düşük ve (b) yüksek büyötmeli SA nanoliflerin SEM mikrografları.....	12
Şekil 8. (a) <i>A. eucrenophila</i> (b) <i>P. Aeruginosa</i> ve (c) <i>C. michiganensis</i> bakterilerin genel morfolojileri.....	13
Şekil 9. (a-i and a-ii) <i>Aeromonas eucrenophila</i> , (b-i and b-ii) <i>Clavibacter michiganenesis</i> , (c-i and c-ii) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bakterilerinin 7 gün SA yüzeylerine tutunmaları.....	13
Şekil 10. (a) Elektrospın yöntemi ile PSU-NF elde edilmesi şematik gösterimi (b) sadece PSU nanoağ yapıları, mikroalg inköbe edilmiş 3 ve 10 günlük immobilizasyonları gösteren fotoğraflar (c) Remazol Siyah 5 (RB5) ve Reaktif Mavi 221 (RB221) boyar maddelerin kimyasal yapıları.....	14
Şekil 11. (a) sadece PSU-NFW ve (b-c) mikroalg/PSU-NFW örneklerinin farklı büyötmelerde çekilmiş olan SEM görüntüleri.....	15
Şekil 12. (a) sadece PSU-NFW'in (b) mikroalg/PSU-NFW örneğinin Raman spektrumları....	15
Şekil 13. (a) Elektrospın yöntemi ile PS ve PSU nanoliflerinin elde edilmesinin şematik gösterimi (b) bakteri tutundurulmuş PS nanolifleri (c) bakteri tutundurulmuş PSU nanoliflerinin fotoğrafları ve şematik gösterimi.....	16
Şekil 14. (a) sadece PS nanoliflerinin (b) sadece PSU nanoliflerinin (c) bakteri tutundurulmuş PS nanoliflerinin (d) bakteri tutundurulmuş PSU nanoliflerinin SEM görüntüleri.....	16
Şekil 15. (a) <i>Lysinibacillus</i> sp. NOSK bakterisin filogenetik ağacı ve (b) SEM görüntüsü.....	17
Şekil 16. SEM görüntüleri (a) sadece PSU nanolifleri (b) 24 saat inköbasyon (c) 7 gün inköbasyon (d) 15 gün inköbasyon.....	17

Şekil 17. Temas süresinin renk giderimine etkisi (20 mg/L MM, pH 7, T: 30 °C, karıştırma hızı: 100 rpm).....	18
Şekil 18. Temas süresinin (a) RB5 (b) RB221 boyalarının mikroalg/PSU-NF ile giderim verimine etkisi.....	19
Şekil 19. (a) pH değerleri (b) farklı sıcaklıklar (c) çalkalama/sabit koşullar (d) bakteri miktarının boya giderimi üzerine etkisi.....	21
Şekil 20. Bakteri immobilize edilmiş SA nanoliflerin 48 saat sonunda artan boya konsantrasyonlarının renk giderimine etkisi.....	22
Şekil 21. (a-i and a-ii) <i>A. eucrenophila</i> , (b-i and b-ii) <i>C. michiganensis</i> ve (c-i and c-ii) <i>P. aeruginosa</i> immobilize edilmiş nanoliflerin tekrar kullanılabilirlik testlerinden sonra SEM görüntüleri.....	23
Şekil 22. Mikroalg/PSU-NF kullanımı ile farklı boyar madde (a) RB5 ve (b) RB221 konsantrasyonlarının renk giderimine etkisi.....	24
Şekil 23. 14 gün renk giderim deneyi sonrasında mikroalg/PSU-NF SEM analizi (a-b) RB5 boyar maddesi düşük ve yüksek büyütme (c-d) RB221 boyar maddesi düşük ve yüksek büyütme.....	25
Şekil 24. 10 mg/L RB5 ve RB221 boyar madde konsantrasyonlarında tekrar kullanılabilirlik sonuçları.....	25
Şekil 25. Sadece PS ve PSU nanoliflerinin, sadece STB5 bakterisinin ve STB5 bakterisi immobilize edilmiş PS ve PSU nanoliflerin 72 saat sonunda 25 mg/L başlangıç Cr(VI) konsantrasyonundaki giderimi.....	26
Şekil 26. STB5/PS ve STB5/PSU biyokompozitlerinin yüzdesel olarak tekrar kullanılabilirlik ve saklanabilirlik testi sonuçları.....	27
Şekil 27. (a-b) STB5/PS ve (c-d) STB5/PSU biyokompozitlerinin tekrar kullanılabilirlik ve saklanabilirlik testlerinden sonra çekilen farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri.....	27
Şekil 28. Sadece PSU-NF ve bakteri/PSU-NF malzemelerin (a) RB5 ve (b) Cr(VI) kirleticilerinin giderimine tekli etkisi.....	29
Şekil 29. RB5 ve Cr(VI) gideriminde bakteri/PSU-NF örneklerinin tekrar kullanılabilirlik deney sonucu.....	29
Şekil 30. Tekrar kullanılabilirlik deneyleri sonrasında bakteri/PSU-NF yapılarının SEM görüntüleri (a) 5000 x büyütme (b-c) 20.000 x büyütme (d) 40.000 x büyütme.....	30
Şekil 31. Biyogiderim ve biyosorpsiyon mekanizmalarının RB5 ve Cr(VI) giderim verimlerinin karşılaştırılması.....	30
Şekil 32. Gözeneksiz SA (nSA) nanoliflerine ait temsili SEM görüntüsü.....	32

Şekil 33. (a) Elektrospin yöntemi ile nSA ve pSA nanoliflerinin elde edilmesinin şematik gösterimi (b) bakteri tutundurulmuş SA nanoliflerinin fotoğrafları ve şematik gösterimi.....	33
Şekil 34. Elektrospin yöntemi ile üretilmiş (a) nSA nanoliflerinin (b) pSA nanoliflerinin SEM görüntüleri.....	33
Şekil 35. (a) STB3 tutundurulmuş nSA nanoliflerinin (b) STB4 tutundurulmuş nSA nanoliflerinin (c) STB3 tutundurulmuş pSA nanoliflerinin (d) STB4 tutundurulmuş pSA nanoliflerinin SEM görüntüleri.....	34
Şekil 36. (a) STB3 tutundurulmuş nSA nanoliflerinin (b) STB3 tutundurulmuş pSA nanoliflerinin (c) STB4 tutundurulmuş nSA nanoliflerinin (d) STB4 tutundurulmuş pSA nanoliflerinin 21 günlük inkübasyon sonrasındaki SEM görüntüleri.....	35
Şekil 37. Sadece PS ve PSU nanoliflerinin, sadece STB5 bakterisinin ve STB5 bakterisi immobilize edilmiş PS ve PSU nanoliflerin 72 saat sonunda 25 mg/L başlangıç Cr(VI) konsantrasyonundaki giderimi.....	36
Şekil 38. STB3/pSA ve STB4/pSA biyokompozitlerinin tekrar kullanılabilirlik testi sonuçları.....	38
Şekil 39. (a-b) STB3 tutundurulmuş pSA nanoliflerinin (c-d) STB4 tutundurulmuş pSA nanoliflerinin tekrar kullanılabilirlik testi sonrasında çekilen farklı büyütmelelerdeki SEM mikrografları.....	38
Şekil 40. (a, e, i) Tuz ilave edilmemiş paralel morfolojideki PSU nanoliflerinin (b, f, j) tuz ilave edilmiş paralel morfolojideki PSU nanoliflerinin (c, g, k) tuz ilave edilmemiş rastgele morfolojideki PSU nanoliflerinin (d, h, l) tuz ilave edilmiş rastgele morfolojideki PSU nanoliflerinin SEM mikrografları. (a-d) grubu bakteri tutunmamış nanolifleri, (e-h) grubu 7 gün boyunca bakteri tutundurulmuş nanolif örneklerini, (i-l) grubu ise 21 gün boyunca bakteri tutundurulmuş nanolif örneklerine tekabül etmektedir. Tuz ilave edilmiş örneklerde lif çapının belirgin şekilde azaldığı görülmektedir.....	41
Şekil 41. (a) Paralel diziliimli PSU nanoliflerine, (b) tuz ilave edilmiş paralel diziliimli PSU nanoliflerine, (c) tuz ilave edilmemiş rastgele diziliimli PSU nanoliflerine, (d) tuz ilave edilmiş rastgele diziliimli PSU nanoliflerine 21 günlük bakteri tutunmasının ardından VCC yöntemi uygulanması sonucunda elde edilen bakteri miktarları.....	41
Şekil 42. Serbest haldeki STB1 bakterilerinin değişen konsantrasyonlarda (25, 50, 100 mg/L) metilen mavis (MB) veya amonyum (NH_4^+) giderim kapasiteleri (sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 150 rpm, inkübasyon süresi: 72 saat). Büyüme ortamında karbon kaynağı bulunmasına karşılık azot kaynağı bulunmadığı için metilen mavis giderim deneylerinde azot kaynağı olarak 50 mg/L sabit amonyum kullanılmıştır. Amonyum giderimi deneylerinde ise glukoz dışında ekstra bir karbon kaynağı kullanılmamıştır.....	43

Şekil 43. STB1/PSU nanoliflerinin 25 mg/L sabit metilen mavisi (MB) ve değişen konsantrasyonlarda amonyum (NH_4^+) içeren (25, 50, 100mg/L) büyüme ortamlarında, simültane amonyum ve metilen mavisi giderimi (sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 150 rpm, inkübasyon süresi: 72 saat).....	43
Şekil 44. Saf haldeki PSU nanoliflerinin metilen mavisi (MB) ve amonyum (NH_4^+) giderim verimleri (sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 150 rpm, inkübasyon süresi: 72 saat).....	44
Şekil 45. STB1/PSU nanoliflerinin 100 mg/L sabit amonyum konsantrasyonunda 5 seferlik tekrar kullanılabilirlik testi sonucu (Sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 150 rpm, inkübasyon süresi: 72 saat).....	44
Şekil 46. Üç farklı bakteri izolesinin (Eh: <i>Enterococcus hermanniensis</i> , Cm: <i>Clavibacter michiganensis</i> , Hv: <i>Halomonas variabilis</i>) iki farklı tekstil boyar maddesine karşı (SBBX: Setazol Blue BRF-X ve Setazol Turquoise Blue-G) 50 mg/L'lik başlangıç konsantrasyonlarında 48 saat içerisindeki boya giderim yüzdeleri.....	46
Şekil 47. (a) Saf haldeki PCL nanoliflerinin (b) saf haldeki PLA nanoliflerinin (c) 7 günlük inkübasyon sonrasında bakteri tutunmuş PCL nanoliflerinin (d) 7 günlük inkübasyon sonrasında bakteri tutunmuş PLA nanoliflerinin SEM görüntüleri.....	46
Şekil 48. Serbest haldeki <i>Clavibacter michiganensis</i> bakterilerinin, bakteri tutundurulmuş PCL ve bakteri tutundurulmuş PLA nanoliflerinin, ve saf haldeki PCL ve PLA nanoliflerinin 50, 100 ve 200 mg/L'lik başlangıç boyar madde konsantrasyonlarındaki giderim yüzdeleri (sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 150 rpm, inkübasyon süresi: 48 saat).....	47
Şekil 49. Bakteri tutundurulmuş PCL ve PLA nanoliflerinin 100 mg/L'lik başlangıç boyar madde konsantrasyonu için tekrar kullanılabilirlik testi sonucu (3. tekrardan itibaren giderim süresi 48 saatten 24 saate düşmüştür).....	48
Şekil 50. Bakteri tutundurulmuş PCL ve PLA örneklerinin tekrar kullanılabilirlik testinin öncesi ve sonrasındaki optik yoğunluk (OD_{600}) değerleri. Tekrar kullanılabilirlik testi sonrasında her iki örnek için de optik yoğunlukların bakteri artışına bağlı olarak arttığı görülmektedir.....	48
Şekil 51. Tekrar kullanılabilirlik testi sonrasında (a) bakteri tutundurulmuş PCL (b) bakteri tutundurulmuş PLA örneklerinin SEM mikrografları. Her iki örnekte de kuvvetli bakteri tutunması görülmektedir.....	48
Şekil 52. Bakteri içermeyen (a) PVA, (b) PEO ve (c) SD nanoliflerinin temsili SEM görüntüleri.....	51
Şekil 53. Bakteri enkapsüle edilmiş (a) PVA, (b) PEO ve (c) SD nanoliflerinin temsili SEM görüntüleri.....	51
Şekil 54. (a) Elektrosin yöntemi ile bakteri enkapsüle edilmiş PVA ve PEO nanoliflerinin eldesi, (b) enkapsüle edilmiş bakterilerin SEM görüntüsü ve şematik olarak gösterimi.....	52

Şekil 55. Bakteri enkapsüle edilmiş (a) PVA, (b) PEO nanoliflerinin florasın mikroskobu altındaki görüntüleri. Yeşil parlak noktacıklar canlı bakteri varlığına tekabül etmektedir....	52
Şekil 56. Yalnızca bakteri, bakteri-PVA ve bakteri-PEO karışımlarının LB büyüme ortamı içerisinde 18 saat 30°C ve 125 rpm'de büyütülmesi neticesinde elde edilen büyüme eğrileri.....	53
Şekil 57. Yalnızca PVA, bakteri-PVA, yalnızca PEO ve bakteri-PEO nanoliflerinin Raman spektrumları.....	54
Şekil 58. (a) Yalnızca bakteri, bakteri/PVA ve bakteri/PEO nanolif örneklerinin 10, 15, 25 mg/L konsantrasyonlarında 48 saat içerisindeki metilen mavisi giderimi, (b) yalnızca bakteri, yalnızca PVA nanolifi, yalnızca PEO nanolifi, bakteri/PVA ve bakteri/PEO nanolif örneklerinin 15 mg/L konsantrasyonunda 48 saat içerisindeki zamana göre metilen mavisi giderimi.....	55
Şekil 59. Ölü haldeki bakteri hücrelerinin 15 mg/L konsantrasyonunda 48 saat içindeki metilen mavisi giderimi.....	56
Şekil 60. Bakteri/PVA ve bakteri/PEO örneklerindeki bakteri miktarlarındaki değişimin (a) 4°C'de 3 ay boyunca, (b) 25°C'de 10 gün boyunca saklanması sürecinde elde edilmiş sonuçları.....	59
Şekil 61. (a) Elektrospin yöntemi ile SD liflerinin elde edilmesinin şematik gösterimi (b) bakteri enkapsüle edilmiş SD liflerinin şematik gösterimi.....	61
Şekil 62. <i>Lysinibacillus</i> sp. NOSK bakterisi SEM mikrografı.....	62
Şekil 63. Elektrospin yöntemi ile üretilmiş (a-b) saf haldeki SD nanoliflerinin, (c-d) %0,25 (w/v) oranında bakteri, (e-f) %0,5 (w/v) oranında bakteri, (g-h) %1 (w/v) oranında bakteri, (i-j) %2 (w/v) oranında bakteri içeren SD nanoliflerinin SEM mikrografıları.....	62
Şekil 64. <i>Lysinibacillus</i> sp. NOSK içeren SD çözeltisi ve SD nanoliflerinin 4 °C ve farklı depolama süreçlerinde canlı bakteri miktarlarının KOB/mL (cfu/mL) olarak analizi.....	63
Şekil 65. Bakterinin (a) enkapsülasyon öncesi öncesi (b-d) enkapsülasyon sonrası florasın mikroskobu görüntüleri.....	63
Şekil 66. (a) Saf haldeki SD nanoliflerinin (b) bakteri/SD nanoliflerinin Raman spektrumları. Yandaki fotoğraflardan görülebileceği üzere bakteri/SD örneklerinde spektrum boncuk yapısı üzerine odaklanarak elde edilmiştir.....	64
Şekil 67. Bakterinin 10 mg/L konsantrasyonunda Ni(II) giderimine pH etkisinin belirlenmesi (Sıcaklık: 30 °C; çalkalama hızı: 100 rpm).....	65
Şekil 68. Sadece bakteri ve SD ile inoküle edilmiş bakterilerin 30 °C'de 24 saat inkübasyonu sonrasında ölçülen optik yoğunluk değerleri.....	65

Şekil 69. Sadece bakteri, bakteri enkapsüle edilmiş ve 1 gün boyunca 4 °C'de depolanmış SD nanolifi, bakteri enkapsüle edilmiş ve 7 gün boyunca 4 °C'de depolanmış SD nanolifi örneklerinin (a) Ni(II) (b) Cr(VI) ve (c) Reactive Black 5 kirleticileri üzerinde farklı konsantrasyonlardaki giderim verimleri (Sıcaklık: 30 °C; çalkalama hızı: 100 rpm).....	66
Şekil 70. Bakteri enkapsüle edilmiş PVA nanoliflerinin farklı bölgelerden alınmış floresan mikroskobu görüntüleri (a-b). Parlak yeşil floresan ışması canlı bakteri varlığına tekabül etmektedir.....	70
Şekil 71. Bakteri enkapsüle edilmiş PVA nanoliflerinin SEM görüntüsü. Şişkin top benzeri yapılar bakteri enkapsülasyonuna işaret etmektedir.....	71
Şekil 72. Yalnızca bakteri (<i>Halomonas variabilis</i>) ve bakteri enkapsüle edilmiş PVA nanolif örneklerinin metilen mavisi giderim yüzdeleri (sıcaklık 30°C, çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon süresi: 48 saat).....	71

ÖZET

Elektrospın yöntemi, değişik polimerlerden, polimer karışımlarından, inorganik malzemelerden, supramoleküler yapılardan ve kompozitlerden nanolif/nanoağ elde edilen, kolay ve maliyeti düşük bir üretim tekniğidir. Üstün özelliklere, birçok işleve sahip olan ve fiziksel/kimyasal yollarla modifiye edilebilen bu nanolifler özellikle membran/filtre uygulamalarında yüksek kullanım potansiyeline sahiptirler.

Günümüzde biyoteknoloji alanındaki gelişmeler sayesinde ağır metal, tekstil boyar maddesi ve deterjan kirleticilerini içeren atık sularda üreyebilen ve bu kirleticilere karşı direnci fazla olan bakterilerin bahsedilen kirleticilerin gideriminde kullanılabildikleri bilinmektedir. Bakterilerden daha verimli bir şekilde yararlanmak ve daha kullanışlı hale getirebilmek için, taşıyıcı bir malzeme ile entegre ederek kullanmak oldukça yeni ve özgün bir yaklaşımdır. Nanoboyutta kompozit yapıların geliştirilmesine olanak sağlayan elektrospın tekniğı ve bu teknik kullanılarak elde edilen nanolif yapıları, farklı amaçlarla kullanılabilecek bakterilerin immobilizasyonu/enkapsülasyonu için oldukça elverişli malzemelerdir.

Proje çalışması kapsamında, elektrospın yönetimi ile üretilen nanoliflere, ağır metal, tekstil boyar maddesi ve deterjan giderimi yapabilen bakterilerin immobilizasyon/enkapsülasyon teknikleri kullanılarak entegrasyonu sağlanarak elde edilen biyokompozit malzemelerin atık su arıtımındaki potansiyelleri araştırılmıştır. Bu projede ağır metal, tekstil boyar maddesi ve deterjan giderim özelliğı gösteren bakterilerin nanoliflerle entegrasyonu üç farklı yaklaşımla gerçekleştirilmiştir. Birinci yaklaşımda, homojen morfolojide elde edilen selüloz asetat (SA), polisülfon (PSU), polikaprolakton (PCL), polilaktikasit (PLA) ve polistiren (PS) nanoliflerinin yüzeyine fiziksel yollarla bakteriler immobilize edilmiştir. Nanolif/nanoağ morfoloji veya dizilimdeki değişikliklerin bakteri tutunmasında neden olabileceğı farklılıkları incelemek açısından, nanoliflerin bir kısmının gözenekli, paralel diziliimli ve farklı çaplara sahip halleri de üretilerek etkileri araştırılmıştır. İkinci yaklaşımda ise, polivinilalkol (PVA), polietilenoksit (PEO) polimerleri ile siklodekstrin (CD) molekülleri kullanılarak, bakterilerin nanolif yapılarına eş zamanlı enkapsülasyonu sağlanmıştır. Üçüncü yaklaşımda ise, bakterilerin polimer yapısına direkt entegrasyonu sırasında çıkabilecek kayıpları azaltmak amacıyla eş merkezli hizalanmış iki iğnenin kullanıldığı koaksiyal elektrospın sistemi kullanılarak, çekirdek-kabuk yapısında nanolifler üretilmiştir. Daha sonra, tüm bu yöntemlerle üretilen biyokompozit malzemelerin, entegre edilen bakterinin özelliğine göre endüstriyel atık su arıtımındaki kullanım potansiyelleri değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: elektrospın, nanolif, bakteri, ağır metal, tekstil boyar maddesi, deterjan, biyokompozit, biyoremediasyon, immobilizasyon, enkapsülasyon

ABSTRACT

Electrospinning is an easy and economical production technique to produce nanofiber/nanofibrous webs from different polymers, polymer mixtures, inorganic materials, supramolecular structures and composite materials. Since these nanofibers have superior properties, various functions and can be modified by physical/chemical methods, they have a great potential to be applied in membrane/filter applications.

Today by the developments in the biotechnology field, it is known that bacteria that have tolerance for heavy metals, textile dyes and detergents can grow in wastewater that contain aforementioned wastes by remediating them at the same time. Integration of bacteria with a carrier material is an original and novel approach to use them more efficiently and more practical. Since, electrospinning technique allows developments of nanoscale composites, electrospun nanofibers are very suitable materials for immobilization/encapsulation of different kinds of bacteria.

In this project, specific kinds of bacteria (that can remediate heavy metals, textile dyes and detergents) were integrated with electrospun nanofibers by using immobilization/encapsulation techniques and the potential of these biocomposites for the treatment of wastewater systems was evaluated. The integration of bacteria that can remediate heavy metal, textile dyes and detergent with electrospun nanofibers was achieved by three different approaches in this project. In the first approach, bacterial cells were physically immobilized on cellulose acetate (CA), polysulfone (PSU), polycaprolacton (PCL), polylactic acid (PLA) and polystyrene (PS) nanofibers which were obtained with homogenous morphology. In order to observe effects of nanofiber/nanofibrous web morphology and arrangements on the immobilization of bacteria, these nanofibers were produced as porous, parallelly arranged, and with different diameters. In the second approach, by using polyvinylalcohol (PVA) and polyethyleneoxide (PEO) polymers and cyclodextrin (CD) molecules, simultaneous encapsulation of bacteria in nanofiber structures was achieved. In the third and last approach, in order to reduce the losses related with bacterial integration on polymer structures, core-shell structured nanofibers were produced by using coaxial electrospinning system in which concentrically aligned needles are used. Afterwards, all these different kinds of biocomposites were evaluated for their remediation potentials in accordance with the intended use of the integrated bacteria.

Keywords: electrospinning, nanofiber, bacteria, heavy metal, textile dye, detergent, biocomposite, bioremediation, immobilization, encapsulation

1.GİRİŞ

Elektrospın yöntemi, nanolif üretimi için yaygın olarak kullanılan kolay ve ucuz bir yöntemdir. Bu yöntem yardımıyla polimerlerden, polimer karışımlarından, polimer/inorganik malzemelerden ve kompozitlerden nanolif/nanoağ yapılar elde edilebilmektedir. Bu nanoliflerin çok yüksek yüzey alanları ve nano boyutta gözenekli yapıları bulunmaktadır. Bu üstün özellikleri sayesinde, nanoliflerin biyoteknoloji, tekstil, kompozit, sensör, doku iskelesi, ve güneş pilleri gibi birçok uygulama alanında kullanımı vardır. Ayrıca, elektrospın yöntemi ile elde edilen nanoliflerin membran/filtre teknolojisi, sanayi atıklarının temizlenmesi, nanoparçacıkların tutulması, moleküler filtrasyon gibi çeşitli uygulama alanları bulunmaktadır. Elektrospın yöntemi ile elde edilen nanolifler çeşitli yollarla fonksiyonelleştirilerek, fonksiyonel nanolif/nanoağ yapıları haline getirilebilmektedir. Örneğin, nanoliflerin biyolojik malzemelerle (bakteri, enzim vb.) fonksiyonlaştırılması oldukça ilginç olup, hem nanoliflerin hem de entegre edilen biyolojik malzemelerin üstün özelliklerini taşıyan çok daha etkili malzemelerin geliştirilmesi mümkündür.

Biyogiderim yöntemi sudaki kirleticilerin temizlenmesi amacıyla uygulanan yaygın bir tekniktir ve çeşitli türdeki bakteriler sucul sistemlerde biyogiderim yapması amacıyla kullanılmaktadır. Biyoentegre sistemlerin biyogiderim amacıyla kullanımı alternatif bir yaklaşım olup, daha yüksek başarı, uygulama kolaylığı ve tekrar kullanılabilirlik sağlayabilmektedir. Elektrospın edilmiş nanolifler bakteriler için uygun bir tutunma ortamı olabilir, zira elektrospın yöntemi nano/mikro düzeyde kompozit malzemelerin ayarlanabilir fiziksel ve kimyasal özelliklerde üretilmesine olanak sağlamaktadır.

Projede, elektrospın yöntemi ile üretilen nanoliflere, biyogiderim özelliği bulunan bakterilerin immobilizasyon/enkapsülasyon teknikleri kullanılarak entegrasyonu ve elde edilen biyokompozit malzemelerin atık su arıtımındaki potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır. Ağır metal, tekstil boyar maddesi ve deterjan giderim özelliği gösteren bakterilerin nanoliflerle entegrasyonu üç farklı yaklaşımla gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, homojen bir morfolojide elde edilen selüloz asetat (SA), polisülfon (PSU), polistiren (PS), polikaprolakton (PCL) ve polilaktikasit (PLA) nanoliflerinin yüzeyine fiziksel yollarla bakteriler tutundurularak fonksiyonel biyokompozit malzemeler elde edilmiştir. İlâveten, morfoloji veya dizilimdeki değişikliklerin bakteri tutunmasında neden olabileceği farklılıkları incelemek açısından, bu nanoliflerin, gözenekli, paralel diziliimli ve farklı çaplara sahip halleri üretilerek, bu farklılıkların bakteri tutunması üzerindeki etkileri incelenmiştir. İkinci yaklaşımda, polivinilalkol (PVA) ve polietilenoksit (PEO) polimerleri kullanılarak, bakterilerin eş zamanlı nanolif yapılarına enkapsülasyonu sağlanmış ve bakteri enkapsüle edilmiş fonksiyonel nanolif yapıları elde

edilmiştir. Üçüncü yaklaşımda ise, PVA polimeri kullanılarak, bakterilerin polimer yapısına direkt entegrasyonu sırasında çıkabilecek kayıpları azaltmak amacıyla eş merkezli hizalanmış iki iğnenin kullanıldığı koaksiyal elektrospin sistemi ile çekirdek-kabuk yapısında bakteri enkapsüle edilmiş fonksiyonel nanolifler elde edilmiştir. Son aşamada, bu yöntemlerle üretilen tüm biyokompozit malzemelerin entegre edilen bakterinin giderim özelliğine göre endüstriyel atık su arıtımındaki kullanım potansiyelleri test edilmiş, ayrıca tekrar kullanılabilirlik ve saklanabilirlik gibi diğer özellikleri de değerlendirilmiştir.

Özetle, elde ettiğimiz bulgular neticesinde, atık su arıtımında kullanılabilen farklı bakterilerin, yüksek yüzey alanına ve gözenekli bir yapıya sahip olan nanolifler ile entegrasyonları, bakterilerin daha verimli ve kolay bir şekilde kullanımına ve yeni biyokompozit malzemelerin üretimi ve geliştirilmesine büyük katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bu proje ile üretimi gerçekleştirilen bakteri elde edilmiş fonksiyonel nanolif yapıları yeni filtrasyon malzemelerinin geliştirilmesine öncülük edebilir. Özgün değerleri sayesinde çalışmalarımız uluslararası (SCI) dergilerde yayınlanmaktadır.

2.LİTERATÜR ÖZETİ

Çevre kirliliği ilk defa kentsel yaşamın başlaması sonucu ortaya çıkmış ve endüstriyel gelişmeye paralel olarak da artmıştır. Özellikle yirminci yüzyılın ikinci yarısında, nüfus artışıdaki hızlanmaya bağlı olarak artan çevre kirliliği, yaşam kaynaklarının daha fazla kirlenmesine neden olmuş ve sonuçta ekosistemin bozulması giderek çok daha ciddi bir hal almıştır.

Ekosistemin bir bölümünü oluşturan su ortamı, kullanılmış sular ve diğer atıklar için alıcı ve uzaklaştırıcı bölge olarak kullanıldığında, ekosistem içinde hava ve toprağa oranla en yoğun kirlenmeye uğrayan kısım halini almıştır. Sudaki kirliliğe yol açan maddelere örnek olarak ağır metaller, tekstil boyar maddeleri ve deterjanlar (yüzey aktif maddeler) verilebilir (Bolong vd., 2009; Forrez vd., 2009). Boyalar, genel olarak karmaşık moleküler yapıları olan, yüksek molekül ağırlıklı, sentetik ve organik bileşiklerdir. Kimyasal yapıları itibari ile ısıya, suya ve birçok kimyasala direnç gösterebilmelerinden ve kompleks sentetik yapılarından dolayı dekolorizasyonları oldukça zordur. Tekstil endüstrisinde en büyük kullanım alanını reaktif ve azo boya türevleri oluşturmaktadır. Atık suya bakıldığında saptanabilen ilk kontaminant renktir. Bu renklenme fotosentez yapan sucul canlıların ışığı kullanmalarını önlemekte ve böylece bu canlılar besinlerini üretememektedir. Ayrıca yapılarındaki ağır metal ve kloridler nedeni ile bu boyalar sucul canlılar için toksik etki göstermektedir. Çeşitli endüstrilerden

gelen atık suların içinde bulunan ağır metaller de su ve toprak kirliliğinin başlıca nedenlerindendir. Zehirleyici özelliklerine rağmen ağır metaller taşıdıkları teknolojik önem nedeni ile endüstride geniş ölçüde kullanılırlar. Proje çalışması kapsamında araştırılmak istenen Krom(VI); biyolojik sistemlerde bulunan en toksik ve mutajenik metal iyonudur. Diğer kirleticiler arasında deterjanlar ise esas maddesi yüzey aktif maddeler (surfactant) olan kayganlaştırıcı özelliğe sahip ve temizlik amaçlı kullanılan kimyasallardır. Temizlik ürünleri tüketiminde Türkiye ortalaması kişi başına yıllık 7 -7.5 kg aralığındadır ve bunun yaklaşık 3.5 kg'ı deterjan ve 3.5 kg'ı sabundur (Yılmaz vd., 2006). Avrupa ülkelerinde ise tüketim biraz daha fazladır, bu miktar yıllık 20-25 kg aralığında olup bu kullanımın yaklaşık olarak %70'i deterjan, %30'u ise sabundur (Yılmaz vd., 2006). Bunun yanı sıra, deterjanlar, sanayide farklı amaçlarla da kullanılmaktadır. Bazı cam maddelerin üretiminde deterjanlar hem temizleyici hem de kesim işlemlerini kolaylaştırmak için kayganlaştırıcı madde olarak kullanılabilir (Ispir vd., 2006). Bu atıklar yeterince arıtılmadığında hem yoğun köpüğe neden olmakta, hem de karıştığı sulardaki sucul canlıların yaşamını tehdit etmektedir. Deterjanlar da diğer kimyasal atıklar gibi atık su arıtma tesislerinde arıtılmaktadır. Ancak ne yazık ki bazen klasik yöntemler yeterli olmamaktadır. Bu atıklar yeterince arıtılmadığında hem yoğun köpüğe neden olmakta, hem de karıştığı sulardaki sucul canlıların yaşamını tehdit etmektedir. Bu yüzden 1987 yılından itibaren biyobozunumu daha kolay olan LAS (lineer alkil sülfonat) içeren deterjanlar kullanılmaya başlanmıştır (Berna, 2007). LAS içeren deterjanlar kullanılmaya başlandıktan sonra atık sulardaki deterjan miktarında önemli ölçüde azalmalar meydana gelmiştir (Pagga, 1993). Ancak yine de bu miktar istenilen düzeylere indirilemediği için daha etkili yöntemler geliştirilmiştir. Özellikle deterjanların biyobozumunda spesifik bakterilerin kullanımı (biyoremediasyon) önemli bir gelişmedir. Bu amaçla kullanılan çeşitli firmaların ticari ürünleri de vardır. Deterjanların biyolojik olarak arıtılması amacıyla çeşitli bakteriler kullanılabilir (Gibson, 1984).

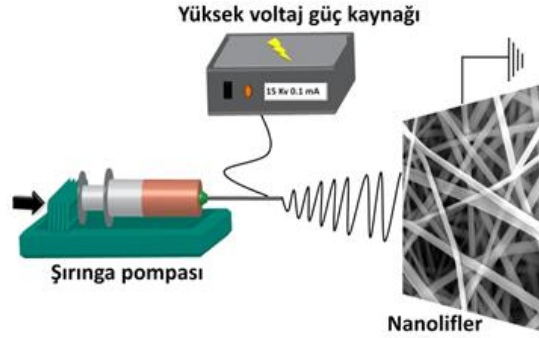
Su kirliliğinin limit değerlerin altına indirilememesi sonucu hem ikincil arıtım ünitelerinin performansı zarar görmekte, hem alıcı ortamdaki sucul canlıların hayatı tehlikeye girmekte, hem de köpürme ve renk gibi nedenlerden dolayı estetik açıdan problemler açığa çıkmaktadır (Birgül ve Akal-Solmaz, 2007). Bu nedenle atık sulardaki zararlı maddelerin arıtılması çok büyük önem taşımaktadır. Atık suların arıtımında kullanılan klasik yöntemler; kimyasal çöktürme, iyon değişimi, ozonlama, koagülasyon-flokülasyon, adsorpsiyon vb. (Birgül ve Akal-Solmaz, 2007) teknikleri olarak sıralanabilmektedir. Ancak bu teknikler, yüksek kimyasal donanım giderleri ve arıtma veriminin düşük olması nedeniyle pratik ve ekonomik olmaktan uzaktır. Kimyasal yöntemlerle, çöktürülen ağır metal iyonlarının geri kazanımı mümkün olmayıp, oluşan çamur ise başlı başına bir kirlilik unsurudur. Bu nedenle

yeni, ucuz, yenilenebilir ve alternatif materyal ve yöntem araştırma ve geliştirme çalışmaları önem kazanmıştır.

Günümüzde biyoteknoloji alanındaki gelişmeler sayesinde ağır metal, tekstil boyar maddesi ve deterjan kirleticilerini içeren atık sularda üreyebilen ve bu kirleticilere karşı direnci fazla olan bakterilerin, bahsedilen kirleticilerin gideriminde kullanılabileceği bilinmektedir. Bu bakterilerden daha verimli bir şekilde yararlanma ve onları daha kullanışlı hale getirebilmek için, taşıyıcı bir malzeme ile birleştirmek oldukça yeni ve özgün bir yaklaşımdır. Nanoteknoloji alanında yaşanan gelişmelerle nanoboyutta kompozit malzemelerin geliştirilmesi mümkün olmaktadır. Elektrospin yöntemi ile elde edilen nanolif yapıları bu tarz malzemelerin en önemlilerindendir.

Elektrospin tekniği (electrospinning), uygulama kolaylığı ve düşük maliyeti sayesinde özellikle son yıllarda önem kazanan ve kullanımı yaygınlaşan nanolif/nanoağ üretim yöntemidir. Standart bir elektrospin aparatı çok basit olup, şırınga pompası, yüksek voltaj kapasiteli güç kaynağı (0-40kV) ve topraklanmış toplayıcı olmak üzere üç temel parçadan oluşmaktadır (Şekil 1). Bu yöntemde, metalik iğneli şırınga içerisine konulan ve genel olarak polimer kullanılarak hazırlanmış çözelti ile belirli bir uzaklıkta bulunan metal elektrot arasında uygulanan yüksek voltaj sayesinde, çapları nano boyutta (50 nm-500 nm) olan lifler elde edilebilmektedir (Greiner ve Wendorff, 2007; Ramakrishna vd., 2005; Wendorff vd., 2012). Elektrospin tekniği ile birçok polimerin yanı sıra, bu polimerlerin karışımları, inorganik malzemeler, supramoleküler yapılar ve kompozitler kullanılarak da nanolif/nanoağ yapıları elde etmek mümkündür (Agarwal ve Greiner, 2011; Celebioglu ve Uyar, 2010; 2012; 2013a; 2013b; Greiner ve Wendorff, 2007; Li ve Xia, 2004). Bu metot ile üretilen nanolif/nanoağ yapıları malzemeler, yüksek yüzey alanları ve nano boyuttaki gözenekli (boşluklu) yapıları sayesinde sıra dışı fiziksel özellikler göstermektedirler. Ayrıca bu nanolifler, fiziksel/kimyasal yollarla yüzeylerinin modifiye edilebilmesi ve çeşitli aktif maddeler ile fonksiyonlaştırılabilmesi sayesinde çok daha işlevli bir hale getirilebilmektedirler (Agarwal vd., 2010; Ramakrishna vd., 2005; Wendorff vd., 2012). Üstün özelliklere ve birçok işleve sahip olan bu nanolifler, membran/filtre teknolojisinde (sanayi ve nükleer atıkların temizlenmesi, nanoparçacıkların tutuklanması (enkapsülasyonu), moleküler filtrasyon işlemleri), tekstilde (katkı maddelerinin (antibakteriyal, koku, boya, alev geciktiriciler,vb) kolayca eklenmesi ve sabitleştirilmesi), biyoteknolojide (doku mühendisliği (scaffolds), biosensör, gen/protein/enzim immobilizasyonu, kontrollü ilaç salımı), enerji alanında (güneş pilleri, yakıt pilleri) ve bunun gibi bir çok önemli sanayi dalında uygulama potansiyeline sahiptir (Barhate ve Ramakrishna, 2007; Greiner ve Wendorff, 2007; Li ve Xia, 2004; Pham vd., 2006; Ramakrishna vd., 2005; 2006; Sahay vd., 2012; Wendorff vd., 2012; Xie vd., 2008;

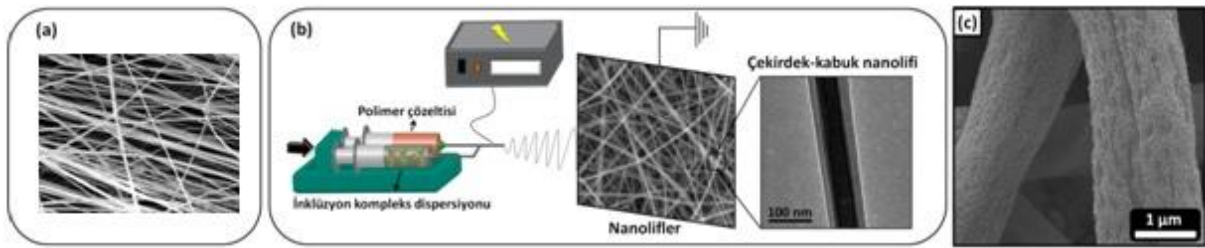
2010). Son yıllarda yapılan çalışmalarda elektrospin ile üretilen bu nanolif/nanoağ yapılı malzemelerin özellikle filtrasyon alanında kullanımının oldukça uygun olduğu kanıtlanmıştır (Greiner ve Wendorff, 2007; Ramakrishna vd., 2005; 2006; Wendorff vd., 2012; Yoon vd., 2008). Hatta, konvansiyonel membran sistemlerinden daha üstün özelliklere sahip olduklarını gösteren çalışmalar da literatürde mevcuttur (Cooper vd., 2013; Huang vd., 2013; Li vd., 2013; Mahanta ve Valiyaveetil, 2013).



Şekil 1. Elektrospin düzeneği ve nanolif üretimi.

Elektrospin düzeneğinin en basit hali Şekil 1'de gösterildiği gibidir ve yaygın olarak kullanılmaktadır. Diğer taraftan, bu prosesi daha iyi kontrol edebilmek ve elde edilen nanolif yapılarını çeşitlendirebilmek için, elektrospin düzeneği farklı şekillerde modifiye edilebilmektedir. Örneğin, birbirine paralel olarak hizalanmış nanoliflerin üretimi, yüksek hızda dönen silindirik bir tanburun toplayıcı olarak kullanıldığı sistemlerde mümkündür. Şekil 2a'da paralel hizalanmış polyetilenoksit (PEO) nanoliflerinin SEM görüntüleri verilmektedir. Diğer bir modifikasyon alternatifi ise, eş merkezli hizalanmış iki iğnenin kullanıldığı koaksiyal (coaxial) elektrospin sistemleridir (Şekil 2b). Bu yöntemde, iç içe geçmiş iğnelerden farklı polimer çözeltileri ya da aktif madde içerikli sistemler geçirilerek çekirdek-kabuk (core-shell) yapısında nanolifler elde edilmektedir. Şekil 2b, içi siklodekstrin (CD) inklüzyon kompleks dispersiyonu, dışı ise biyo-uyumlu bir polimer çözeltisinden oluşan çekirdek-kabuk nanolifinin TEM görüntüsüdür. Elektrospin sisteminde yapılabilen bu modifikasyonlar, üretilen nanoliflerin kullanım alanlarının gelişmesini ve daha spesifik amaçlar için uygulanabilirliğini arttırabilmektedir. Nanoliflerin belirli yöne oryante olması ile üretilen, paralel hizalı nanoağ yapıları, canlı hücrelerin istenilen yönde büyümesini sağlayabileceği için doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır (Greiner ve Wendorff, 2007). Koaksiyal elektrospin tekniğinde ise, nanoliflerin fonksiyonlaştırılmasında kullanılan aktif maddelerin (ilaç, antibakteriyel, antioksidant, protein, enzim, virus ve bakteri) ayrı bir sıvı ortamdan geçmesi sağlanarak (çoğunlukla çekirdek kısmı) fonksiyonlukları muhafaza edilebilmekte ve daha uzun süre etki gösterebilmektedirler (Greiner ve Wendorff, 2007). Elektrospin düzeneğindeki

modifikasyonlara ek olarak, çözücü sistemlerinde farklı karışımların kullanılması ya da nanolifler elde edildikten sonra, ard işlem yapılması ile de nanolif morfolojileri farklılaştırılabilmektedir (Şekil 2c) (Celebioglu ve Uyar, 2011). Gözenekli nanolifler, bu şekilde elde edilen nanoliflere örnek olarak gösterilebilmektedir. Elektrospın ile üretilen nanoağ malzemeler gözenekli bir yapıya sahiptirler ve çeşitli işlemlerle pürüzsüz olan nanolif yüzeyinin gözenekli hale getirilmesi ile de gözeneklilik daha küçük boyutlara indirgenerek oranı yükseltilebilmektedir. Yüksek gözenekliliğe sahip olan bu nanoliflerin yüzey alanlarının da daha yüksek olması, farklı kullanım amaçları (filtrasyon, kataliz, enerji, doku mühendisliği vb.) için uygunluklarını arttırmakta ve geliştirebilmektedir.



Şekil 2. (a) Paralel dizimli nanoliflerin SEM görüntüsü. (b) Koaksiyel elektrospon tekniği ile çekirdek-kabuk nanoliflerinin üretimi ve temsili TEM görüntüsü. (c) Gözenekli SA nanoliflerinin SEM görüntüsü.

Daha önceden de belirtildiği gibi, elektrospon ile üretilen nanolifler atık suların filtrasyonu (detoksifikasyon, renksizleştirme, saflaştırma/ayırıştırma vb.) için uygun malzemelerdir ve bu nanoliflerin, farklı şekillerde modifiye edilmesinin, çevresel uygulamalardaki uygunluğunu arttırabileceği düşünülmektedir. Morfolojide meydana getirilen değişikliklerin yanı sıra, elektrospon edilen nanoliflerin çeşitli moleküller veya mikroorganizmalar ile fonksiyonlaştırılmaları da, nanoağ yapılı bu malzemelerin filtrasyon amacıyla kullanılmalarını geliştirebilmektedir. Örneğin, nanoliflerin siklodekstrin (CD) olarak bilinen ve yapısındaki kavite ile birçok organik molekülü tutma (inklüzyon kompleks) özelliğine sahip supramoleküler yapılar ile fonksiyonlaştırılmaları oldukça ilginç olup, hem CD'lerin hem de nanoliflerin üstün özelliklerini taşıyan, çok daha etkili membranların üretilmesine olanak sağlamaktadır (Kayaci vd., 2013; Uyar vd., 2009; 2010).

Proje çalışmamızda çıkış noktamızı oluşturan yaklaşımlar ise;

1. Mikroorganizmaların atık su arıtımında kullanılmaları
2. Nanolif yapılarının filtrasyon/membran sektöründe kullanılabilmeleri (zararlı atıkların tutuklanması ve ortamdan uzaklaştırılması, ayırıştırma, saflaştırma, moleküler

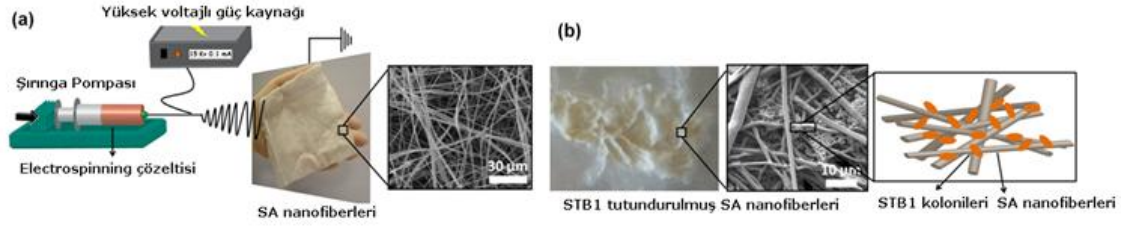
tanımlama/seçicilik, moleküler enkasulasyon) (Aoki ve Nishikawa, 2003; Olah vd., 1988; Xiao ve Chung, 2007) ve mikroorganizmaların (bakteri, virüs, alg vb.) entegrasyonu için oldukça uygun bir taşıyıcı malzeme olmaları.

3. Biyoremediasyon amacıyla kullanılan mikroorganizmaların çeşitli katı yüzeylere tutundurulması ile biyokompozit malzeme eldesi (Eroglu vd., 2012; Liu vd., 2012; Sarioglu vd., 2013; Tuttolomondo vd., 2014).

Mikroorganizmaların elektrospin edilmiş nanolifler ile entegre edilmesine ilişkin öncü çalışmalar literatürde mevcuttur. Mikroorganizmaların nanolifler ile birleştirilmesi, nanolif yapısına direkt enkasülasyon (Amna vd., 2013; Fung vd., 2011; Gensheimer vd., 2007; Raveendran vd., 2013; Salalha vd., 2006; Tong vd., 2013; Vajdai vd., 2012), çekirdek-kabuk nanolif yapısına enkasülasyon (Klein vd., 2009; 2012; Korehei and Kadla, 2014; Lopez-Rubio vd., 2009) ve kimyasal/fiziksel yollarla nanolif yüzeyine immobilizasyon (Eroğlu vd., 2012; Li vd., 2011a; 2011b; Sakai vd., 2010) şeklinde yapılmaktadır. Literatürdeki çalışmaların çoğu, entegre edilen mikroorganizmaların nanolif bünyesindeki yaşama ve yayılmalarına ilişkin değerlendirme ve araştırmaları kapsamaktadır. Uygulamaya yönelik çalışmaların sayısı ise oldukça azdır.

Elektrospin edilmiş nanoliflerin mikroorganizmaların tutunması için aktif karbon ve kağıt disk gibi diğer ortamlara göre birçok avantajı bulunmaktadır. Mesela yüksek yüzey alanı, gözeneklilik ve biyouyumluluk gibi özellikler bu malzemelerin mikroorganizmaların tutunması için ideal ortamlar olmasını sağlamaktadır. Bunun yanı sıra nanoliflerin farklı karışımlar halinde hazırlanması, istenilen fiziksel/kimyasal özelliklere ve morfojiye göre üretilebilmesi, farklı türde mikroorganizmaların tutunmasına da olanak sağlayabilir. Proje kapsamında gerçekleştirdiğimiz öncü çalışmamızda, elektrospin edilmiş selüloz asetat (SA) nanolifleri yüzeyine amonyum giderici bir bakteri immobilize edilmiş ve elde edilen malzeme amonyum gideriminde oldukça başarılı olmuştur. Ayrıca, literatürde örnekleri olan ve serbest halde giderim yapan bakterilere göre ürettiğimiz bu biyokompozit malzemenin kullanılması daha avantajlı olmuştur (Sarioglu vd., 2013) (Şekil 3). Daha az hacim ihtiyacı, taşıma ve uygulama kolaylığı, kuvvetli biyofilm oluşumu ve potansiyel tekrar kullanılabilirlik, elde edilen biyokompozit malzemenin başlıca avantajlarıdır. Ayrıca taşıma kolaylığı ve tekrar kullanılabilirlik gibi özellikler genel manada malzemenin maliyetini düşürmekte ve ekonomik yönden de avantaj sağlamaktadır. Nanolif yüzeyinde oluşan kuvvetli biyofilm yapılar ise serbest haldeki bakterilere göre büyük avantajlar getirmektedir. Bu avantajların başlıcaları: yüksek sıcaklık ve tuzluluk gibi ekstrem çevre koşullarına karşı daha dayanıklı olma ve artan metabolik aktivitedir. Doğal tutunma yöntemi ile immobilize edilen bakteriler, kuvvetli biyofilm yapılarının oluşumuna, maksimum hücre tutunmasına ve maksimum biyokimyasal aktiviteye

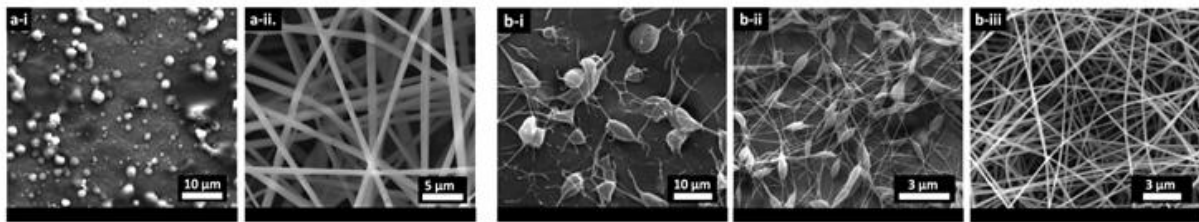
imkân sağladığı için bahsi geçen çalışmamızda kimyasal tutturma yöntemlerine göre daha etkilidir.



Şekil 3. (a) SA nanoliflerinin üretiminin şematik olarak gösterimi. (b) STB1 bakterileri tutundurulmuş SA nanoliflerin şematik olarak gösterimi.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Elektrospin tekniği ile, boncuksuz (bead-free), düzgün yapıda ve çapları nano boyutta lif elde etmek için birçok parametrenin düzenlenmesi gerekmektedir. Polimerik olan sistemler için bu parametreler, polimerin cinsi/moleküler ağırlığı, çözücünün çeşidi, çözeltinin vizkositesi, çözeltinin iletkenliği, buna ek olarak elektrospin aparatında uygulanan voltaj, liflerin toplanma mesafesi, polimer solüsyonunun akma hızı, şırınga ucunun çapı (nozzle) şeklinde sıralanabilmektedir. Şekil 4a'da elektrospin ile üretilen selüloz asetat (SA) nanolifleri için kullanılan çözücünün etkisi örnek olarak verilmiştir. Dimetilasetamit (DMAc)\metanol (4\1 v\lv) çözelti karışımında hazırlanan SA çözeltisi elektrospin edilince boncuksu yapılar elde edilirken, karışımda DMAc yerine aynı oranlarda diklorometan (DCM) kullanıldığında ortaya boncuksuz yapıda (bead-free) düzgün lifler çıkmıştır. Şekil 4b'de ise polietilen oksit (PEO) nanolifleri için polimer çözeltisinin konsantrasyon etkisi gösterilmektedir. Kısaca, düzgün ve boncuksuz bir yapıda nanolif elde etmek için, yukarıda bahsedilen bütün parametrelerin optimize edilmesi gerekmektedir.



Şekil 4. (a-i) 4\1 (v\lv) DMAc\metanol (a-ii) 4\1 (v\lv) DCM\metanol çözelti karışımlarında 10% SA (w\lv) konsantrasyonu kullanılarak, elektrospin prosesi sonucu elde edilen boncuksu yapıların ve nanoliflerin SEM görüntüleri. Değişik çözelti konsantrasyonlarında elde edilen PEO nanoliflerinin SEM görüntüleri (b-i) %1, (b-ii) %2, (b-iii) %3,5.

Proje çalışması kapsamında, elektrospin yönetimi ile nanolif üretme konusunda elde ettiğimiz tecrübelerimizden yararlanarak, ağır metal, tekstil boyar maddesi ve deterjan giderimi yapabilen bakteriler çeşitli şekillerde, farklı morfoloji ve dizilime sahip olan nanoliflere immobilize veya enkapsüle edilmiş, daha sonra elde edilen biyokompozit malzemelerin atık suların arıtılmasındaki kullanım potansiyelleri araştırılmıştır. Nanolifler ile bakterilerin entegrasyonunda üç ana yaklaşım benimsenmiştir. Bu yöntemlerin ayrıntılı açıklaması aşağıdaki gibidir:

1. Yaklaşım: Bakterilerin elektrospin edilmiş nanolif yüzeyine immobilizasyonu ve bu nanoliflerin atık su arıtımda kullanılması

- Bu yaklaşımda ilk olarak, homojen ve boncuksuz yapıda nanoliflerin üretebilmesi için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Selüloz asetat (SA), polisülfon (PSU), polikaprolakton (PCL), polilaktikasit (PLA) ve polistiren (PS) polimerlerinin kullanıldığı bu çalışmada, her bir polimer çeşidi için, uygun çözgen, konsantrasyon ve elektrospin parametreleri belirlenmiştir. Nanolifler ile bakteri immobilize edilmiş nanoliflerin morfolojileri, bakteri yayılımı ve biyofilm oluşumunu gözlemlemek için SEM analizi uygulanmıştır.
 - Daha sonra, ağır metal, tekstil boyar maddesi ve deterjan giderimi yapabilen bakteriler elektrospin yöntemi ile homojen ve boncuksuz yapıda üretilmiş SA, PSU, PCL, PLA ve PS nanoliflerinin yüzeyine fiziksel olarak immobilize edilmiştir.
 - Bakteri immobilize edilen nanoliflerin, bakteri özelliğine göre atık su arıtım potansiyeli test edilmiştir.
- Literatür bölümünde de anlatıldığı gibi elektrospin prosesinde ya da düzeneğinde yapılabilen değişiklikler ile farklı morfolojide ve yapıda nanolifler elde etmek mümkündür. Biz de bu projede, nanolif morfolojisinde ya da dizilimdeki değişikliklerin, bakteri tutunmasında, biyofilm oluşmasında ve atık giderimdeki performanslarında meydana getirebileceği farklılıkları inceledik. Bunun için;
- Yüzeyi gözenekli ve gözeneksiz olan SA nanolifleri uygun çözelti karışımları ve elektrospin parametreleri kullanılarak üretilmiştir. Daha sonra her iki nanolif yapısına da kullanım amacına bağlı olarak bakteri immobilize edilmiştir. Bakteri immobilize edilmiş gözenekli ve buna bağlı olarak pürüzlü ve daha yüksek yüzey alanına sahip olacak SA nanolifi ile pürüzsüz yüzeye sahip SA nanolifleri arasındaki bakterilerin koloni ve biyofilm oluşturma durumları açısından değerlendirilmiştir.
 - PSU nanoliflerinin üretimi sırasında yüksek hızda dönen silindirik bir tanbur toplayıcı olarak kullanılmış ve birbirine paralel olarak hizalanmış liflerden oluşan nanoağ

yapıları elde edilmiştir. Paralel hizalı nanolifler ile dağınık bir şekilde toplanan nanolifler arasındaki farklılık bakterilerin koloni ve biyofilm oluşturma durumları açısından değerlendirilmiştir.

- Farklı çapa sahip nanolifler, elde edilen nanoağ yapıların farklı yüzey alanlarına sahip olmasını sağlamaktadır. Lif çapı azaldıkça, yüzey alanı artarken, çap arttıkça da yüzey alanı azalmaktadır. Çalışmanın bu bölümünde, PSU nanoliflerinin üretimi sırasında farklı konsantrasyon, çözelti sistemi ve elektrospin parametreleri denenerek, iki farklı çapa sahip nanoağ yapıları üretilmiştir. Daha sonra bu nanoliflere, kullanım amacına uygun olarak bakteriler immobilize edilip, çap farklılıklarının ve buna bağlı olarak da yüzey alanının bakterilerin gelişmesi, biyofilm oluşturma ve yayılmasındaki etkisi incelenmiştir.

2. Yaklaşım: Bakterilerin nanolif yapısına direkt enkapsülasyonu ve hazırlanan nanoliflerin atık su arıtımında kullanılması

- Polivinilalkol (PVA), polietilenoksit (PEO) polimerleri ile siklodekstrin (CD) moleküllerinin kullanıldığı bu yaklaşımda, polimer ve CD çözeltileri ile bakteri solüsyonları belirli oranlarda karıştırılıp, bakteri içeren nanoliflerin üretimi eş zamanlı olarak sağlanmıştır. Bunun için öncelikle, PVA, PEO ve CD'nin sulu çözeltilerinin konsantrasyonları ve bunlara eklenecek bakteri besiyeri sistemlerinin miktarları belirlenmiştir. Homojen ve boncuksuz nanoliflerin üretimi için ayrıca elektrospin parametreleri de optimize edilmeye çalışılmıştır. Karıştırılan bakterilerin canlı olup olmadığını değerlendirmek için, bakteriler öncelikle "Live/Dead" boyama yöntemi ile boyanıp, floresan mikroskopunda gözlemlendikten sonra elektrospin sistemi ile karıştırılıp nanolif yapıları üretilmiştir. Nanoliflerin ve bakteri enkapsüle edilen nanoliflerin morfolojileri SEM analizi ile incelenmiştir.

3. Yaklaşım: Çekirdek-kabuk yapısındaki nanoliflere bakteri enkapsülasyonu ve hazırlanan nanoliflerin atık su arıtımında kullanılması

- Bakterilerin, nanolif içerisine direkt enkapsülasyonuna alternatif olarak eş merkezli hizalanmış iki iğnenin kullanıldığı koaksiyal elektrospin sistemi kullanılarak da bakteri içeren çekirdek-kabuk nanolifleri üretilmiştir. Buradaki amaç, direkt karıştırma sırasında ortaya çıkabilecek bakteri kayıplarını azaltmak ve daha uzun süreli etkinin sağlanmasıdır. Bunun için, PVA çözeltisi nanoliflerin kabuk kısmını oluştururken, bakteri besiyeri çözeltisi ise nanoliflerin çekirdek kısmını oluşturmuştur. Nanoliflerin morfolojileri SEM analizi ile incelenmiş, çekirdek-kabuk yapısının oluşup oluşmadığını anlamak için de floresan mikroskobu kullanılmıştır.

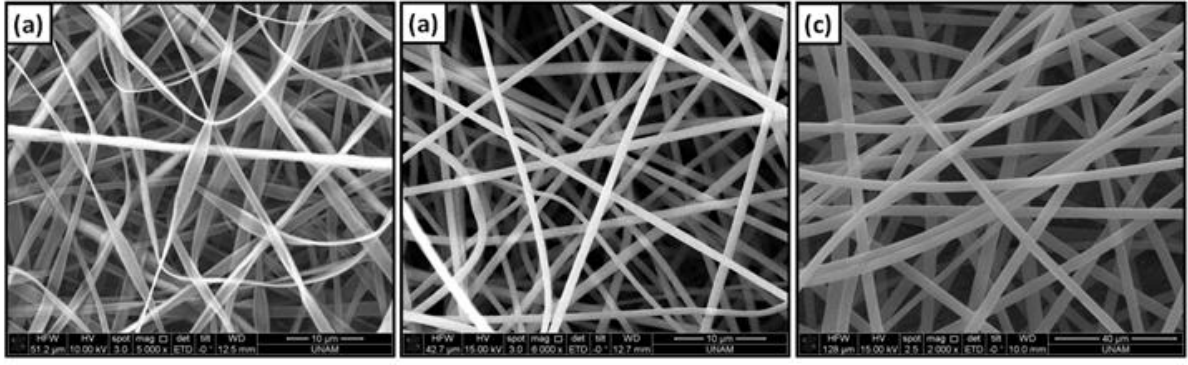
Kullanılan yöntemler ve malzemeler ile ilgili tüm ayrıntılar “BULGULAR VE TARTIŞMA/SONUÇ” bölümünde detaylı bir şekilde açıklanmıştır.

4.BULGULAR ve TARTIŞMA/SONUÇ

4.1 Bakterilerin elektrospin edilmiş nanolif yüzeylerine immobilizasyonu ve nanoliflerin atık su arıtımında kullanımı

4.1.1 Yüzeyine bakteri immobilize edilecek pSA, PSU ve PS nanoliflerinin homojen ve boncuksuz bir şekilde üretimi için çözelti ve elektrospin parametrelerinin optimizasyonu

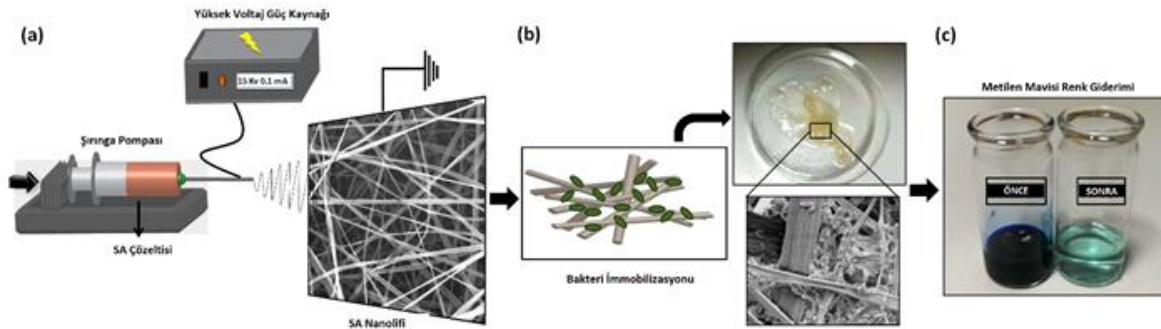
Projenin bu aşamasında üzerine bakteri immobilize edilecek nanoliflerin elektrospin yöntemi kullanılarak üretilmesi için gerekli optimizasyonlar yapılmıştır. Bu amaçla, projenin belirtilen periyodunda gözenekli selüloz asetat (pSA) nanolifleri, polisülfon (PSU) nanolifleri ve polistiren (PS) nanolifleri homojen bir şekilde elde edilmiştir. pSA nanolifleri için SA polimerleri aseton/diklorometan (1/1-v/v) çözücü karışımında %10 (w/v) polimer konsantrasyonunda, PSU polimerleri dimetilasetamit/aseton (9/1-v/v) çözücü karışımında %32 (w/v) polimer konsantrasyonunda ve son olarak PS polimerleri dimetilformamid içerisinde %30 (w/v) polimer konsantrasyonunda çözünmüşlerdir. Polimerlerin homojen bir şekilde çözünmesi ile elde edilen çözeltiler ikinci aşama olarak elektrospin sistemine yüklenmişlerdir. Bunun için, her bir polimer çözeltisi ayrı olarak, 1 mL'lik şırıngaların (iğne ucu: 0.4 mm) içine doldurulmuştur. Daha sonra bu şırıngalar, yatay bir şekilde, akış hızı 0.5ml/saat olarak ayarlanan pompanın (Model: SP 101IZ, WPI) üzerine yerleştirilmiştir. Yüksek voltaj güç kaynağının (Matsusada Precision, AU Series) elektrotlarından biri metal iğnenin ucuna diğeri de topraklanmış metal levhaya bağlanmış ve 10 kV'luk voltaj uygulanmıştır. Nanolifler, 10 cm uzaklıkta bulunan ve üzerinde alüminyum folyo sarılmış toplayıcıya, yaklaşık 22 °C sıcaklıkta ve %23 bağıl nem koşullarında kapalı bir ortamda toplanmaya başlanmıştır. Elde edilen nanolifler, kalan çözümlerin nanoağ yapısından tamamen uzaklaşması için gece boyunca vakumlu fırında polimer çeşidine bağlı olarak farklı sıcaklıklarda bekletilmişlerdir. Şekil 5'de pSA, PSU ve PS nanoliflerine ait temsili SEM görüntüleri verilmektedir. Görüntülerden de anlaşılacağı üzere nanolifler homojen ve boncuksuz bir yapıya sahiptirler.



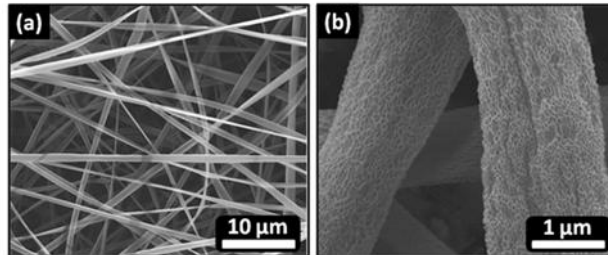
Şekil 5. (a) pSA, (b) PSU ve (c) PS nanoliflerine ait temsili SEM görüntüleri.

4.1.2 Metilen mavisi boyasını giderici özelliği bulunan bakterilerin selüloz asetat nanolif yüzeyine immobilizasyonu

Bu çalışmada, homojen bir şekilde üretilmiş selüloz asetat (SA) nanoliflerin yüzeyine bakterilerin immobilizasyonu çalışılmıştır. Bu amaçla *Aeromonas eucrenophila*, *Clavibacter michiganensis* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterileri kullanılmıştır. Şekil 6'da elektrospin yöntemi ile SA nanoliflerinin eldesi, bakterilerin immobilizasyonu ve atıksu arıtmada kullanımı şematik olarak gösterilmiştir.

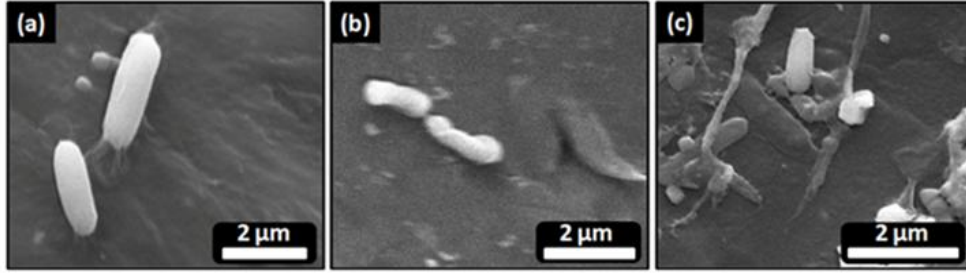


Şekil 6. Elektrospin yöntemi ile SA nanoliflerinin eldesi, bakterilerin immobilizasyonu ve atıksu arıtmada kullanımının şematik gösterimi.



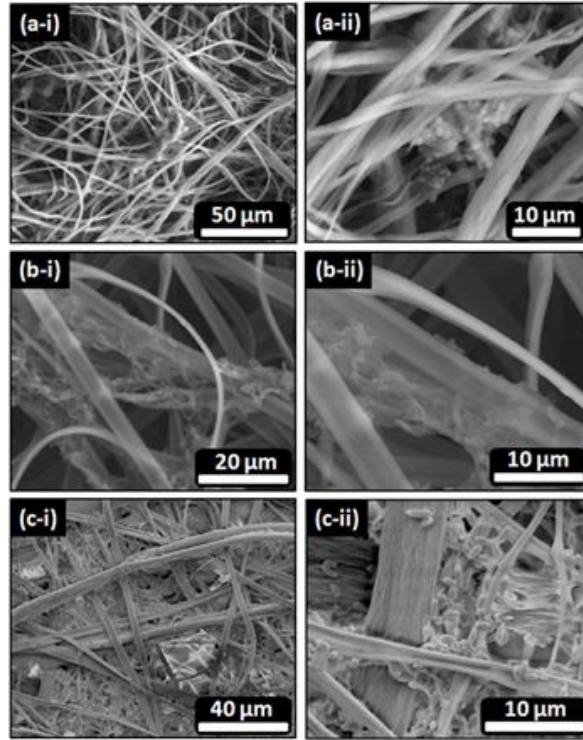
Şekil 7. (a) düşük ve (b) yüksek büyütme SA nanoliflerin SEM mikrografları.

Çalışmada kullanılan bakterilerin morfolojik yapıları Şekil 8'de gösterilmiştir. Şekil 8a'da *A. eucrenophila* ve Şekil 8c'de *C. michiganensis* bakterileri çubuk şeklindedir. *P. Aeruginosa* ise kokobasil morfolojisinde olup Şekil 8b'de görülmektedir.



Şekil 8. (a) *A. eucrenophila* (b) *P. Aeruginosa* ve (c) *C. michiganensis* bakterilerin genel morfolojileri.

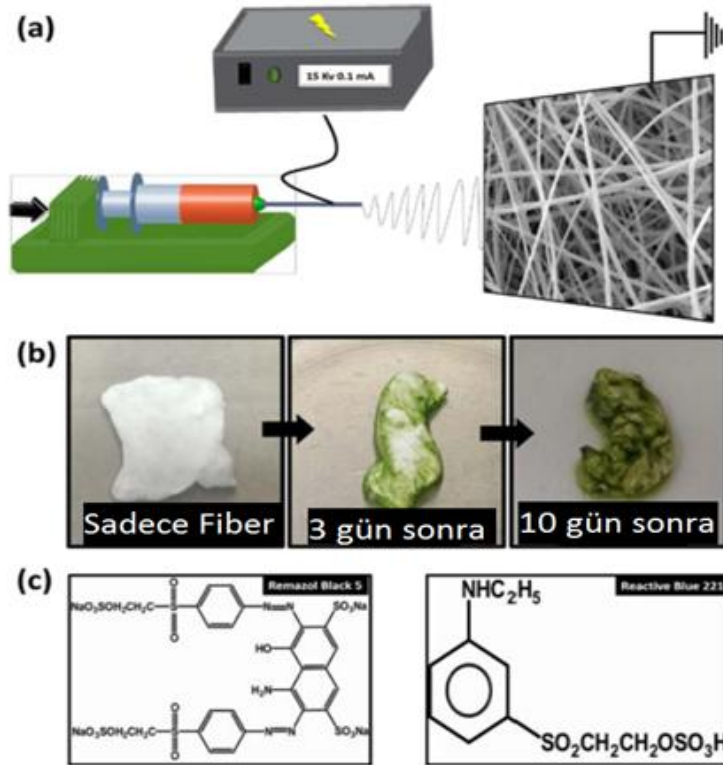
Bu bakteriler, SA nanoliflerinin üzerinde 7 gün inkübasyona bırakılmış ve bakteriyel tutunma SEM analizi ile verilmiştir. Şekil 9'da (a-i and a-ii) *Aeromonas eucrenophila*, (b-i and b-ii) *Clavibacter michiganenesis*, (c-i and c-ii) *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerinin 7 gün sonunda SA yüzeylerine tutunmaları gösterilmiştir. Buna göre 7 gün bakteriyel tutunma ve biyofilm oluşumu için yeterli gözükmetedir.



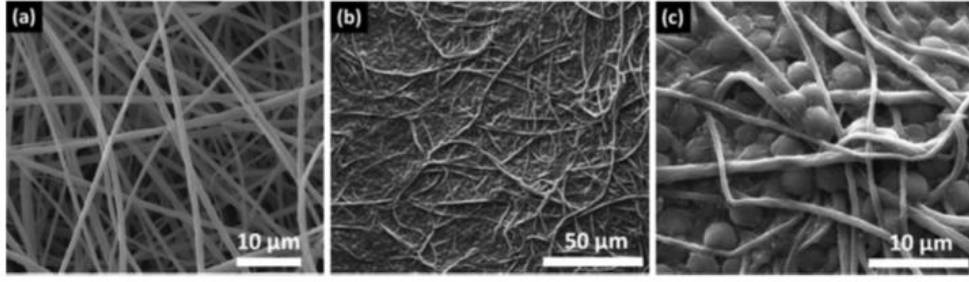
Şekil 9. (a-i and a-ii) *Aeromonas eucrenophila*, (b-i and b-ii) *Clavibacter michiganenesis*, (c-i and c-ii) *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerinin 7 gün SA yüzeylerine tutunmaları.

4.1.3 Tekstil boyar madde giderici özelliği bulunan mikroalglerin polisülfon (PSU) nanolif yüzeyine immobilizasyonu

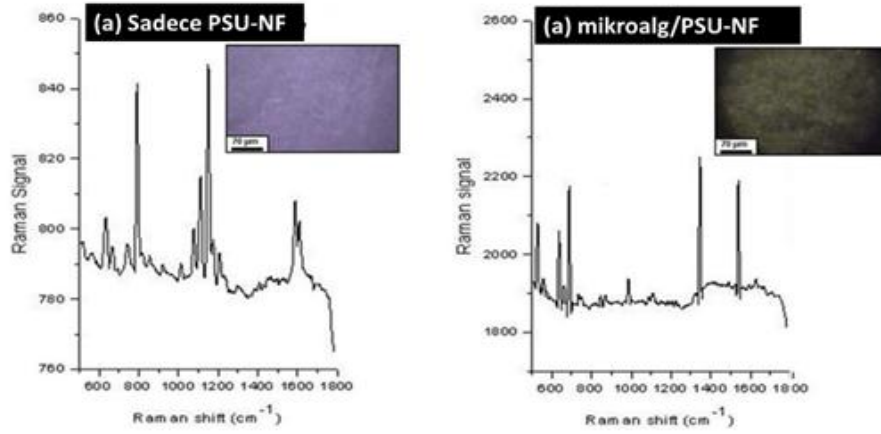
Bu çalışmamızda, mikroalg mikroorganizmaları, polisülfon nanolif yapılarına (PSU-NF) immobilize edilmiş ve bu malzemenin iki farklı reaktif boyar madde (RB5 ve RB221) gideriminde kullanım potansiyelleri araştırılmıştır. Şekil 10'da çalışma şematik olarak verilmiştir. Şekil 11'de ise elektrospın yöntemi ile elde edilmiş PSU-NF'lerin SEM mikrografları verilmiştir. Şekil 11a ve 11b'de nanoliflerin uniform ve boncuksuz yapıları görülmektedir. Şekil 11c'de ise 10 günlük inkübasyon sonrasında mikrolaglerin kuvvetli bir şekilde yüzeye tutundukları görülmüştür.



Şekil 10. (a) Elektrospın yöntemi ile PSU-NF elde edilmesi şematik gösterimi (b) sadece PSU nanoağ yapıları, mikroalg inkübe edilmiş 3 ve 10 günlük immobilizasyonları gösteren fotoğraflar (c) Remazol Siyah 5 (RB5) ve Reaktif Mavi 221 (RB221) boyar maddelerin kimyasal yapıları.



Şekil 11. (a) sadece PSU-NFW ve (b-c) mikroalg/PSU-NFW örneklerinin farklı büyütmelerde çekilmiş olan SEM görüntüleri.



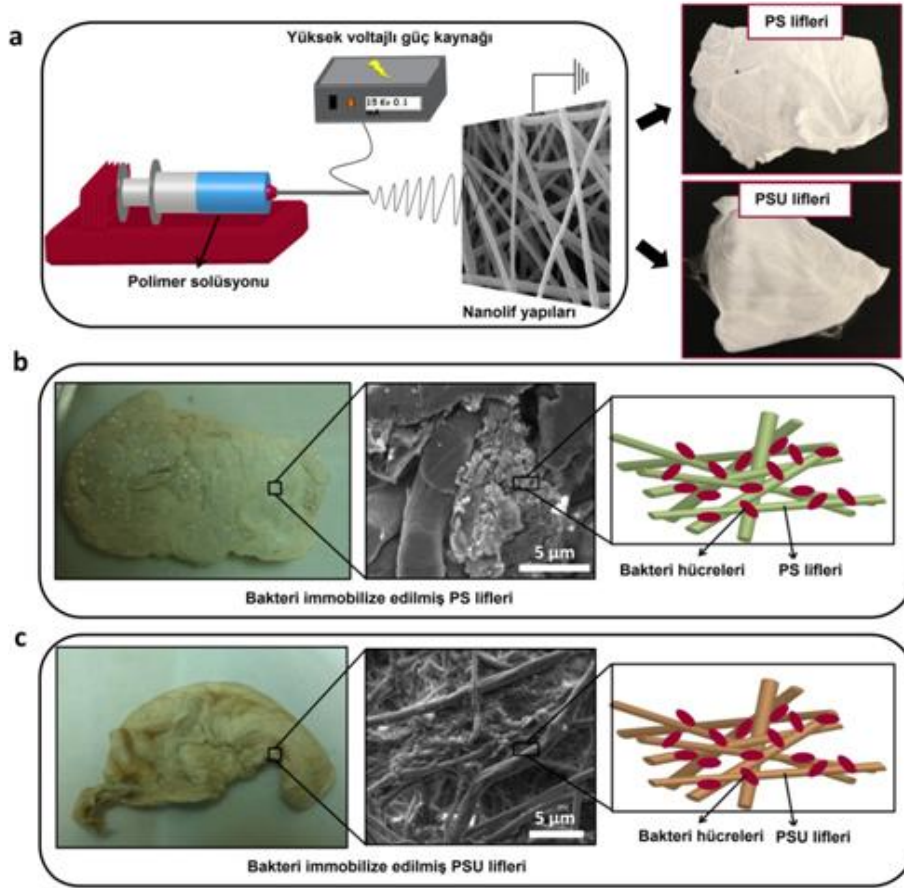
Şekil 12. (a) sadece PSU-NFW'in (b) mikroalg/PSU-NFW örneğinin Raman spektrumları.

Şekil 12'de görüldüğü üzere, mikroalg tutunmuş yüzeylerin Raman spektrumunda tutunmamış olanlara göre belirgin farklılıklar gözlenmektedir.

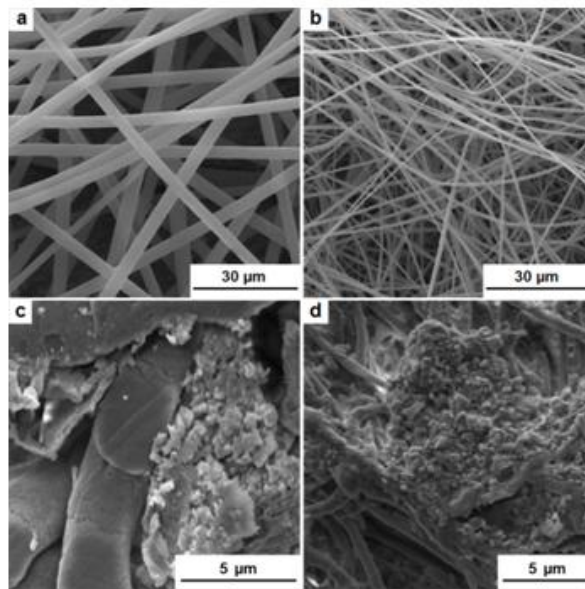
4.1.4 Cr(VI) giderim özelliği olan bakterilerin polistiren ve polisülfon nanolif yüzeylerine immobilizasyonu

Bu çalışmamızda, daha önce izole ettiğimiz *Morganella morganii* STB5 bakteri suşu, polistiren (PS) ve polisülfon (PSU) nanolif yapılarına immobilize edilmiş ve elde edilen malzemelerin Cr(VI) gideriminde kullanım potansiyelleri araştırılmıştır. Şekil 13'de çalışma şematik olarak verilmiştir.

Şekil 14'de ise elektrospin yöntemi ile elde edilmiş PS ve PSU nanoliflerinin SEM görüntüleri verilmiştir. SEM görüntülerinde (a-b) nanoliflerin uniform ve boncuksuz yapıları görülmektedir. Şekil 14c ve 14d'de ise 30 günlük inkübasyon sonrasında bakterilerin kuvvetli bir şekilde yüzeye tutundukları görülmüştür.



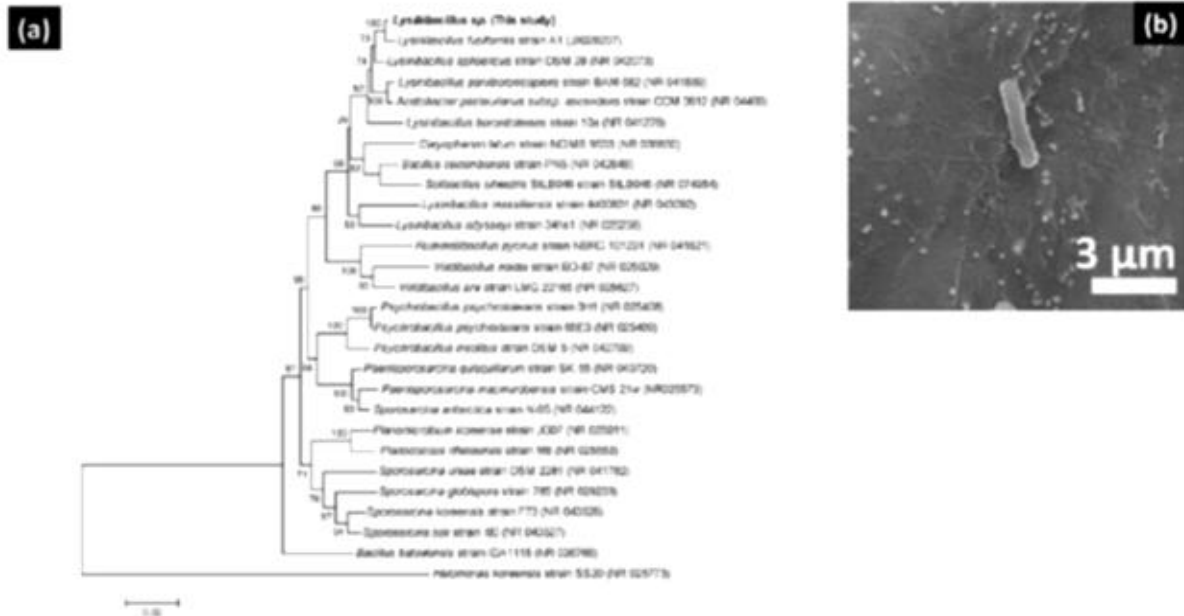
Şekil 13. (a) Elektrosprin yöntemi ile PS ve PSU nanoliflerinin elde edilmesinin şematik gösterimi (b) bakteri tutundurulmuş PS nanolifleri (c) bakteri tutundurulmuş PSU nanoliflerinin fotoğrafları ve şematik gösterimi.



Şekil 14. (a) sadece PS nanoliflerinin (b) sadece PSU nanoliflerinin (c) bakteri tutundurulmuş PS nanoliflerinin (d) bakteri tutundurulmuş PSU nanoliflerinin SEM görüntüleri.

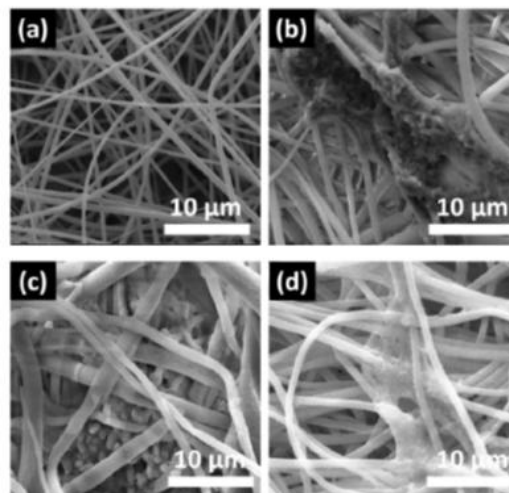
4.1.5. Boyar madde ve Cr(VI) içeren atıksuları giderici özelliği bulunan bakterilerin polisülfon (PSU) nanolif yüzeylerine immobilizasyonu

Çalışmada izole edilen ve 16S rRNA analizi ile tür düzeyinde bulunmuş bakteri *Lysinibacillus* sp. NOKS bakterisidir. Şekil 15’de *Lysinibacillus* sp. NOKS bakterisinin filogenetik analizi sonucu elde edilen (a) ağacı ve (b) SEM görüntüsü verilmiştir.



Şekil 15. (a) *Lysinibacillus* sp. NOSK bakterisin filogenetik ağacı ve (b) SEM görüntüsü.

Şekil 16'da SEM görüntülerinden de anlaşılabacağı üzere bakterilerin PSU yüzeylere tutunması için gerekli süre 7 gün olarak bulunmuştur.

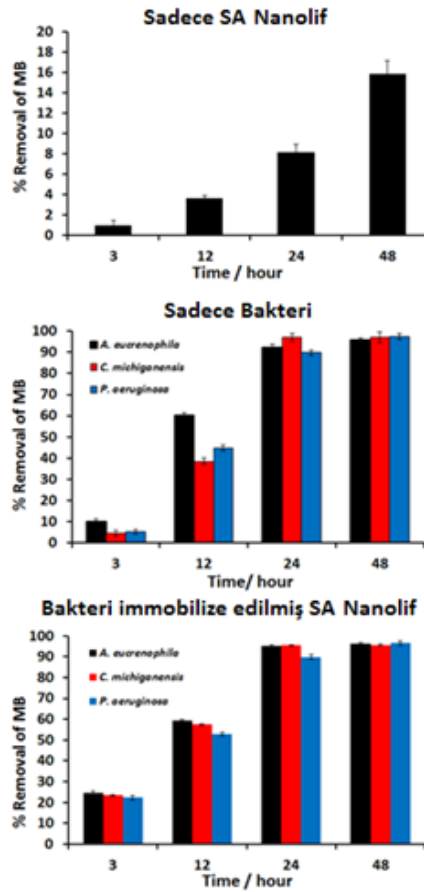


Şekil 16. SEM görüntüleri (a) sadece PSU nanolifleri (b) 24 saat inkübasyon (c) 7 gün inkübasyon (d) 15 gün inkübasyon.

4.1.6 Metilen mavisi gideriminde kullanılacak olan bakteri/nanolif biyokompozitlerinin optimizasyon çalışmaları

Çalışmanın atıksu arıtımı kısmında öncelikle optimum koşulların bulunması amacıyla temas süresi ve artan boya konsantrasyonunun renk giderimine etkisi çalışılmıştır. Bakteriler boyar maddeleri iki şekilde gidermektedir: mikrobiyal hücreler tarafından adsorpsiyon ya da biyolojik yollarla degradesyondur. Eğer boyar madde hücre tarafından adsorbe oluyorsa bu durumda biyokütle renk içermektedir ancak, eğer ki mekanizma degradesyon ise renksiz bir biyokütle elde edilmektedir (Chen vd., 2003). Çalışmamızda, renksiz biyokütleden dolayı bakterilerin metilen mavisini degrades ettiği sonucuna varılmıştır.

Kirleticilerin başarılı bir şekilde adsorpsiyonu çalışmalarında temas süresi önemli bir parametredir. Uygun temas süresinin belirlenmesi amacıyla bakteri immobilize edilmiş SA nanolifleri, sadece bakteri ve sadece SA nanolifleri çalışmalarda kullanılmıştır. Bu amaçla, 3 saat, 12 saat, 24 saat ve 48 saat sürelerince renk giderimi takip edilmiştir (Şekil 17).

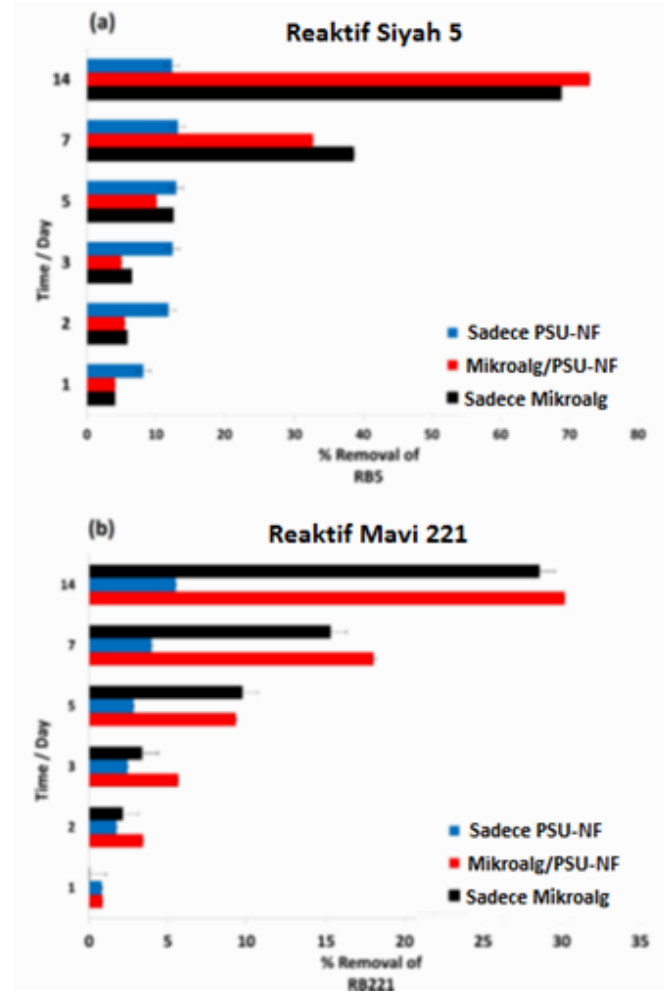


Şekil 17. Temas süresinin renk giderimine etkisi (20 mg/L MM, pH 7, T: 30 °C, karıştırma hızı: 100 rpm).

Şekil 17’de sadece nanolif kullanılması ile en yüksek MM giderimi 48 saat sonunda %15’dir. Bunun yanında, sadece bakteri ve bakteri immobilize edilmiş SA nanolif kullanımında renk giderimi 24 saat sonunda %95 değerine ulaşmıştır. En yüksek renk giderimi 48 saat sonunda elde edilmiş olup bundan sonraki çalışmalar 48 saat periyotlarında çalışılmıştır. 48 saat sonunda *P. aeruginosa*, *A. eucrenophila* ve *C. michiganensis* bakterileri için sırasıyla: 96.5 ± 0.4 , 96.1 ± 0.4 ve 95.6 ± 0.3 giderim değerleri elde edilmiştir.

4.1.7 Tekstil boyar madde gideriminde kullanılacak olan mikroalg/nanolif biyokompozitlerinin optimizasyon çalışmaları

Tekstil boyar maddelerinin gideriminde kullanılacak mikroalg/nanoliflerin en yüksek giderime ulaşılması için optimizasyon çalışması yapılmıştır. Bu amaçla öncelikle, temas süresinin etkisi çalışılmıştır. Şekil 18’de temas süresinin RB5 ve RB221 boyaalarının mikroalg/PSU-NF ile giderim verimi gösterilmektedir.

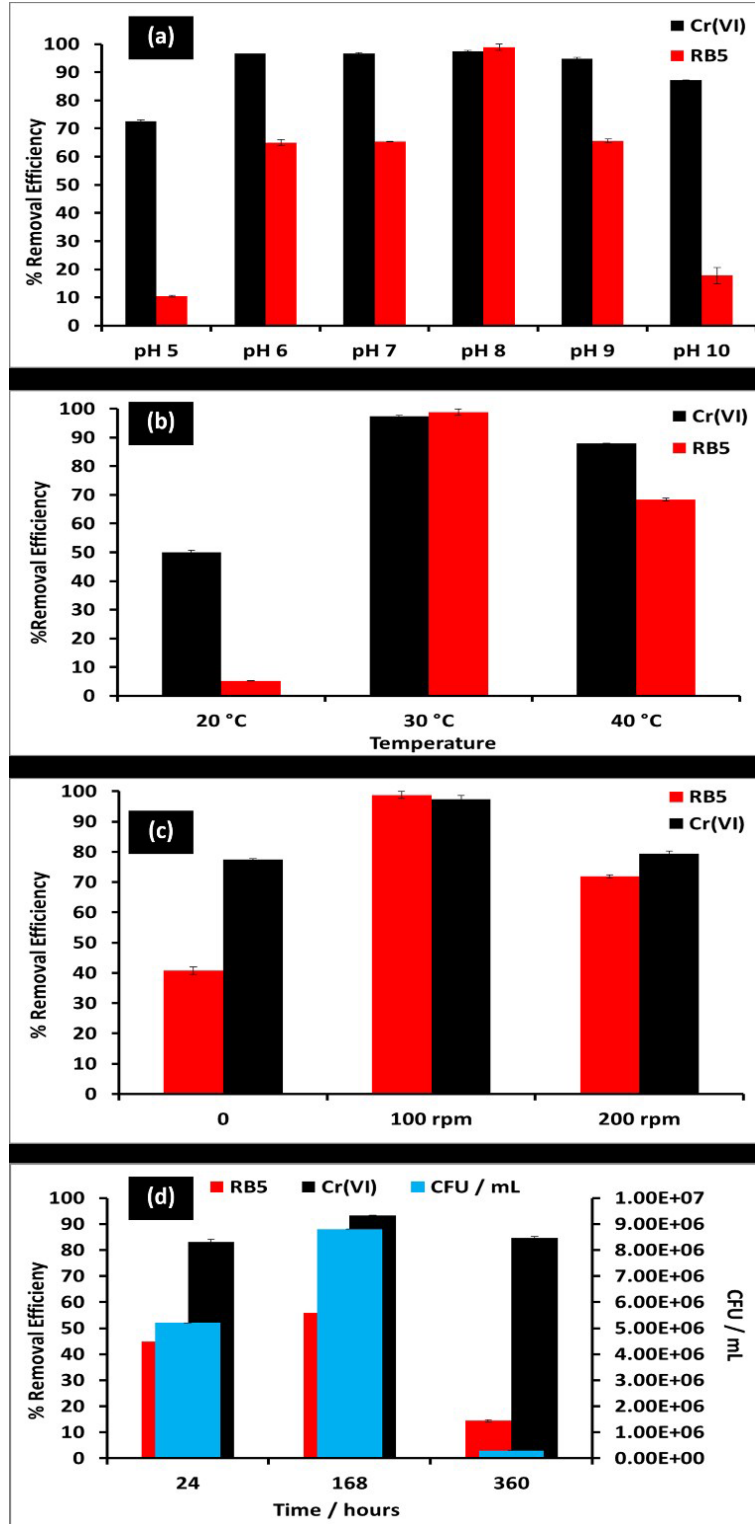


Şekil 18. Temas süresinin (a) RB5 (b) RB221 boyaalarının mikroalg/PSU-NF ile giderim verimine etkisi.

Analiz sonuçlarına göre ilk 14 günde renk giderimi artmış olup bu değerler RB5 boyar maddesi için mikroalg/PSU-NF kullanılarak 73.0 ± 0.3 iken sadece bakteri 68.8 ± 0.3 ve sadece nanolifler için ise 12.4 ± 0.3 olarak bulunmuştur. Bunun dışında, RB221 renk giderimi RB5 renk giderim yüzdesine göre daha düşüktür. En yüksek RB221 giderimi mikroalg/PSU-NF ile 30.2 ± 0.2 'dir. Bunun sebebinin boyar maddelerin farklı kimyasal yapılarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.1.8 Tekstil boyar madde ve Cr(VI) gideriminde kullanılacak olan bakteri/nanolif biyokompozitlerinin optimizasyon çalışmaları

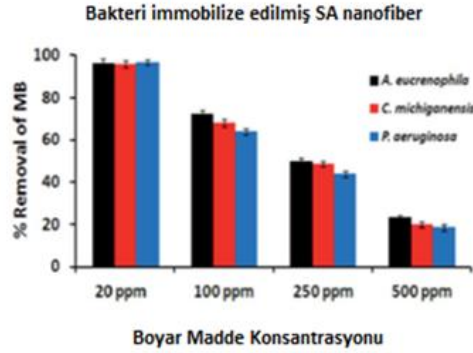
Şekil 19'da (a) pH değerleri (b) farklı sıcaklıklar (c) çalkalama/sabit koşullar (d) bakteri miktarının giderim üzerine etkisi araştırılmıştır. Optimum pH değerinin bulunması amacıyla pH 5-10 değerlerinde giderim çalışması yapılmış ve 24 saat sonunda boya giderimi %10.5-98.8 aralığında, Cr(VI) giderimi ise %72.5-97.4 aralığında bulunmuştur. En düşük giderim pH 5 ve en yüksek giderim ise pH 8'de görülmüştür. Optimum sıcaklık deneyinde ise en düşük giderim yüzdesine 20 °C'de ulaşılmış ve en yüksek giderim 30 °C'de boyar madde için 98.8 ± 0.34 , Cr(VI) için ise 97.4 ± 1.1 olarak bulunmuştur. *Lysinibacillus* sp. NOSK bakterisi her iki koşulda da, hem çalkalamalı hem de sabit koşullarda gelişebilmektedir. Şekil 15c'de 100-200 rpm çalkalamalı ve sabit koşullarda giderim araştırılması yapılmıştır. Buna göre, 100 rpm için renk giderimi 98.8 ± 1.1 ve 200 rpm için ise 71.8 ± 0.53 bulunmuştur. Çalkalamasız durumda ise giderim yüzdesi 40.7 ± 1.2 'dir. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek giderim 100 rpm çalkalamalı koşullarda elde edilmiştir.



Şekil 19. (a) pH değerleri (b) farklı sıcaklıklar (c) çalkalama/sabit koşullar (d) bakteri miktarının boya giderimi üzerine etkisi.

4.1.9 Metilen mavisi giderim özelliği bulunan bakteri/nanolif biyokompozitlerinin giderim kapasitelerinin belirlenmesi

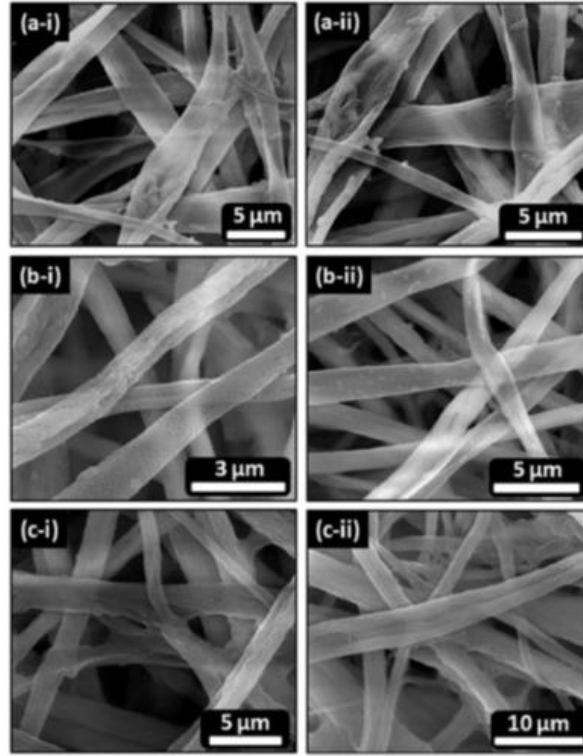
Şekil 20’de *A. eucrenophila*, *C. michiganensis* ve *P. aeruginosa* immobilize edilmiş nanoliflerin renk giderimine etkisi 20 mg/L ve 500 m/L artan boyar madde konsantrasyonlarında, pH 7’de araştırılmış ve Şekil 20’de verilmiştir.



Şekil 20. Bakteri immobilize edilmiş SA nanoliflerin 48 saat sonunda artan boya konsantrasyonlarının renk giderimine etkisi.

48 saat sonunda en yüksek renk giderimi 20 mg/L konsantrasyonda 96.1 ± 0.4 , 95.6 ± 0.3 ve 96.5 ± 0.4 sırası ile *A. eucrenophila*, *C. michiganensis* ve *P. aeruginosa* immobilize edilmiş nanoliflerden elde edilmiştir. Fakat boyar madde konsantrasyonu arttıkça renk giderim veriminin de azaldığı bulunmuştur. 100 ppm konsantrasyonda *A. eucrenophila*, *C. michiganensis* ve *P. aeruginosa* immobilize edilmiş nanoliflerden elde edilen renk giderim kapasitesi sırası ile 69.9 ± 1.8 mg/L, 65.9 ± 1.6 mg/L ve 61.9 ± 1.3 mg/L’dir. Boyar madde konsantrasyonu 250 ppm ve 500 ppm’e yükseltildiğinde de yaklaşık 100 mg/L boyar maddenin giderildiği görülmektedir. Bu sonuçlar giderim yüzdelerinin nanolif miktarı ve bakterilere bağlı olduğunu göstermektedir.

Tekrar kullanılabilirlik deneylerinde bakteri immobilize edilmiş nanoliflerin dört defa kullanılabilir olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Buna göre ilerleyen tekrarlarda giderim verimindeki azalmanın yıkama aşamalarında tutunan bakterilerin yüzeyden kopması olabileceği düşünülmektedir. 4 tekrar sonunda *A. eucrenophila*, *C. michiganensis* ve *P. aeruginosa* immobilize edilmiş nanoliflerden renk giderim verimleri sırasıyla 45.7 , 43.1 ve 48.04 olarak bulunmuştur. 4 tekrar sonrasında nanolif ve bakterilerin morfolojilerindeki değişimin belirlenmesi amacıyla SEM analizi yapılmış ve Şekil 21’de verilmiştir. Analizler sonunda tekrar kullanılabilirlik deneyi sonrasında nanoliflerin morfolojisini koruduğu ve bakterilerin mevcudiyetini devam ettirdiği görülmüştür.



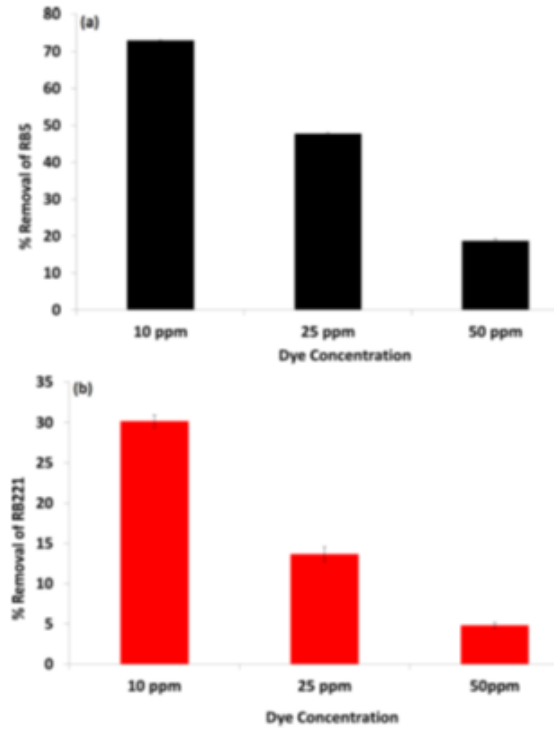
Şekil 21. (a-i and a-ii) *A. eucrenophila*, (b-i and b-ii) *C. michiganensis* ve (c-i and c-ii) *P. aeruginosa* immobilize edilmiş nanoliflerin tekrar kullanılabilirlik testlerinden sonra SEM görüntüleri.

Bu çalışmada elektrospin ile elde edilmiş SA nanolifler, suda çözünmemesi, toksik olmaması ve gözenekli yapısından dolayı bakterilerin tutunmasına olanak sağlamıştır. Üç farklı bakteri immobilize edilmiş nanolif yapıları boyar madde içeren atıksuların giderilmesinde kullanılmıştır. Basit, tekrar kullanılabilir ve gözenekli yapılarından dolayı, elde edilen nano biyokompozit malzemeler, endüstriyel atıksuların giderilmesinde kullanılması adına umut vermektedir. Bu çalışma “**Reusable bacteria immobilized electrospun nanofibrous webs for decolorization of methylene blue dye in wastewater treatment**” başlığı altında *RSC Advances* dergisinde yayınlanmıştır. (San vd., 2014).

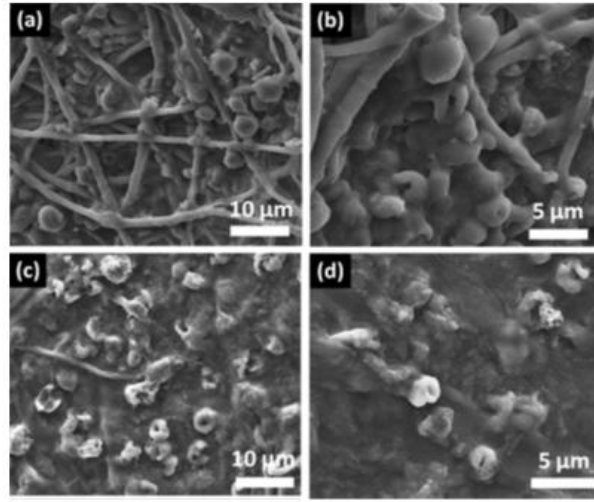
4.1.10. Tekstil boyar madde giderim özelliği bulunan mikroalg/nanolif biyokompozitlerinin giderim kapasitelerinin belirlenmesi

Şekil 22’de görüleceği üzere 10 mg/L konsantrasyonunda RB5 giderimi 73.0 ± 0.3 olarak bulunmuştur. Konsantrasyon arttıkça giderim yüzdesi düşmüş, 25 mg/L’de bu yüzde 47.7 ± 0.2 olarak ölçülürken, bu değer 50 mg/L’de 18.7 ± 0.4 olmuştur. Analiz sonucunda solüsyonun pH değeri de ölçülmüş ve pH değerinin 6.0’dan 5.85’e düştüğü görülmüştür.

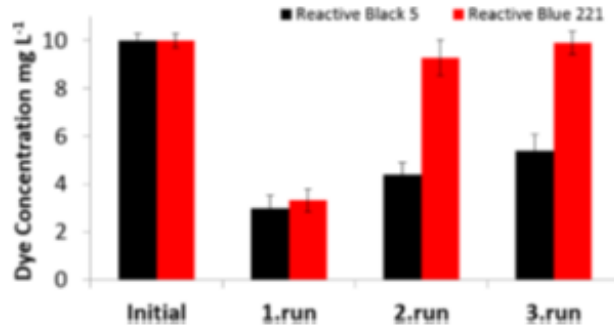
Giderim çalışmasına paralel olarak 14 gün renk giderimi sonunda morfolojik yapılarıdaki değişimler SEM analizi ile incelenmiştir. Şekil 23a ve 23b'de mikroalglerin hali hazırda şekillerini korudukları ve nanoliflerin bozunmadan kaldığı görülmüştür. RB221 boyar maddesinin giderimine bakıldığında giderim verimi 10 mg/L'de 30.2 ± 0.2 iken bu değer, 25 mg/L'de 13.6 ± 0.9 ve 50 mg/L'de 4.8 ± 0.3 olarak ölçülmüştür. Analiz sonunda çözeltinin pH'ı okunduğunda 6.0'dan 3.45 pH değerine düşüldüğü görülmüştür. Bu pH değerlerinde mikroalglerin canlılık oranları düşmüştür ve bu durum Şekil 23c ve 23d'de SEM analizleri ile gösterilmiştir. Bu analizlerde mikroaglerin morfolojilerinde değişim görülmüştür.



Şekil 22. Mikroalg/PSU-NF kullanımı ile farklı boyar madde (a) RB5 ve (b) RB221 konsantrasyonlarının renk giderimine etkisi.



Şekil 23. 14 gün renk giderim deneyi sonrasında mikroalg/PSU-NF SEM analizi (a-b) RB5 boyar maddesi düşük ve yüksek büyütme (c-d) RB221 boyar maddesi düşük ve yüksek büyütme.

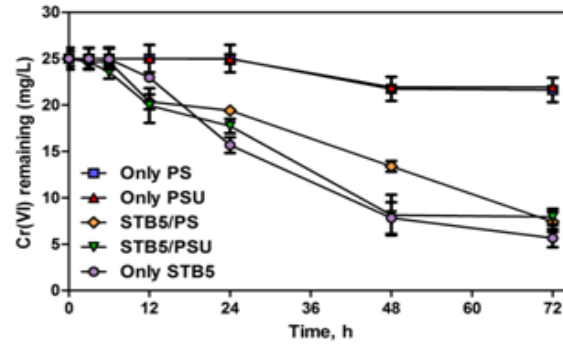


Şekil 24. 10 mg/L RB5 ve RB221 boyar madde konsantrasyonlarında tekrar kullanılabilirlik sonuçları.

Şekil 24’de mikroalg/PSU-NF yapılarının RB5 ve RB221 boyar maddelerinin gideriminde tekrar kullanılabilirlik sonuçları verilmiştir. Tekrar kullanılabilirlik testi sonuçlarına göre mikroalg/PSU-NF yapılarının tekrar kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak, mikroalg/PSU-NF yapıları basit, tekrar kullanılabilir ve nanogözenekli yapılarından dolayı boyar madde içeren endüstriyel atıksuların temizlenmesinde kullanılabilir. Bu çalışma “*Microalgae Immobilized by Nanofibrous Web for Removal of Reactive Dyes from Wastewater*” başlığı altında *Industrial and Engineering Chemistry Research* dergisinde yayınlanmıştır (San-Keskin vd., 2015a).

4.1.11. Cr(VI) giderim özelliği bulunan bakteri/nanolif biyokompozitlerinin giderim kapasitelerinin belirlenmesi

M. organii STB5 immobilize edilmiş PS ve PSU nanolif biyokompozitlerinin Cr(VI) giderimine etkisi, sadece nanolifler ve sadece STB5 bakterisi ile birlikte 25 mg/L başlangıç Cr(VI) konsantrasyonunda, 30 °C'de, 150 rpm'de ve pH 7'de araştırılmış ve Şekil 25'de verilmiştir.



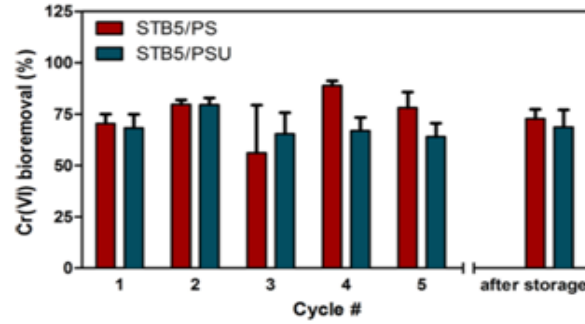
Şekil 25. Sadece PS ve PSU nanoliflerinin, sadece STB5 bakterisinin ve STB5 bakterisi immobilize edilmiş PS ve PSU nanoliflerin 72 saat sonunda 25 mg/L başlangıç Cr(VI) konsantrasyonundaki giderimi.

72 saat sonunda STB5/PS biyokompozitinin STB5/PSU'ya göre Cr(VI) gideriminde bir miktar daha etkili olduğu bulunmuştur zira; STB5/PSU %70.41 oranında Cr(VI) giderimi yaparken, STB5/PSU için bu rakam %68.27'dir. 5 farklı örnek içerisinde en yüksek giderim miktarı %77.41 ile sadece STB5 bakterileri için bulunmuştur ancak bu oran bakteri tutundurulmuş nanolif biyokompozitlerine göre bir miktar daha fazla olsa da belirgin bir farklılık değildir. Bu nedenle bakteri/nanolif biyokompozitlerinin sadece STB5 bakterisi örneğine çok yakın bir giderim potansiyelinin olduğu ve gerekli optimizasyon çalışmaları ile eşit seviyelerin yakalanabileceği hatta daha iyi giderim verimliliği elde edilebileceği düşünülmektedir. Yalnızca nanolif örneklerinde giderim miktarları oldukça düşük olup minimal seviyelerdedir (PS ve PSU nanolifleri için sırasıyla %13.5 ve %12.3), ki bu azalmanın PS ve PSU nanoliflerinin kimyasal yapısından kaynaklı olup adsorpsiyon yöntemi ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Canlı bakterilerle gerçekleştirilen Cr(VI) giderimi ise enzimatik dönüşüm temelli olup zararlı Cr(VI) iyonlarının zararsız kabul edilen Cr(III) iyonlarına enzimatik olarak dönüşümü şeklindedir. Bu nedenle bakteri/nanolif biyokompozitlerinin Cr(VI) giderim mekanizması enzimatik dönüşüm temeli üzerine dayanmaktadır.

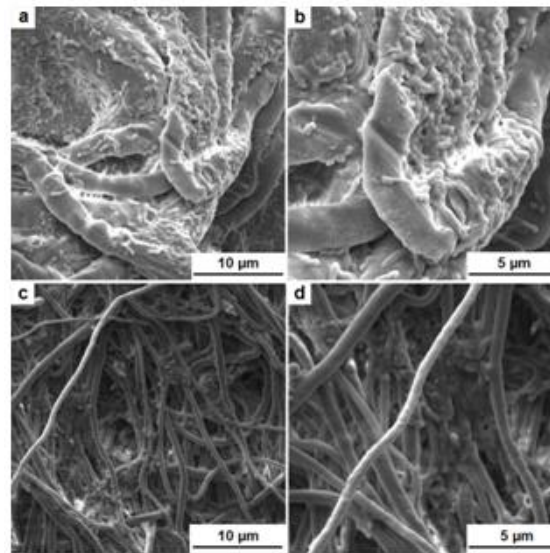
Tekrar kullanılabilirlik deneylerinde bakteri immobilize edilmiş nanoliflerin 5 kez tekrar kullanımı sonucunda tekrar kullanılabilir olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 26). Farklı

denemelerde farklı giderim yüzdeleri bulunsada, ortalama giderim kapasiteleri ilk seviyelere yakındır (STB5/PS için %74 ve STB5/PSU için %64 seviyelerinde). Ayrıca, 5 kez tekrar kullanım sonrasında bakteri/nanolif biyokompozitleri, 15 gün süreyle +4 °C'de nemini muhafaza eden bir ortamda saklanarak, örneklerin bu süreç sonrasındaki Cr(VI) giderim kapasiteleri test edilmiştir. Elde edilen sonuca göre bakteri/nanolif örnekleri giderim kapasitesinde ciddi azalmalar olmadan belirli süreler boyunca uygun ortamlarda muhafaza edilebilir (Şekil 26).

Tekrar kullanılabilirlik ve saklanabilirlik testi sonrasında nanolif ve bakterilerin morfolojilerindeki değişimin görüntülenmesi amacıyla SEM analizi yapılmış ve Şekil 27'de verilmiştir. Sonuç olarak tekrar kullanılabilirlik ve saklanabilirlik testi sonrasında bakterilerin hala mevcut olduğu ve nanoliflerin morfolojilerini koruduğu görülmüştür.



Şekil 26. STB5/PS ve STB5/PSU biyokompozitlerinin yüzdesel olarak tekrar kullanılabilirlik ve saklanabilirlik testi sonuçları.



Şekil 27. (a-b) STB5/PS ve (c-d) STB5/PSU biyokompozitlerinin tekrar kullanılabilirlik ve saklanabilirlik testlerinden sonra çekilen farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri.

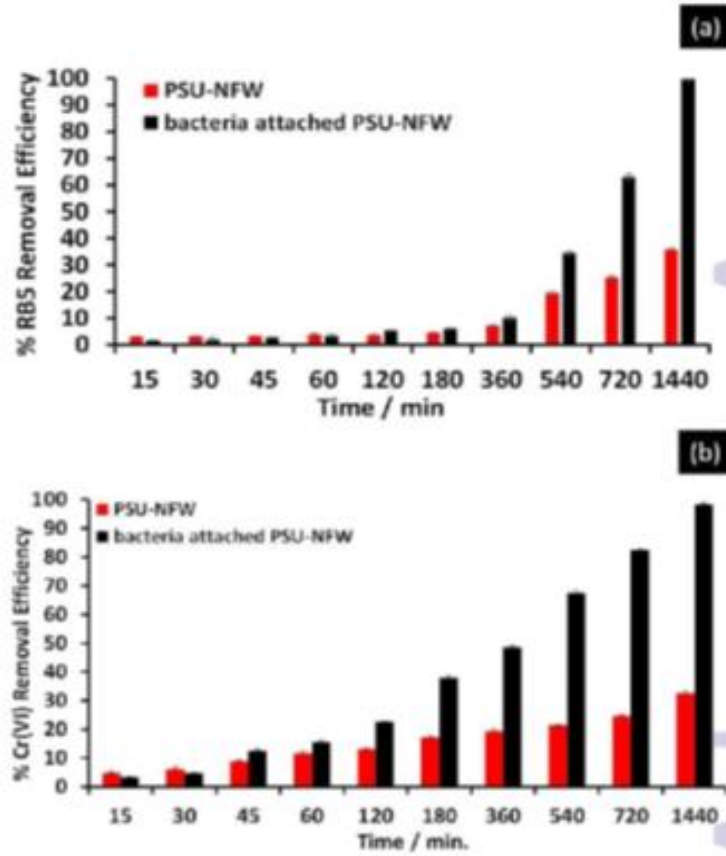
Bu çalışmada, elektrospin yöntemi ile elde edilmiş PS ve PSU nanolifleri üzerine Cr(VI) giderim özelliği bulunan *Morganella morganii* STB5 bakterisi immobilize edilerek, atık sulardaki Cr(VI) kontaminasyonunu giderme potansiyeli bulunan özgün biyokompozit malzemeler elde edilmiştir. Basit, etkili ve tekrar kullanılabilir olmasından dolayı elde edilen nano biyokompozit malzemeler endüstriyel atıksuların giderilmesinde kullanılabilceği düşünülmektedir. Bu çalışmamız “***Bacteria-immobilized electrospun fibrous polymeric webs for hexavalent chromium remediation in water***” başlığı altında *International Journal of Environmental Science and Technology* dergisinde yayınlanmıştır (Sarioglu vd., 2016).

4.1.12 Tekstil boyar madde ve Cr(VI) giderim özelliği bulunan bakteri/nanolif biyokompozitlerinin giderim kapasitelerinin belirlenmesi

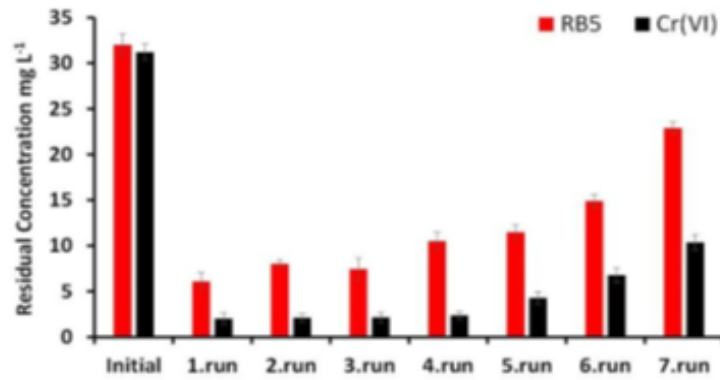
Şekil 28a’da görüleceği üzere RB5 boyar madde giderim yüzdesi sadece PSU-NF için 35.8 ± 0.4 iken, bakteri/PSU-NF için ise bu değer 99.7 ± 0.9 ’a ulaşmıştır. Şekil 28b’de ise Cr(VI) giderimi 24 saat sonunda sadece PSU-NF için 32.6 ± 0.6 iken, bakteri/PSU-NF için 98.2 ± 0.6 ’a ulaşmıştır. Giderim süreci 60 dakikada başlamış ve 24 saat sonunda en yüksek orana ulaşmıştır.

Kirleticiler çoğunlukla başka kirleticilerle birlikte atıksular içinde bulunmaktadır. Bu nedenle hem boyar madde hem de ağır metal içeren atıksularda giderim verimi araştırılmıştır. Artan Cr(VI) konsantrasyonu (15, 50 ve 100 mg/L) ve sabit boyar madde konsantrasyonunda giderim verimlerine bakıldığında giderim değerleri Cr(VI) için 91.8 ± 0.2 , 90.6 ± 0.7 ve 82.7 ± 1.1 değerleridir. Cr(VI) konsantrasyonu arttıkça boyar madde giderim verimi düşmüştür. Ancak, boyar madde konsantrasyonu arttıkça Cr(VI) gideriminin arttığı görülmüştür.

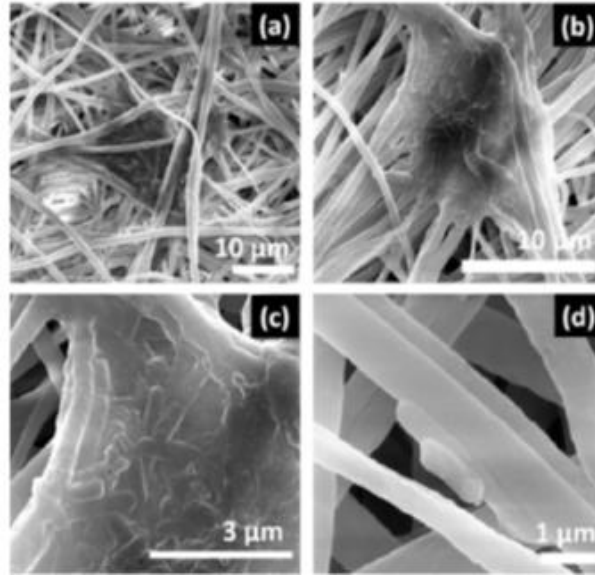
Tekrar kullanılabilirlik deneyleri sonucunda elde edilen nano-biyokompozit malzemenin 7 tekrara kadar oldukça başarılı bir giderim verimi yüzdesi ile kullanılabileceği gösterilmiştir (Şekil 29). Tekrar kullanılabilirlik deneyleri sonrasında bakteri ve nanolif yapısında değişim olup olmadığının belirlenmesi amacıyla SEM analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda hem bakterilerin hem de nanoliflerin yapısında bozulma görülmemiştir (Şekil 30).



Şekil 28. Sadece PSU-NF ve bakteri/PSU-NF malzemelerin (a) RB5 ve (b) Cr(VI) kirleticilerinin giderimine tekli etkisi.



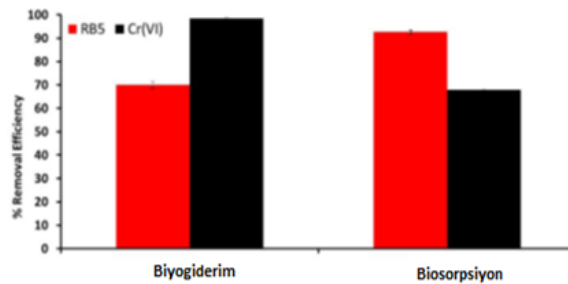
Şekil 29. RB5 ve Cr(VI) gideriminde bakteri/PSU-NF örneklerinin tekrar kullanılabilirlik deney sonucu.



Şekil 30. Tekrar kullanılabilirlik deneyleri sonrasında bakteri/PSU-NF yapılarının SEM görüntüleri (a) 5000 x büyütme (b-c) 20.000 x büyütme (d) 40.000 x büyütme.

Canlı mikroorganizmaların kullanıldığı biyobirikim mekanizması dışında kirleticilerin giderilmesinde ölü mikroorganizmaların kullanıldığı biyosorpsiyon mekanizmaları, ortam şartlarından etkilenmeyen bir sistem olmasından dolayı giderim çalışmalarında araştırılan mekanizmalardandır. Çalışmamızda bu amaçla, yüzeye tutunmuş mikroorganizmalar UV altında tutularak öldürülmüş ve nanobiyokompozit malzemenin giderim verimi araştırılmıştır.

Biyosorpsiyon sonucu en yüksek RB5 ve Cr(VI) giderimi sırası ile 92.6 ± 0.9 ve 67.8 ± 0.1 'dir. Boyar madde renk giderim verimi biyosorpsiyon mekanizmasında daha yüksek değerler elde edilmişken biyogiderim verimi daha düşüktür. Literatürde yapılan çalışmalarda da Cr(VI)'un biosorpsiyon veriminin düşük olduğu bulunmuş ve bizim çalışmamızda da literatüre paralel sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 31).



Şekil 31. Biyogiderim ve biyosorpsiyon mekanizmalarının RB5 ve Cr(VI) giderim verimlerinin karşılaştırılması.

Çalışmada ayrıca kinetik hesaplamalar da yapılmıştır.

Tablo 1. Bakteri/PSU-NF için adsorpsiyon kinetik sabitleri.

Kirletici	İzoterm	Parametre	Değer	R ²
Cr(VI)	Freundlich	K _f	5.52	0.972
		1/n	1.02 x 10 ⁻⁶	
	Langmuir	Q _{max}	5.67	0.995
		b	1.00	
	L-F	Q _{max}	5.67	0.995
		b	1.00	
	Linear	1/n	1.00	0.769
		K _p	0.049	
	Toth	Q _{max}	5.52	0.973
		b	0.99	
RB5	Freundlich	n	4.99	0.575
		K _f	4.66	
	Langmuir	1/n	0.59	0.670
		Q _{max}	59.11	
	L-F	b	0.047	0.669
		Q _{max}	59.21	
	Linear	b	0.047	0.490
		1/n	1.00	
	Toth	K _p	1.18	0.877
		Q _{max}	35.17	
		b	0.058	
		n	5.00	

Adsorpsiyon katsayıları ve tahmin edilen değerlerinden elde edilen izotermeler Tablo 1’de verilmiştir. Langmuir and Freundlich modellerinde elde edilen veriler lineer değildir ve Ry² değerleri yeteri kadar yüksek değildir. RB5 için Toth (Ry² = 0.877) üzerinden elde edilen izoterm en iyi model olarak bulunmuştur. Cr(VI) için ise bu modeller Langmuir ve L-F (Ry² = 0.995) modelleridir. Bu sonuçlara göre Cr(VI) giderimi tek tabakalı adsorpsiyon bazındadır. Fakat RB5 gideriminin çok katmanlı ve heterojen bir yapısı vardır.

Reaksiyon kinetiği sonuçlarına göre ise, RB5 giderimi enzimatik degradasyonlardakine benzer şekilde 0. düzende bulunurken (Tinoco vd., 1996), Cr(VI) giderimi literatürde de bahsedildiği üzere, Cr(VI) indirgenmesinde gözlenen etkide olduğu gibi 1. düzende bulunmuştur (Lugo-Lugo vd., 2010) (Tablo 2).

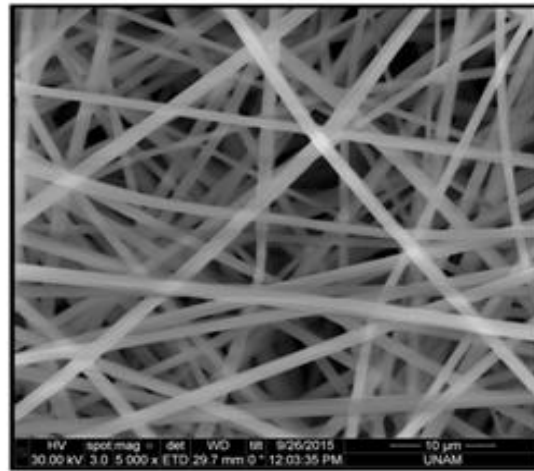
Tablo 2. Bakteri/PSU-NF kullanılarak Cr(VI) ve RB5 boyar madde gideriminde hesaplanan birinci, ikinci ve üçüncü eğriden elde edilen R² değerleri.

Kirletici	Model	R ² Değeri
Cr(VI)	zero order	0.8687
	first order	0.9850
	second order	0.7863
	third order	0.7258
RB5	zero order	0.9594
	first order	0.8417
	second order	0.7221
	third order	0.7182

Bu çalışmamız “*Removal of a reactive dye and hexavalent chromium by a reusable bacteria attached electrospun nanofibrous web*” başlığı altında *RSC Advances* dergisinde yayınlanmıştır (San-Keskin vd., 2015b).

4.1.13 Yüzeyi gözenekli ve gözeneksiz SA nanoliflerinin farklı çözelti sistemleri kullanılarak üretimi ve optimizasyonu.

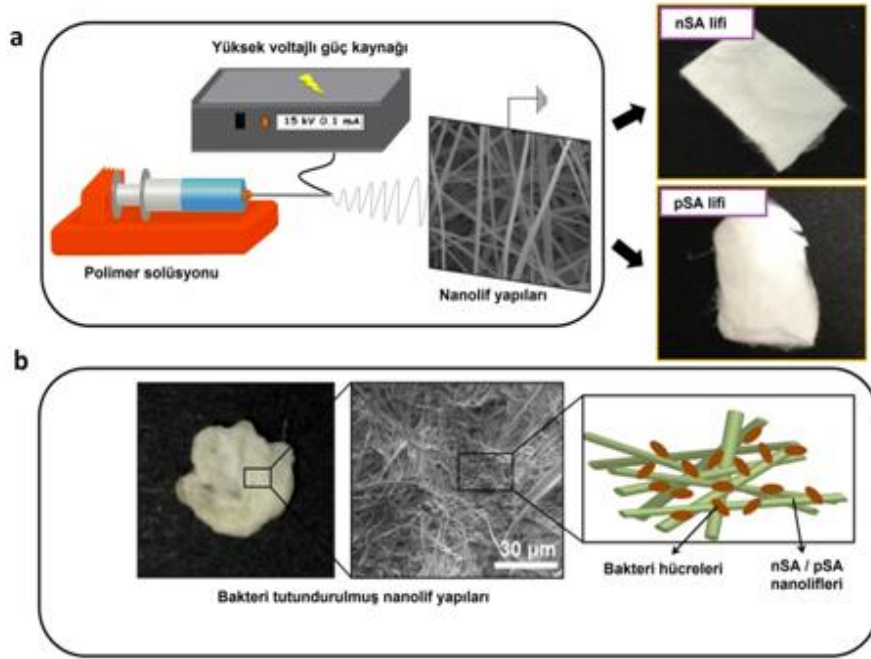
Projenin bu aşamasında, gözenekli ve gözeneksiz SA nanoliflerinin farklı çözücü sistemleri kullanılarak üretimi sağlanmış ve bu iki farklı nanolifin su arıtımında neden olabileceği farklılıkların araştırılması amaçlanmıştır. Gözenekli selüloz asetat (pSA) nanolifleri daha önce belirtildiği şekilde elde edilmiştir. Diğer taraftan gözeneksiz olan SA nanolifleri (nSA) için SA polimeri, diklorometan/metanol (4/1-v/v) çözücü karışımında %12 (w/v) polimer konsantrasyonunda çözünmüştür. Daha sonra bu çözelti, 1 mL’lik şırınganın (iğne ucu: 0.4 mm) içine doldurulmuştur. Daha sonra bu şırınga, yatay bir şekilde, akış hızı 0.5ml/saat olarak ayarlanan pompanın (Model: SP 101IZ, WPI) üzerine yerleştirilmiştir. Yüksek voltaj güç kaynağının (Matsusada Precision, AU Series) elektrotlarından biri metal iğnenin ucuna diğeri de topraklanmış metal levhaya bağlanmış ve 10 kV’luk voltaj uygulanmıştır. Nanolifler, 10 cm uzaklıkta bulunan ve üzerinde alüminyum folyo sarılmış toplayıcıya, yaklaşık 22°C sıcaklıkta ve %23 bağıl nem koşullarında kapalı bir ortamda toplanmaya başlanmıştır. Elde edilen nanolifler, kalan çözücünün kullanım öncesi uzaklaşabilmesi için, gece boyunca vakumlu fırında bekletilmişlerdir. Homojen ve boncuksuz bir şekilde üretilen gözeneksiz SA nanoliflerinin temsili SEM görüntüsü Şekil 32’de verildiği gibidir.



Şekil 32. Gözeneksiz SA (nSA) nanoliflerine ait temsili SEM görüntüsü.

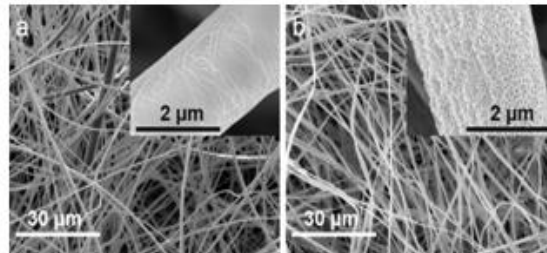
4.1.14. Deterjan giderim özelliği olan bakterilerin yüzeyi gözenekli ve gözeneksiz selüloz asetat nanolif yüzeylerine immobilizasyonu ve elde edilen biyokompozitlerin deterjan giderim kapasitelerinin test edilmesi

Bu çalışmamızda, *Serratia proteamaculans* STB3 ve *Achromobacter xylosoxidans* STB4 bakteri suşları, gözenekli (pSA) ve gözeneksiz (nSA) nanolif yapılarına immobilize edilmiş ve elde edilen malzemelerin sodyum dodesil sülfat (SDS) deterjanının gideriminde kullanım potansiyelleri araştırılmıştır. Şekil 33'de çalışma şematik olarak verilmiştir.



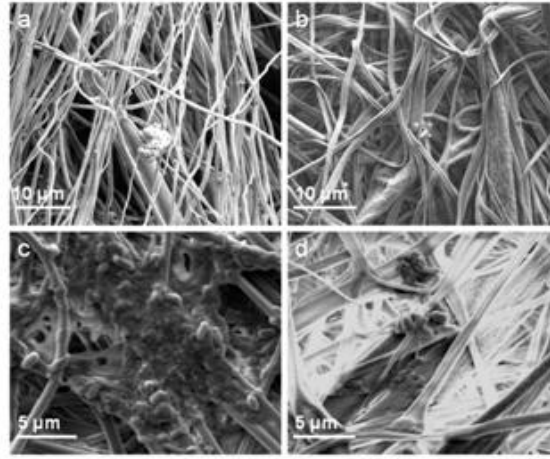
Şekil 33. (a) Elektrospin yöntemi ile nSA ve pSA nanoliflerinin elde edilmesinin şematik gösterimi (b) bakteri tutundurulmuş SA nanoliflerinin fotoğrafları ve şematik gösterimi.

Şekil 34'de yüzeyi gözeneksiz (nSA) ve yüzeyi gözenekli (pSA) nanoliflerinin SEM görüntüleri verilmiştir. Görüldüğü üzere pSA nanoliflerinin yüzeyinde nanogözenek yapılar bulunurken nSA nanoliflerinin yüzeyi düz ve gözeneksizdir.



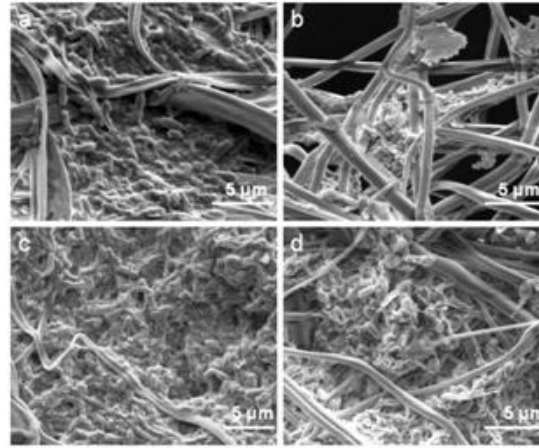
Şekil 34. Elektrospin yöntemi ile üretilmiş (a) nSA nanoliflerinin (b) pSA nanoliflerinin SEM görüntüleri.

Şekil 35'de nSA ve pSA nanoliflerine 7 günlük inkübasyon neticesinde tutunan bakterilerin SEM görüntüleri verilmiştir. Görüntüler (a-b) sırasıyla STB3 ve STB4 bakterileri tutundurulmuş nSA nanoliflerini, (c-d) sırasıyla STB3 ve STB4 bakterileri tutundurulmuş pSA nanoliflerini göstermektedir. 7 günlük inkübasyonun özellikle pSA nanolifleri üzerine bakteri immobilizasyonu için yeterli gelmediği sonucuna varılmış ve inkübasyon yeterli bakteri tutunması sağlanabilmesi için belirli bir süre daha devam ettirilmiştir.



Şekil 35. (a) STB3 tutundurulmuş nSA nanoliflerinin (b) STB4 tutundurulmuş nSA nanoliflerinin (c) STB3 tutundurulmuş pSA nanoliflerinin (d) STB4 tutundurulmuş pSA nanoliflerinin SEM görüntüleri.

İlk deneyden 14 gün sonra (toplam 21 gün) bakteri tutunmasının tekrar incelenmesi için örneklerle SEM analizi uygulanmış, ayrıca bakteri tutunması sayısal olarak VCC (canlı hücre sayımı) yöntemi ile belirlenmiştir. 4 farklı örneğin SEM görüntüleri Şekil 36'da verilmiştir. Bu kez VCC ve SEM sonuçlarına göre bakteri tutunmasının 4 farklı örnek için de yeterli seviyelere geldiği bulunmuştur (Şekil 36, Tablo 3). Örnekler 25. günde alınarak inkübasyon sonlandırılmış ve bu örneklerle SDS giderim deneyleri başlatılmıştır.



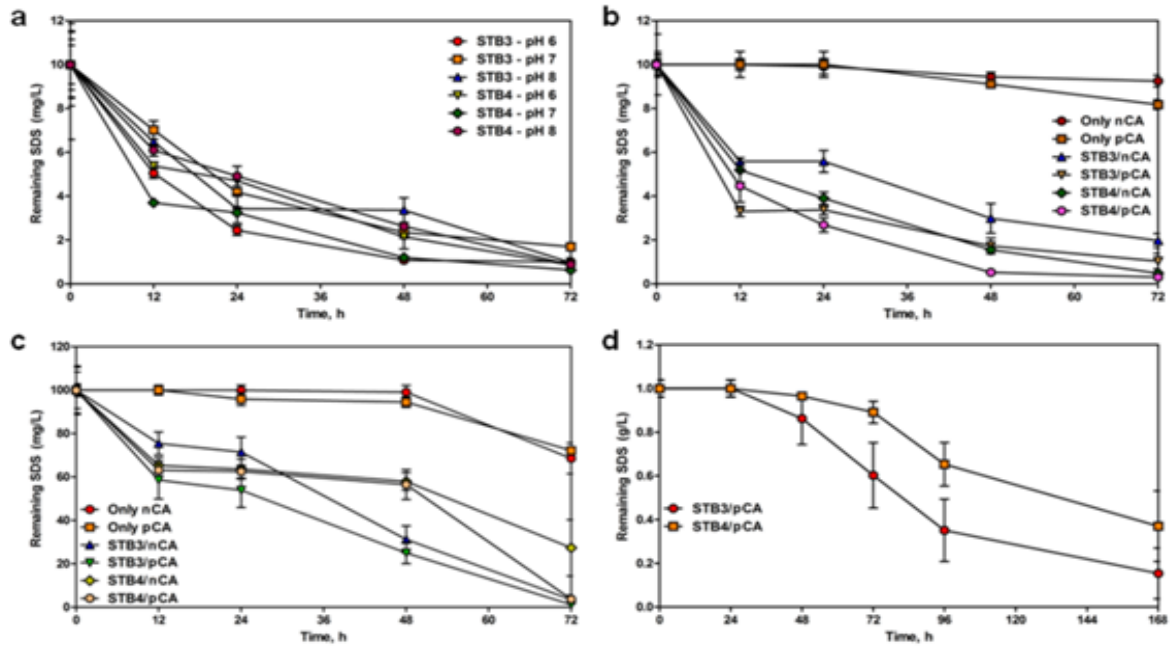
Şekil 36. (a) STB3 tutundurulmuş nSA nanoliflerinin (b) STB3 tutundurulmuş pSA nanoliflerinin (c) STB4 tutundurulmuş nSA nanoliflerinin (d) STB4 tutundurulmuş pSA nanoliflerinin 21 günlük inkübasyon sonrasındaki SEM görüntüleri.

Tablo 3. STB3/nCA, STB3/pCA, STB4/nCA ve STB4/pCA örneklerine uygulanan canlı hücre sayımı (VCC) değerlerinin farklı zaman aralıklarındaki sonuçları. Sonuçlar *cfu/mL*'ye göre hesaplanmıştır. Sayım yapılan her örnek için ağırlık/hacim (w/v) oranı aynı olup bu değer 0,5 mg/mL'dir.

Tutunma süresi	STB3/nCA	STB3/pCA	STB4/nCA	STB4/pCA
7 gün	$0.3 \times 10^9 \pm 0.04$	$0.25 \times 10^9 \pm 0.04$	$3.1 \times 10^9 \pm 1.2$	$1.4 \times 10^9 \pm 0.17$
21 gün	$1.15 \times 10^9 \pm 0.4$	$0.6 \times 10^9 \pm 0.11$	$3.15 \times 10^9 \pm 0.85$	$2.65 \times 10^9 \pm 0.54$
Tekrar kullanımdan sonra	–	$2.97 \times 10^9 \pm 0.42$	–	$2.8 \times 10^9 \pm 0.33$

İlk etapta bakterilerin farklı pH koşullarına dayanıklılığını görmek ve deterjan gideriminin gerçekleştiği optimum pH'ı bulmak için STB3 ve STB4 bakteri suşlarına pH optimizasyonu deneyi uygulanmıştır (Şekil 37a). pH 6, 7 ve 8 için, 10 mg/L başlangıç SDS konsantrasyonunda, STB3 ve STB4 bakterilerinin SDS giderim kapasiteleri test edilmiş ve sonuç olarak bu pH aralıklarında her iki bakterinin performanslarında belirgin farklılıklar ve azalmalar olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Yine de, kendi içlerinde en yüksek giderim oranı pH 7'de STB4 bakterisi için bulunmuş, bu nedenle sonraki deneylerde, özellikle STB4 bakterisinden, en yüksek giderimi elde edebilmek için bu pH değeri seçilmiştir. Daha sonra 10 mg/L başlangıç SDS konsantrasyonunda, pH 7'de, yalnızca nSA ve pSA nanolifleri ile STB3 veya STB4 bakterileri tutundurulmuş nSA ve pSA nanolif biyokompozitlerinin giderim kapasiteleri test edilmiştir (Şekil 37b). Bu sonuca göre 10 mg/L başlangıç SDS konsantrasyonunda örneklerin giderim kapasiteleri birbirine oldukça yakın çıkmış, bu nedenle giderim başarısı noktasında bu konsantrasyonda belirgin bir ayrışma gerçekleştirilememiştir.

Bir sonraki deneyde başlangıç SDS konsantrasyonu 100 mg/L'ye çıkarılarak, örnekler arasında belirgin bir ayrışma sağlanması hedeflenmiştir (Şekil 37c). Nitekim bu konsantrasyonda STB3/pSA ve STB4/pSA örnekleri diğerlerine göre çok daha belirgin farklılıklar göstermiş ve böylece hedeflenen ayrışma gerçekleşmiştir. Bu deneyde de, bir önceki deneyde de yalnızca nSA ve pSA nanoliflerinde minimal düzeyde SDS giderimi gerçekleşmiştir; bu da SDS gideriminde asıl etkenin giderim özelliği bulunan bakterilerin varlığı olduğunu göstermektedir. Son giderim deneyinde, çok yüksek bir konsantrasyonda (1 g/L), önceki deneylerde en yüksek giderimi gerçekleştiren biyokompozitler (STB3/pSA ve STB4/pSA) seçilerek, bu denli yüksek konsantrasyonlarda bakteri/nanolif biyokompozitlerinin giderim başarıları test edilmiştir (Şekil 37d). İlginç olarak, önceki deneylerde giderim başarısı daha az olsa da ve tutunan bakteri miktarı STB4 kadar olmasa da, STB3/pSA biyokompozitinin STB4/pSA'ya göre çok daha başarılı olduğu gözlemlenmiştir, ancak ne yazık ki bu denli yüksek konsantrasyonda %100'e yakın bir giderim elde edilememiş ve giderim prosesi iki örnek için de sürece uzamıştır.



Şekil 37. Sadece PS ve PSU nanoliflerinin, sadece STB5 bakterisinin ve STB5 bakterisi immobilize edilmiş PS ve PSU nanoliflerin 72 saat sonunda 25 mg/L başlangıç Cr(VI) konsantrasyonundaki giderimi.

Çalışmada ayrıca kinetik hesaplamalar da yapılmıştır.

Tablo 4. STB3/pSA ve STB4/pSA örnekleri için adsorpsiyon kinetik sabitleri.

Örnekler	İzoterm	Parametreler	Değerler	Ry ² değeri
STB3/pCA	Freundlich	Kf	184.98	0.991
		1/n	0.555	
	Langmuir	Q _{max}	3367	0.992
		b	0.057	
	Toth	Q _{max}	3023	0.992
		b	0.06	
STB4/pCA	Freundlich	n	4.9	
		Kf	76.78	1.000
	Langmuir	1/n	0.48	
		Q _{max}	1464	1.000
	Toth	b	0.032	
		Q _{max}	1350	1.000
		b	0.031	
		n	4.58	

Adsorpsiyon katsayıları ve tahmin edilen değerlerinden elde edilen izotermier Tablo 4’de verilmiştir. STB3/pSA için Langmuir ve Toth (Ry² = 0.877) üzerinden elde edilen izotermier en iyi model olarak bulunmuştur. STB4/pSA için ise tüm modellerde Ry² = 1.000 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre Langmuir izotermi her iki örnekte de tek başına sivrmediği için SDS giderimi tek tabakalı adsorpsiyon bazındadır denilemez, aksine giderimin çok katmanlı ve heterojen bir yapısı olduğu söylenebilir.

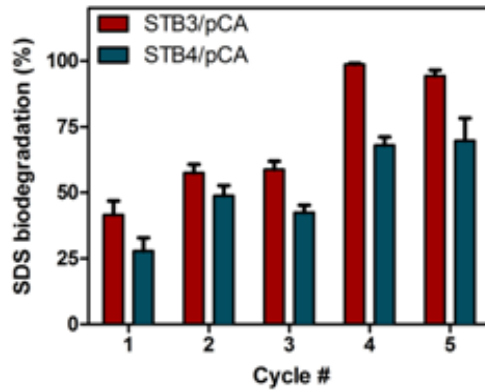
Reaksiyon kinetiği sonuçlarına göre en iyi korelasyonlar her iki örnek için de enzimatik degradasyonlardakine benzer şekilde 0. düzende bulunmuştur (Tinoco vd. 1996) (Tablo 5). Bu beklenen bir durumdur zira, bakteriyel SDS gideriminin enzimatik degradasyon yoluyla gerçekleştiği bilinmektedir.

Tablo 5. Bakteri/PSU-NF kullanılarak Cr(VI) ve RB5 boyar madde gideriminde hesaplanan birinci, ikinci ve üçüncü eğriden elde edilen R² değerleri.

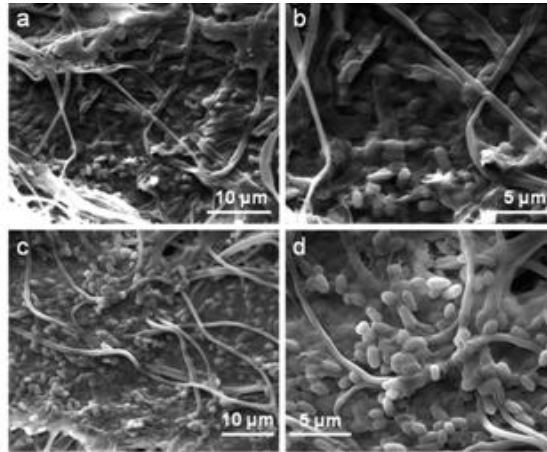
Örnekler	Model	R ² değerleri
STB3/pCA	zero order	0.9319
	first order	0.8583
	second order	0.6515
	third order	0.6246
STB4/pCA	zero order	0.8531
	first order	0.7414
	second order	0.6434
	third order	0.6249

SDS giderimi deneylerinden sonra, STB3/pSA ve STB4/pSA örneklerine daha başarılı oldukları 100 mg/L’de tekrar kullanılabilirlik testi uygulanmıştır. Bir önceki deneyde örnekler çok yüksek konsantrasyonda SDS’e maruz kaldığı için ilk denemelerde SDS giderimleri

oldukça düşük olmasına rağmen, 3. denemeden sonra örnekler SDS giderim özelliklerini geri kazanarak (özellikle STB3/pSA için) istenilen seviyelere ulaşmış ve bu hali devam ettirmiştir (Şekil 38). Bu sonuca göre STB3/pSA ve STB4/pSA biyokompozitlerinin tekrar kullanılabilirlik potansiyeline sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Tekrar kullanılabilirlik testi sonunda çekilen SEM görüntülerine göre nanolif yapıları morfolojilerini devam ettirmekte ve bakteriler nanolif yüzeylerindeki varlığını korumaktadır (Şekil 39). Tablo 3’de görülebileceği üzere tutunmuş olan bakteri miktarları tekrar kullanım testi sonrasında istenilen seviyelerde olup, bu sonuç Şekil 39’daki sonuçla paraleldir.



Şekil 38. STB3/pSA ve STB4/pSA biyokompozitlerinin tekrar kullanılabilirlik testi sonuçları.



Şekil 39. (a-b) STB3 tutundurulmuş pSA nanoliflerinin (c-d) STB4 tutundurulmuş pSA nanoliflerinin tekrar kullanılabilirlik testi sonrasında çekilen farklı büyütme ölçeklerindeki SEM mikrografları.

Bu çalışmada elektrospin yöntemi ile elde edilmiş nSA ve pSA nanolifleri üzerine SDS giderim özelliği bulunan *Serratia proteamaculans* STB3 ve *Achromobacter xylosoxidans* STB4 bakterileri immobilize edilerek, atık sulardaki deterjan kontaminasyonunu giderme potansiyeli bulunan özgün biyokompozit malzemeler elde edilmiştir. Basit, etkili ve tekrar kullanılabilir

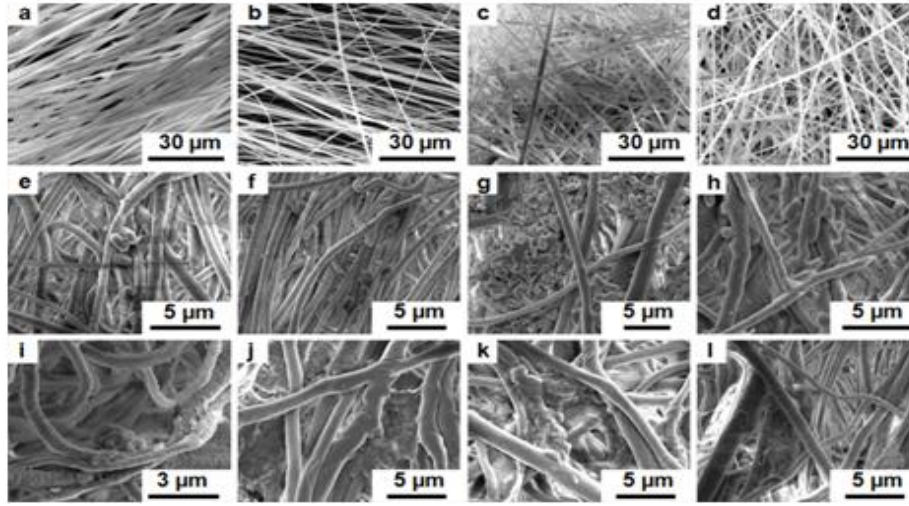
olmasından dolayı elde edilen nano biyokompozit malzemelerin endüstriyel atıksulardaki deterjan kimyasallarının temizliğinde kullanılabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmamız ***“Evaluation of contact time and fiber morphology on bacterial immobilization for development of novel surfactant degrading nanofibrous webs”*** başlığı altında *RSC Advances* dergisinde yayınlanmıştır (Sarioglu vd., 2015).

4.1.15. PSU nanoliflerinin paralel ve düzensiz morfolojilerde iki farklı çapta elde edilmesi ve yüzeyine bakteri immobilizasyonu

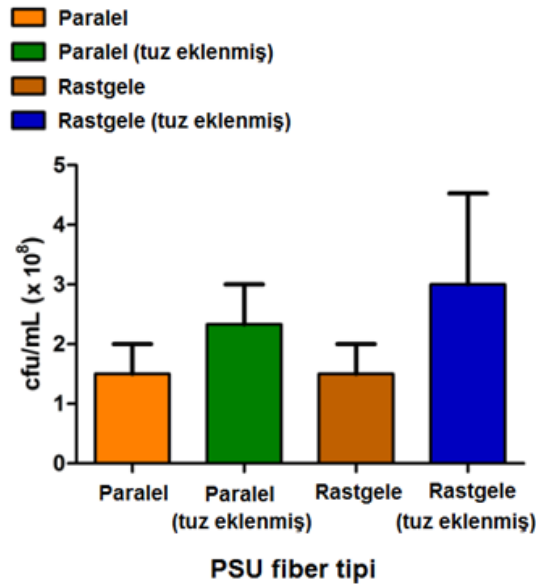
Projenin bu adımında, PSU nanoliflerinin makroskobik düzeyde dizilimleri farklılaştırılarak, bakteri immobilizasyonuna ve arıtım verimine olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bunun için öncelikle, düzensiz ve paralel diziliimli PSU nanolifleri üretilmiştir. Düzensiz (rastgele diziliimli) yapıdaki PSU nanolifleri, %32'lik polisülfon (PSU) polimer tozunun 9/1 (h/h) oranında N,N-dimetilasetamid (DMAC)/aseton karışımı içerisinde çözünmesiyle elde edilen çözeltinin elektrospin edinmesi ile üretilmiştir. Polimer çözeltileri 1 mL'lik şırıngaların (iğne ucu: 0,4 – 0,6 mm) içine doldurulmuş, daha sonra bu şırıngalar yatay bir şekilde, akış hızı 0,5 mL/saat olarak ayarlanan pompanın (Model: SP 101IZ, WPI) üzerine yerleştirilmiştir. Yüksek voltajlı güç kaynağının (Matsusada Precision, AU Series) elektrotlarından biri metal iğnenin ucuna diğeri de topraklanmış metal levhaya bağlanmış ve 10 - 15 kV'luk yüksek voltaj uygulanmıştır. Böylece nanolifler yaklaşık 10 cm uzaklıkta bulunan ve üzerine alüminyum folyo sarılmış toplayıcıya, 23 ± 1 °C sıcaklıkta ve yaklaşık %20 bağıl nem koşullarında kapalı bir ortamda toplanmaya başlanmıştır. Paralel diziliimli PSU nanolifleri ise, yine aynı çözelti ve elektrospin parametrelerinde ancak 3000 rpm hız ile dönen tambur üzerinde toplanarak elde edilmiştir. Bunlara ek olarak, nanolif çapında meydana gelebilecek bir farklılığın da etkisini ortaya koyabilmek için, hem düzensiz hem de paralel diziliimli PSU nanolif çözeltilerine %2 (w/w) NaCl tuzu eklenmiş ve her iki durum için de çaplarda belirgin bir azalış saptanmıştır. Elde edilen nanoliflerin çapları paralel diziliimli ve tuz eklenmemiş PSU nanolifi için 1517 ± 54 nm, paralel diziliimli ve tuz eklenmiş PSU nanolifi için 864 ± 84 nm, rastgele diziliimli ve tuz eklenmemiş PSU nanolifi için 1455 ± 83 nm, rastgele diziliimli ve tuz eklenmiş PSU nanolifi için ise 1066 ± 140 nm olarak ölçülmüştür.

Paralel diziliimli ve düzensiz morfolojide üretilen PSU nanolif yüzeylerine bakteri immobilizasyonunu gerçekleştirmek, bunu yaparken de nanolif morfolojilerini olabildiğince muhafaza etmek adına (özellikle paralel diziliimli PSU nanolifleri için) alüminyum folyo üzerinde büyütülmüş nanolif örnekleri birbirine çok yakın büyüklük ve ağırlıkta (ort. 28 mg) kesilerek folyodan ayrıştırılmamıştır. Bu haldeki örnekler sıvı bakteri kültürüne (LB büyüme ortamı) eklenerek inkübasyon süresi boyunca örnek yüzeylerinde bakteri immobilizasyonu

hedeflenmiştir. Bakteri olarak daha önceki çalışmalarda kullanılmış, kuvvetli bir şekilde biyofilm oluşturma özelliğine sahip, aynı zamanda amonyum dönüştürücü özelliği bulunan *Acinetobacter calcoaceticus* STB1 suşu kullanılmıştır. İlk kez 7. günün sonunda, daha sonra 21. günün sonunda benzer özellikteki örnekler alınarak SEM analizi uygulanmış ve önceki raporumuzda bahsedilen protokolle örneklerden bakteri ayrıştırılması sağlanarak canlı koloni sayımı (VCC) yöntemi uygulanmıştır. Tutunmuş olan bakteri miktarı her bir örnek için 10^8 cfu/mL (koloni oluşturma birimi, KOB/mL) seviyelerinde bulunmuştur. SEM sonuçlarına göre yer yer paralel dizilimli morfoloji korunuyor olsa da, paralel dizilimli PSU nanoliflerinin sucul bir ortamda çalkalanması veya SEM analizi öncesinde fiksasyon aşamasından geçmesi dolayısıyla paralel diziliminin ilk haline göre bir miktar bozulduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bakterilerin tutunma aşamasında sucul ortamda büyümesi gerektiği için paralel dizilimin muhafaza edilmesi için yukarıda bahsedilenlerden ayrı ekstra bir önlem alınamamıştır. Ancak paralel dizilimin yer yer bozulsa da rastgele haldeki PSU nanoliflerine göre belli ölçülerde korunduğu, en azından ilk temas sürecindeki bu farklılığın bakteri tutunmaları üzerinde farklı sonuçlara neden olduğu gözlemlenmiştir. Bakteri tutunmamış haldeki PSU nanoliflerinin, 7 gün boyunca bakteri tutunmuş PSU nanoliflerinin ve 21 gün boyunca bakteri tutunmuş PSU nanoliflerinin SEM görüntüleri Şekil 40'da verilmiştir. Bu sonuçlara göre 7 günlük bakteri tutunması bazı örnekler için yeterli olmazken, 21 günlük bakteri tutunmasının tüm örnekler için yeterli geldiği gözlemlenmiştir. Şekil 41'de bakteri tutundurulmuş farklı morfolojideki eşlenik nanolif örneklerine bakteri sayımı uygulanması sonucu elde edilen VCC sonuçları yer almaktadır. Bu sonuçlara göre tuz eklenerek çapı inceltilmiş PSU nanoliflerinde daha iyi bakteri tutunması olduğu bulunurken, çapı inceltilmiş PSU nanolifleri arasında en yüksek tutunmanın ise rastgele morfolojideki PSU nanolifleri için olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre, daha ince yapıdaki PSU nanoliflerinin daha iyi bakteri tutunmasını sağladığı sonucuna ulaşılırken, rastgele dizilimli PSU nanoliflerinin paralel dizilimli PSU nanoliflerine göre eşlenik örneklerde daha çok bakteri tuttuğu sonucuna ulaşılmıştır. Rastgele dizilimli PSU nanoliflerinde daha fazla bakteri tutunması olmasının sebebi bakterilerin nanolif yüzeylerinin yanı sıra boş bulduğu aralıklara girerek daha fazla tutunma gerçekleşmesi olabilir. Bu sonuçlar neticesinde rastgele dizilimli ve tuz eklenerek çapı inceltilmiş PSU nanoliflerinin 4 farklı morfolojideki PSU nanolifleri içerisindeki en yüksek bakteri tutunmasını sağlayan nanolif olduğu sonucuna ulaşılmış ve daha sonraki çalışmalar bu yapıdaki PSU nanolifleri ile gerçekleştirilmiştir.

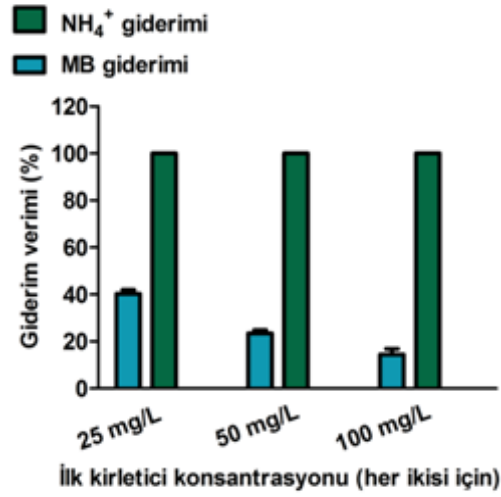


Şekil 40. (a, e, i) Tuz ilave edilmemiş paralel morfolojideki PSU nanoliflerinin (b, f, j) tuz ilave edilmiş paralel morfolojideki PSU nanoliflerinin (c, g, k) tuz ilave edilmemiş rastgele morfolojideki PSU nanoliflerinin (d, h, l) tuz ilave edilmiş rastgele morfolojideki PSU nanoliflerinin SEM mikrografları. (a-d) grubu bakteri tutunmamış nanolifleri, (e-h) grubu 7 gün boyunca bakteri tutundurulmuş nanolif örneklerini, (i-l) grubu ise 21 gün boyunca bakteri tutundurulmuş nanolif örneklerine tekabül etmektedir. Tuz ilave edilmiş örneklerde lif çapının belirgin şekilde azaldığı görülmektedir.

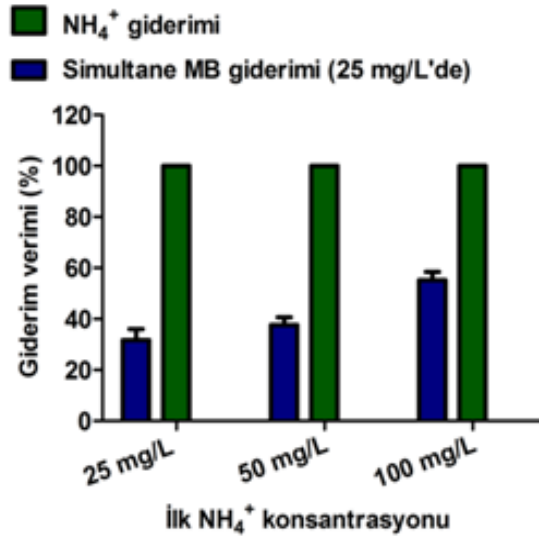


Şekil 41. (a) Paralel diziliimli PSU nanoliflerine, (b) tuz ilave edilmiş paralel diziliimli PSU nanoliflerine, (c) tuz ilave edilmemiş rastgele diziliimli PSU nanoliflerine, (d) tuz ilave edilmiş rastgele diziliimli PSU nanoliflerine 21 günlük bakteri tutunmasının ardından VCC yöntemi uygulanması sonucunda elde edilen bakteri miktarları.

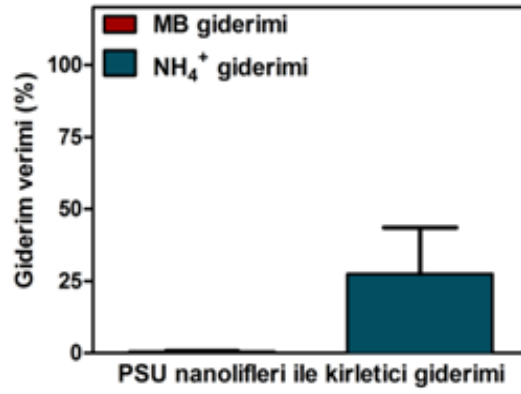
İlk etapta nanolif yüzeyine tutundurulmamış, serbest haldeki STB1 bakterileri üzerinde giderim çalışmaları yapılmıştır. Amonyum giderimi özelliği olduğu bilinen bu bakterinin metilen mavisi giderim özelliğinin olup olmadığını test etmek için 50 mg/L sabit amonyum içeren ve başka azot kaynağı içermeyen minimal büyüme ortamı içerisine 25, 50 ve 100 mg/L'lik metilen mavisi ilave edilerek 72 saat içerisindeki metilen mavisi giderimine bakılmıştır. Kirleticilerin giderimi önceki raporumuzda belirtilen şekilde spektrofotometrik olarak takip edilmiştir. 50 mg/L'lik sabit amonyum konsantrasyonunda, metilen mavisi konsantrasyonu arttıkça, giderim yüzdesinin azaldığı ve %20'nin altına düştüğü görülmektedir (Şekil 42). 25, 50 ve 100 mg/L'lik amonyum konsantrasyonları için ise 72 saat içerisinde ortamdaki amonyumun tamamen uzaklaştırıldığı ve hiç kalmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu sonuçlar neticesinde 21 gün boyunca STB1 bakterileri tutundurulmuş, rastgele dizilimli ve tuz eklenerek inceltilmiş PSU nanolifleri, hem amonyum hem de metilen mavisi içeren 3 farklı ortamda test edilmiştir. Önceki çalışmada elde edilen sonuç baz alınarak ortamdaki metilen mavisi konsantrasyonu sabit tutularak 25 mg/L olarak belirlenmiş, bu koşullarda amonyum konsantrasyonu artırılarak ortamdaki amonyum miktarının metilen mavisi giderimi üzerindeki etkisine bakılmıştır. Sonuç olarak, beklenenin aksine, test edilen konsantrasyonlarda amonyum miktarındaki artış metilen mavisi giderimi üzerinde pozitif etki yapmış ve 100 mg/L amonyum içeren ortamda metilen mavisi giderimi %60 seviyelerine kadar ulaşmıştır (Şekil 43). Bu sonuca göre, optimum koşullarda ve konsantrasyonlarda, her iki kirleticinin birden etkili şekilde giderilebileceği sonucuna ulaşılmıştır. Saf haldeki PSU nanoliflerinin amonyum (100 mg/L) ve metilen mavisi (25 mg/L) giderim kapasiteleri de eş koşullarda test edilmiş ve PSU nanoliflerinin metilen mavisi giderim kapasitesinin yok denecek kadar az olduğu bulunurken, amonyum giderim kapasitesinin %25 seviyelerinde olduğu bulunmuştur (Şekil 44). Bu farklılığın nedeninin sülfon gruplarının amonyumu tutarken, metilen mavisi üzerinde bu etkinin görülmemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca saf haldeki PSU nanoliflerinin amonyum gideriminin minimal düzeylerde olmayıp belli bir düzeye sahip olmasına karşılık, STB1/PSU örneklerinin göstermiş olduğu %100 civarındaki amonyum gideriminin ve önemli miktardaki metilen mavisi gideriminin başlıca kaynağının bakteri varlığı ve biyolojik giderim olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 42. Serbest haldeki STB1 bakterilerinin değişen konsantrasyonlarda (25, 50, 100 mg/L) metilen mavisi (MB) veya amonyum (NH₄⁺) giderim kapasiteleri (sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 150 rpm, inkübasyon süresi: 72 saat). Büyüme ortamında karbon kaynağı bulunmasına karşılık azot kaynağı bulunmadığı için metilen mavisi giderim deneylerinde azot kaynağı olarak 50 mg/L sabit amonyum kullanılmıştır. Amonyum giderimi deneylerinde ise glukoz dışında ekstra bir karbon kaynağı kullanılmamıştır.

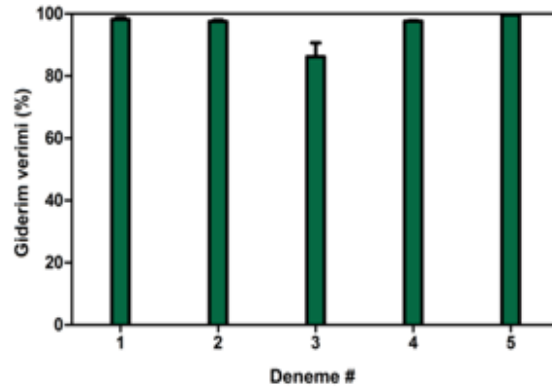


Şekil 43. STB1/PSU nanoliflerinin 25 mg/L sabit metilen mavisi (MB) ve değişen konsantrasyonlarda amonyum (NH₄⁺) içeren (25, 50, 100mg/L) büyüme ortamlarında, simültane amonyum ve metilen mavisi giderimi (sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 150 rpm, inkübasyon süresi: 72 saat).



Şekil 44. Saf haldeki PSU nanoliflerinin metilen mavisi (MB) ve amonyum (NH₄⁺) giderim verimleri (sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 150 rpm, inkübasyon süresi: 72 saat).

Son olarak, STB1 bakterileri tutundurulmuş rastgele diziliimli ve tuz ilave edilmiş PSU nanoliflerinin tekrar kullanılabilirlikleri yüksek giderim başarısı gösterilen 100 mg/L sabit amonyum konsantrasyonunda test edilmiştir. Sonuçlar Şekil 45’de verilmektedir. Bu sonuçlara göre, elde edilen nanoliflerin tekrar kullanılabilir olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca bu konsantrasyonda metilen mavisi gideriminin de test edilenler arasında en yüksek oranda gerçekleştiği görüldüğü için nanoliflerin bu kirleticinin giderimi için de tekrar kullanılabilir olduğu düşünülmektedir.



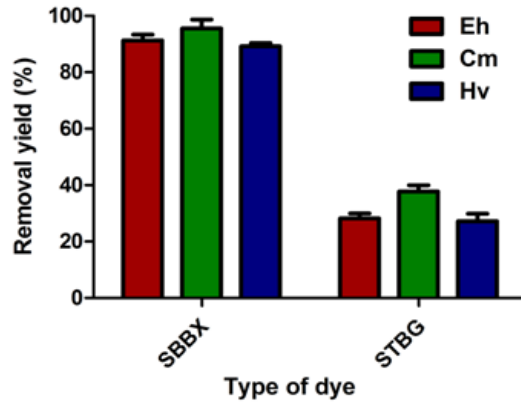
Şekil 45. STB1/PSU nanoliflerinin 100 mg/L sabit amonyum konsantrasyonunda 5 seferlik tekrar kullanılabilirlik testi sonucu (Sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 150 rpm, inkübasyon süresi: 72 saat).

4.1.15. Biyobozunur özellikteki PCL ve PLA nanoliflerine bakteri immobilizasyonu ve bu nanoliflerin tekstil boyar madde gideriminde kullanımı

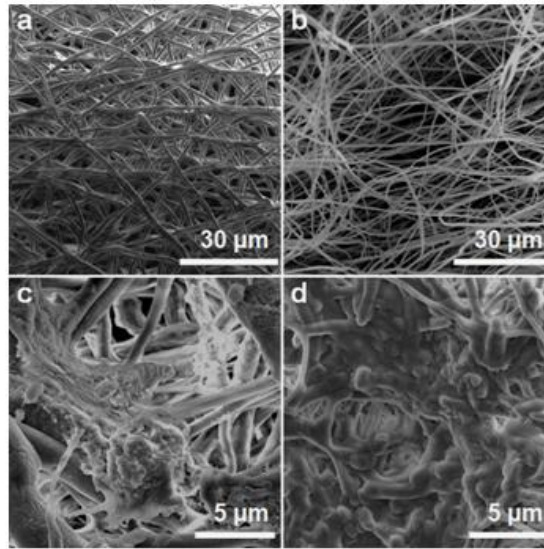
Projenin bu kısmında, kimyasal yapısı itibariyle biyobozunur karakterde olan polikaprolakton (PCL) ve polilaktikasit (PLA) polimerleri ile homojen ve boncuksuz yapıda nanolifler elde

edilmiş, daha sonra tekstil boyar madde giderim özelliği bulunan bakteriler nanolif yüzeylerine immobilize edilmiştir. Elde edilen biyokompozitler daha sonra sudaki boyar madde giderimi çalışmalarında test edilerek değerlendirilmiştir. Tüm kimyasallar (polikaprolakton (PCL, Mw ~70.000-90.000, Scientific Polymer Products, Inc.), polilaktik asit (PLA, NatureWorks LLC Co.), diklorometan (DCM, ≥99% (GC), Sigma-Aldrich), N,N-Dimetilformamid (DMF, ≥99% (GC), Sigma-Aldrich), tekstil boyaları (Setazol Blue BRF-X, Setazol Turquoise Blue G (Setaş), LB büyüme ortamı (Luria-Bertani, Sigma-Aldrich) ve Agar (Sigma-Aldrich)) mümkün olan en yüksek saflıkta temin edilmiştir. Homojen yapıdaki elektrospin solüsyonları PCL ve PLA polimerlerini sırasıyla DCM/DMF (1/1 (v/v)) ve DCM/DMF (7/3 (v/v)) karışımlarında %15 (w/v) polimer konsantrasyonunda çözerek hazırlanmıştır. Elektrospin solüsyonları 0,4-0,6 mm iğne ucu genişliğine sahip 3 mL'lik şırıngaya eklenmiş, daha sonra yatay bir şekilde şırınga pompasına yerleştirilmiş olan şırıngaya yüksek voltaj uygulanmıştır. Metal uçlardan birisi yüksek voltajı iletirken diğeri alüminyum folyoya sarılmış haldeki toplayıcıya tutunarak topraklanmayı sağlamıştır. Elektrospin parametreleri şöyledir: akış hızı = 0.5 mL/h, uygulanan voltaj = 10-15 kV, toplayıcıya olan uzaklık = 10-12 cm. Elektrospin protokolü kapalı haldeki pleksicam bir kutu içerisinde yürütülmüştür (oda sıcaklığı ve %20 bağıl nem koşullarında). Alüminyum folyo üzerinde toplanan nanolifler bir gece boyunca çözücü solventlerin uzaklaştırılması için çeker ocakta bekletildikten sonra nanolifler ayrıştırılarak sonraki deneyler için hazırlanmıştır. Elde edilen nanoliflerin çapları PCL ve PLA nanolifleri için sırasıyla 1280 ± 90 ve 840 ± 80 nm olarak ölçülmüştür.

PCL ve PLA nanolifleri için eşlenik örnekler hazırlanarak (0,5 mg/mL, w/v) bakteri tutunması için 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. Tutunacak bakteri ve giderimi yapılacak boyanın seçilmesi için bir ön çalışma yapılmış, bu sonuca göre elimizdeki üç farklı izole (*Enterococcus hermanniensis*, *Clavibacter michiganensis* and *Halomonas variabilis*) giderim başarısı yönüyle en yüksek olanı (*Clavibacter michiganensis*), ve iki farklı boya arasından da (Setazol Blue BRF-X ve Setazol Turquoise Blue-G) biyogiderimin daha kolay olduğu boya (Setazol Blue BRF-X) sonraki çalışmalar için seçilmiştir (Şekil 46). 7 günlük inkübasyonun sonunda eşlenik örneklerden bir kısmı SEM analizi ile incelenmiş, yeterli bakteri tutunması tespit edildikten sonra diğer örneklerle giderim çalışmalarına başlanmıştır. Bakteri tutunmamış haldeki PCL ve PLA nanolifleri ile, 7 gün boyunca bakteri tutunmuş PCL ve PLA nanoliflerinin SEM görüntüleri Şekil 47'de verilmiştir.



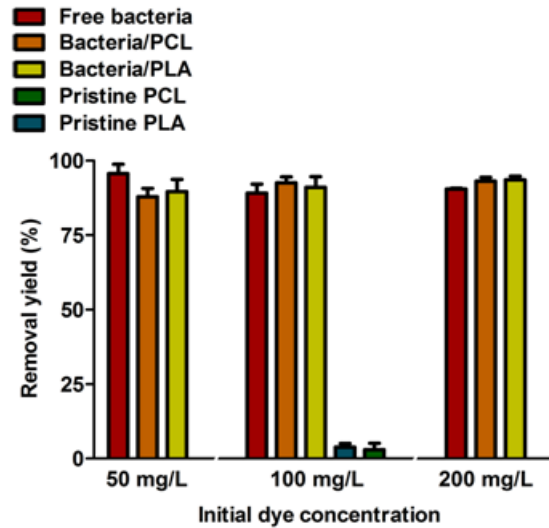
Şekil 46. Üç farklı bakteri izolesinin (Eh: *Enterococcus hermanniensis*, Cm: *Clavibacter michiganensis*, Hv: *Halomonas variabilis*) iki farklı tekstil boyar maddesine karşı (SBBX: Setazol Blue BRF-X ve Setazol Turquoise Blue-G) 50 mg/L'lik başlangıç konsantrasyonlarında 48 saat içerisindeki boya giderim yüzdeleri.



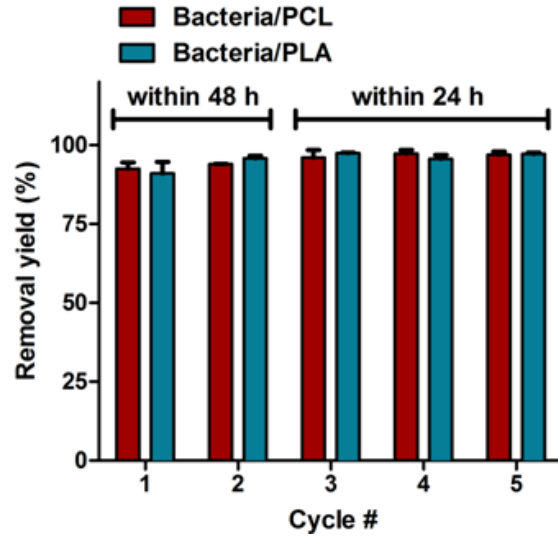
Şekil 47. (a) Saf haldeki PCL nanoliflerinin (b) saf haldeki PLA nanoliflerinin (c) 7 günlük inkübasyon sonrasında bakteri tutunmuş PCL nanoliflerinin (d) 7 günlük inkübasyon sonrasında bakteri tutunmuş PLA nanoliflerinin SEM görüntüleri.

Ön çalışmada, farklı bakteri izoleleri her iki boya için de 50'şer mg/L başlangıç konsantrasyonunda test edilmiştir. Bu konsantrasyonun tercih edilen Setazol Blue BRF-X boyasının giderimi için uygun olduğu gözlemlenmiş ve sonraki çalışmalar için 100 ve 200 mg/L'lik başlangıç konsantrasyonları da test edilmek istenmiştir. Şekil 48'de görüleceği üzere, *Clavibacter michiganensis* bakterisi tutundurulmuş olan PCL ve PLA nanolifleri, 50, 100 ve 200 mg/L'lik başlangıç konsantrasyonlarının her birinde serbest haldeki bakterilere yakın oranda yüksek giderim göstermiş, ayrıca saf haldeki PCL ve PLA nanolifleri için bu

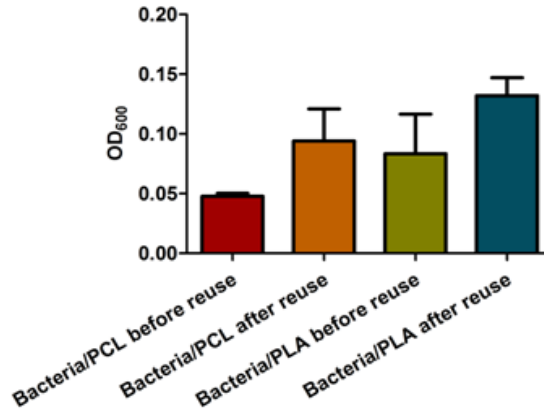
süreçte minimal düzeyde giderim gözlenmiştir. Bu şu anlama gelmektedir; biyokompozitlerin boya giderim özellikleri yüzeyinde bulunan bakteriler aracılığı ile sağlanmaktadır. Bu sonucun akabinde biyokompozitlerin tekrar kullanılabilirliği test edilmiştir. Her bir kullanımda, 100 mg/L'lık başlangıç konsantrasyonu için biyokompozitler %100'e yakın bir giderim göstermiş, ayrıca ilk denemelerde 48 saatte tamamlanan biyogiderim süreleri sonraki denemelerde 24 saate düşmüştür (Şekil 49). Bunun nedeninin nanolif yüzeyindeki aktif bakteri sayısındaki artış olduğu düşünülmüştür. Bunu desteklemek amacıyla tekrar kullanılabilirlik testinden sonra eşlenik örnekler daha önceden bahsedilen bakteri ayrıştırma protokolü uygulanmış, daha sonra tekrar kullanılabilirlik testinin öncesi ve sonrasındaki örneklerin optik yoğunlukları (OD₆₀₀ değerleri) kendi aralarında karşılaştırılmıştır. Bu sonuca göre tekrar kullanılabilirlik testi süresince canlı bakteri miktarı PCL ve PLA nanolifleri için ciddi oranda artmıştır (Şekil 50). Son olarak tekrar kullanılabilirlik testi sonrasında PCL ve PLA nanoliflerinin yüzeyindeki bakteri tutunması SEM analizi ile görüntülenmek istenmiştir. Şekil 51'de görüleceği üzere her iki biyokompozitte de kuvvetli bakteri tutunması görülmektedir ve bu sonuç diğer sonuçlarımızı desteklemektedir. Bu çalışmamız "***Bacteria immobilized electrospun polycaprolactone and polylactic acid fibrous webs for remediation of textile dyes in water***" başlığı altında *Journal of Colloid and Interface Science* dergisine yayınlanmak üzere gönderilmiştir.



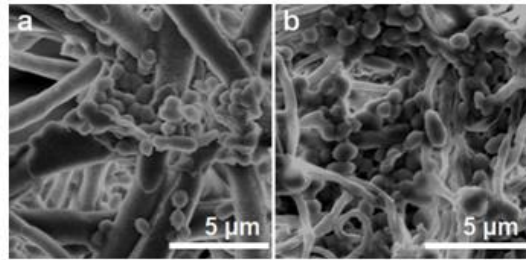
Şekil 48. Serbest haldeki *Clavibacter michiganensis* bakterilerinin, bakteri tutundurulmuş PCL ve bakteri tutundurulmuş PLA nanoliflerinin, ve saf haldeki PCL ve PLA nanoliflerinin 50, 100 ve 200 mg/L'lık başlangıç boyar madde konsantrasyonlarındaki giderim yüzdeleri (sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 150 rpm, inkübasyon süresi: 48 saat).



Şekil 49. Bakteri tutundurulmuş PCL ve PLA nanoliflerinin 100 mg/L'lik başlangıç boyar madde konsantrasyonu için tekrar kullanılabilirlik testi sonucu (3. tekrardan itibaren giderim süresi 48 saatten 24 saate düşmüştür).



Şekil 50. Bakteri tutundurulmuş PCL ve PLA örneklerinin tekrar kullanılabilirlik testinin öncesi ve sonrasındaki optik yoğunluk (OD₆₀₀) değerleri. Tekrar kullanılabilirlik testi sonrasında her iki örnek için de optik yoğunlukların bakteri artışına bağlı olarak arttığı görülmektedir.



Şekil 51. Tekrar kullanılabilirlik testi sonrasında (a) bakteri tutundurulmuş PCL (b) bakteri tutundurulmuş PLA örneklerinin SEM mikrografları. Her iki örnekte de kuvvetli bakteri tutunması görülmektedir.

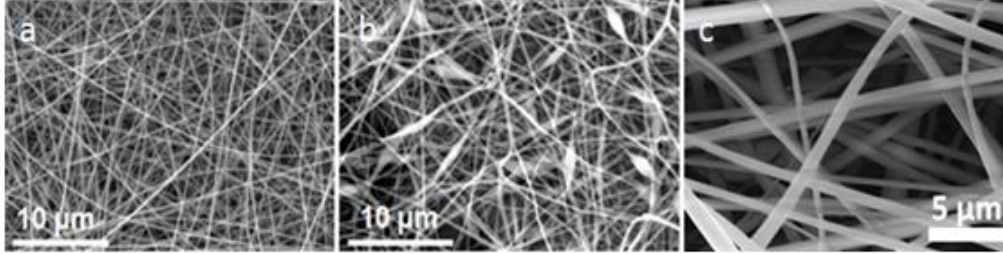
4.2 Bakterilerin nanolif yapısına direkt enkapsülasyonu ve hazırlanan nanoliflerin atık su arıtımında kullanılması

4.2.1 Bakterilerin PVA, PEO ve CD nanoliflerine eş zamanlı enkapsülasyonu için proses parametrelerinin belirlenmesi ve homojen, boncuksuz nanoliflerin elde edilmesi.

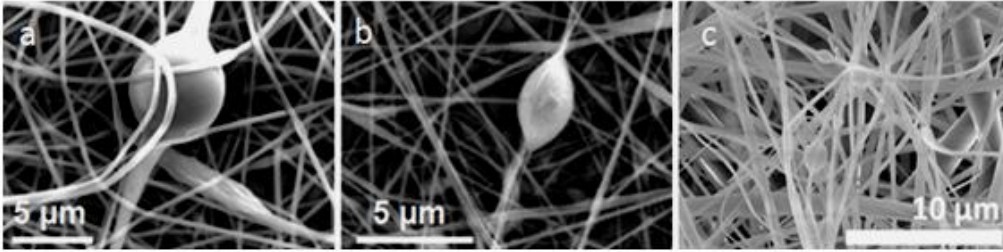
Projenin bu aşamasında sulu sistemde hazırlanan polivinil alkol (PVA), polietilen oksit (PEO) ve siklodekstrin (CD veya SD) nanoliflerinin içerisine bakteri enkapsülasyonu gerçekleştirilerek atık su gideriminde kullanılabilirlikleri test edilmiştir. İçerisine bakteri enkapsülasyonu yapılan nanolifler için gerekli optimizasyonlar yapılarak, homojen ve boncuksuz yapıda nanoliflerin elde edilmesine çalışılmıştır. Üretilen tüm nanolifler homojen yapıda üretilmesine rağmen, yalnızca PEO nanolifleri için boncuksuz yapıda nanolifler elde edilememiştir. Buna karşın bakteri enkapsülasyonu tüm örneklerde başarıyla gerçekleştirilmiştir. PVA nanolifleri için PVA polimerleri bakteri/su (~4 mg/mL oranında bakteri, yaklaşık olarak 10^{10} cfu/mL'ye karşılık gelmekte) çözücü karışımında %7,5 polimer konsantrasyonunda, PEO nanolifleri için PEO polimerleri bakteri/su (~4 mg/mL oranında bakteri, yaklaşık olarak 10^{10} cfu/mL'ye karşılık gelmekte) çözücü karışımında %3,5 polimer konsantrasyonunda, SD nanolifleri için ise hidrokispropil- β -siklodekstrin (HP β CD) polimerleri % 0,5'lik skimmilk besiyeri içerisinde %200 (w/v) konsantrasyonunda hazırlanmıştır. Ayrıca bakteri içermeyen nanolifler de üretilerek, bakteri enkapsüle edilmiş ve saf haldeki nanoliflerin farklılığına bakılmıştır. Saf haldeki PVA ve PEO nanoliflerinin çapları sırasıyla $418,6 \pm 33,8$ ve $232,5 \pm 22,3$ nm olarak ölçülürken, saf haldeki SD nanolifleri için 605 ± 205 nm olarak ölçülmüştür. Yeterli bakteri enkapsülasyonunun sağlanabilmesi için bakteri miktarını belirlemede gerekli optimizasyonlar yapılmıştır. PVA ve PEO nanoliflerine bakteri enkapsülasyonu yapılmadan önce, polimer solüsyonlarına gerekli bakteri ilavesi yapılabilmesi için ilk etapta bakteri miktarının bakterilerin 600 nm'de verdiği optik yoğunluk üzerinden belirlenmeye çalışılmıştır. Ancak çok yüksek optik yoğunluğa sahip bakteri ilavesi olduğunda dahi enkapsüle edilmiş canlı bakteri sayısı istenilen düzeylerde olmamıştır. Bu nedenle bakteri miktarının belirlenebilmesi için optik yoğunluk yerine biyokütle üzerinden değerlendirme yapılmasına karar verilmiştir. Bir gece boyunca büyütülmüş bakteriler yeterli sayıya ulaştıktan sonra santrifüjle çöktürülmüş, daha sonra süpernatant kısmı uzaklaştırılarak biyokütle üzerine belirli miktarda distile su ilavesi yapılarak 10 kat yoğunlaştırılmıştır. Böylece yüksek yoğunluklu bakteri çözeltileri elde edilebilmiştir. Eşlenik örnekler üzerinde yaptığımız kuru bakteri biyokütlesi tayinine göre bu biyokütle oranının nihai elektrospin çözeltisi için yaklaşık olarak 4 mg/mL olduğu tespit edilmiştir. SD nanolifleri için ise bakteri miktarı SD miktarına göre oransal olarak ilave edilerek, farklı oranlardan

hangisinin yeterli bakteri canlılığı için uygun olduğu tespit edilmiştir. Bu amaçla %0,25, %0,5, %1 ve %2 oranlarında (solüsyondaki SD miktarına oranlandığında) bakteri miktarları enkapsülasyon amacıyla test edilmiş ve % 1 oranının yeterli bakteri enkapsülasyonu ve canlılığı için uygun olduğu gözlemlenmiştir. Böylece PVA, PEO ve SD nanolifleri için gerekli bakteri miktarları tespit edilerek, sonraki çalışmalar için nanolifler üretilirken bu oranlar benimsenmiştir. Eknkapsüle edilen bakteriler iki farklı çalışma için iki farklı şekilde belirlenmiştir. İlki, PVA ve PEO nanoliflerine enkapsüle edilmek üzere seçilen metilen mavisi (MB) giderici özelliği bulunan *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 47085) suşu iken, diğeri de SD nanoliflerine enkapsüle edilmek üzere seçilen ağır metal giderici özelliği bulunan *Lysinibacillus* sp. NOSK suşudur. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 47085 suşu daha önceden satın alınmışken, *Lysinibacillus* sp. NOSK suşu kendi izolelerimizdir. Polimer/polimer-bakteri çözeltilerinin homojen bir şekilde çözünmesi sonucu elde edilen çözeltiler daha sonra elektrospin sistemine yüklenmişlerdir. Bunun için, her bir polimer çözeltisi ayrı olarak, 1 mL'lik şırıngaların (iğne ucu: 0,4 – 0,6 mm) içine doldurulmuştur. Daha sonra bu şırıngalar, yatay bir şekilde, akış hızı 0,5 mL/saat olarak ayarlanan pompanın (Model: SP 101IZ, WPI) üzerine yerleştirilmiştir. Yüksek voltaj güç kaynağının (Matsusada Precision, AU Series) elektrotlarından biri metal iğnenin ucuna diğeri de topraklanmış metal levhaya bağlanmış ve 10 - 15 kV'luk yüksek voltaj uygulanmıştır. Böylece nanolifler yaklaşık 10 cm uzaklıkta bulunan ve üzerine alüminyum folyo sarılmış toplayıcıya, 23 ± 1 °C sıcaklıkta ve yaklaşık %20 bağıl nem koşullarında kapalı bir ortamda toplanmaya başlanmıştır. Bu kadar yüksek voltajın bakteri canlılığı üzerinde negatif etkisinin olduğu bilinmesine rağmen istenilen özellikte nanoliflerin elde edilebilmesi için bu kadar yüksek voltaj uygulanması gerekmiştir. Bu yüzden bakteri canlılığını elektrospin işlemi sonrasında istenilen düzeylerde tutabilmek için, elektrospin çözeltisindeki bakteri oranı mümkün olduğunca yoğunlaştırılarak, bakteri kaybında bile yeterli miktarda canlı bakteri kalabilmesi hedeflenmiştir. Su dışında herhangi bir zararlı kimyasal/çözgen kullanılmadığından bakteri canlılığına voltaj dışında etki eden bir etken olmamıştır. Ayrıca elektrospin işlemi sırasında kullanılan tüm malzemeler ve kapalı kabin otoklavla, etil alkolle veya UV-C ışığı ile sterilize edildiği için dışarıdan bakteri kontaminasyonunun önüne geçilmiştir. Solüsyondaki su da büyük ölçüde elektrospin işlemi sırasında uzaklaştırılmıştır. Şekil 52'de PVA, PEO ve SD nanoliflerinin bakteri içermeyen solüsyondan üretilmesi sonrasında çekilmiş olan temsili SEM görüntüleri görülmektedir. Görüntülerden de anlaşılacağı üzere nanolifler genel olarak homojen ve boncuksuz bir yapıya sahiptirler. Yalnızca PEO nanolifleri için farklı koşullar da denenmesine karşılık boncuk yapıları uzaklaştırılamamıştır. Şekil 53'de ise bakteri enkapsüle edilmiş olan PVA, PEO ve SD nanolifleri ve bakteri enkapsülasyonundan kaynaklanan boncuk yapıları yer almaktadır. Şekil 52b'de görüleceği üzere bakteri enkapsülasyonundan kaynaklanan boncuk

yapıları nanoliflerin kendi içerisinde bulunan boncuklardan (Şekil 6b) boyut, büyüklük ve şekil olarak belirgin bir biçimde ayrılmaktadır. Saf haldeki PEO nanoliflerinde bulunan boncuk yapıları uzunca ve daha küçük boyutta iken, bakterilerin neden olduğu boncuk yapıları daha büyük ve top benzeri yapılardır. Bu sayede bakteri enkapsülasyonu PEO nanolifleri için de SEM elektron mikroskobu ile görüntülenebilmiştir.



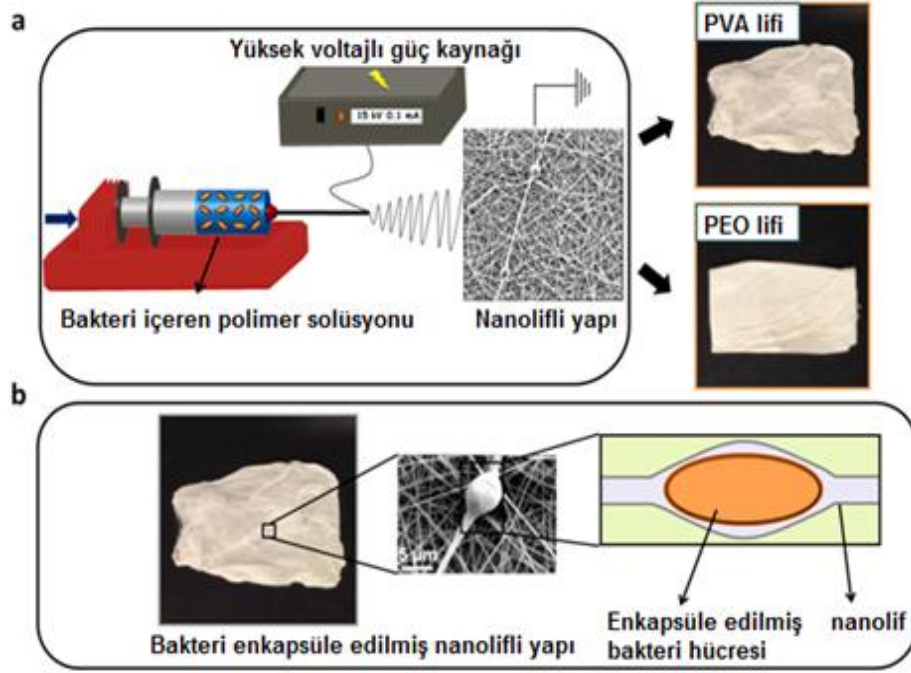
Şekil 52. Bakteri içermeyen (a) PVA, (b) PEO ve (c) SD nanoliflerinin temsili SEM görüntüleri.



Şekil 53. Bakteri enkapsüle edilmiş (a) PVA, (b) PEO ve (c) SD nanoliflerinin temsili SEM görüntüleri.

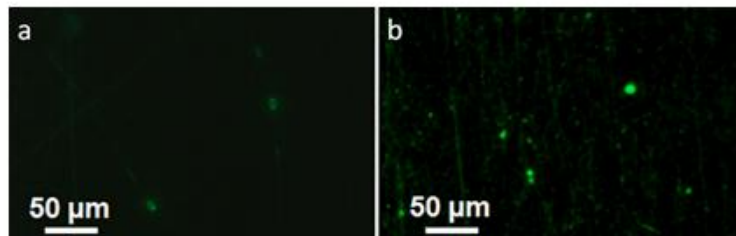
4.2.2 Metilen mavisi boyasını giderici özelliği bulunan bakterilerin PVA ve PEO nanoliflerine enkapsüle edilerek metilen mavisi giderim özelliklerinin araştırılması.

Bu çalışmada, homojen bir şekilde üretilmiş PVA ve PEO nanoliflerinin içerisine bakteri enkapsülasyonu üzerinde çalışılmıştır. Bu amaçla metilen mavisi giderici özelliği bulunan *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 47085) bakterisi kullanılmıştır. Şekil 54’de elektrospin yöntemi ile bakteri enkapsüle edilmiş PVA ve PEO nanoliflerinin eldesi ve enkapsüle olmuş bakterilerin görünümü şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 54. (a) Elektrospin yöntemi ile bakteri enkapsüle edilmiş PVA ve PEO nanoliflerinin eldesi, (b) enkapsüle edilmiş bakterilerin SEM görüntüsü ve şematik olarak gösterimi.

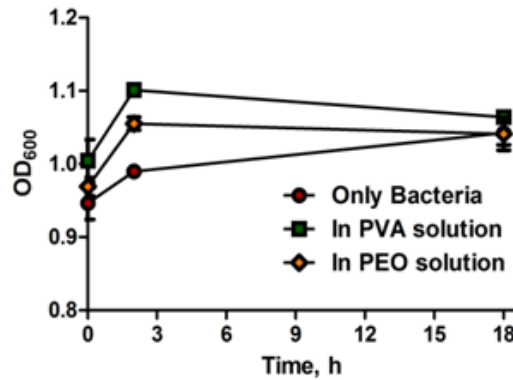
Enkapsüle olmuş olan bakterilerin canlılığı görsel olarak florasan mikroskopisi yardımıyla gözlemlenmiştir. Bu amaçla canlılığına bakılacak örnekler için bakteri içeren elektrospin çözeltisi hazırlanmadan önce, bakteri çözeltisi Live/Dead canlılık tayini kiti (BacLight™ kit) ile boyanarak PVA ve PEO nanolifleri elde edilmiş, daha sonra bu nanolif örneklerine SEM mikroskobu ile bakılarak canlı bakteriler gözlemlenmeye çalışılmıştır. Bu testte kırmızı renkte parlak florasan ölü hücrelerin varlığına tekabül ederken, yeşil renkte parlak florasan canlı hücrelerin varlığına tekabül etmektedir. Bakteri enkapsüle edilmiş PVA ve PEO nanoliflerindeki canlı bakterilerin varlığının florasan mikroskobu ile görüntülenmesi sonuçları Şekil 55’de gösterilmektedir.



Şekil 55. Bakteri enkapsüle edilmiş (a) PVA, (b) PEO nanoliflerinin florasan mikroskobu altındaki görüntüleri. Yeşil parlak noktacıklar canlı bakteri varlığına tekabül etmektedir.

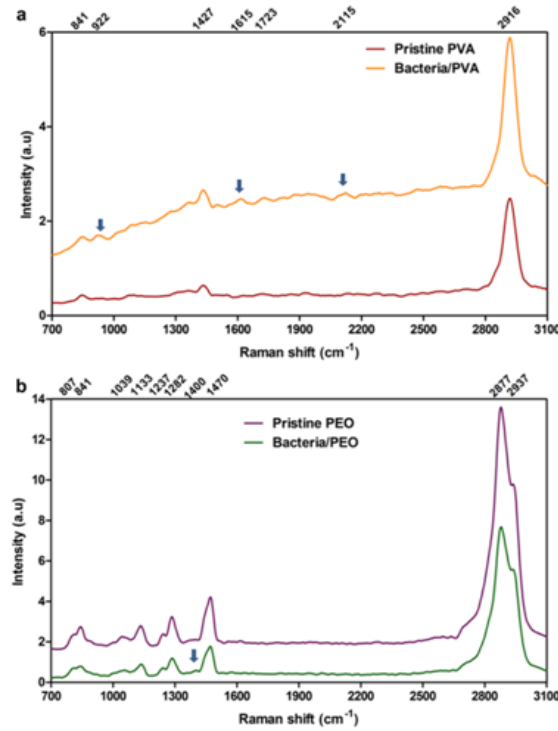
Canlı bakteri varlığını florasan mikroskobu ile görüntülenebilmesine rağmen, bakteri miktarını sayısal olarak florasan mikroskobu yardımı ile tayin etmek mümkün değildir. Bu nedenle canlı bakterilerin miktarını belirlemek için eşlenik örnekler suda çözülerek, çözülmüş haldeki bakteri-polimer karışımına VCC (canlı koloni sayımı) tahlili uygulanmıştır. Bu sonuçlara göre PVA nanoliflerindeki canlı bakteri sayısı $\sim 10^7$ - 10^8 cfu/mL seviyelerinde iken, PEO nanoliflerindeki canlı bakteri sayısı $\sim 10^8$ cfu/mL seviyelerinde tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, sayım sonuçlarına göre genel olarak PEO nanoliflerindeki canlı bakteri sayısının PVA nanoliflerindeki canlı bakteri sayısından daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bunun başlıca nedeninin PEO polimerinin konsantrasyonunun elektrospin çözeltisinde daha az olması, dolayısıyla suyu uzaklaştırılmış olan elektrospin edilmiş PEO nanoliflerinde bakteri oranının polimer oranına göre daha fazla olması dolayısıyla üretilen nanoliflerdeki bakteri konsantrasyonunun aynı büyüklükteki/ağırlıktaki PVA nanoliflerinden daha yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

PVA ve PEO nanolifleri suda çözündüğünde PVA ve PEO polimerleri de suya karışarak ortamda bulunmaktadır. Biyoyumlu olduğu bilinen bu polimerlerin yine de bakteri büyümesi üzerinde herhangi bir negatif etki yapıp yapmadığını belirlemek adına, nanoliflerdeki polimer konsantrasyonlarıyla aynı konsantrasyonda bulunan polimer çözeltileri bakterilerin büyütüleceği LB (Luria-Bertani) ortamına ilave edilerek, kontrol (polimer içermeyen) bakterileriyle büyüme farklılığı test edilmiştir. Şekil 56'da görüleceği üzere, 18 saat 30°C ve 125 rpm'de büyüme neticesinde bakteri büyümelerinde belirgin farklılıklar gözlemlenmemiştir. Yani PVA ve PEO polimerlerinin bakteri büyümeleri üzerinde yavaşlatıcı veya engelleyici bir etkisi olduğu gözlemlenmemiştir. Bu nedenle bu polimerlerin ve bu polimerlerden üretilen nanoliflerin bakteriler üzerinde zararlı bir etkisinin olmayacağı, ve uygulama çalışmalarının bu nanoliflerle gerçekleştirilebileceği sonucuna varılmıştır.



Şekil 56. Yalnızca bakteri, bakteri-PVA ve bakteri-PEO karışımlarının LB büyüme ortamı içerisinde 18 saat 30°C ve 125 rpm'de büyütülmesi neticesinde elde edilen büyüme eğrileri.

Bakteri enkapsüle edilmiş PVA ve PEO nanoliflerindeki bakteri varlığı ve bakterilerin üretilen malzemenin kimyasal yapısı üzerindeki etkileri Raman spektroskopisi (Nicolet 6700 FT-Raman Spectrometer, Thermo-Scientific) yardımı ile incelenmiştir. Bunun için 1064 nm lazer kullanılmış ve her örneğin 100 adet taraması yapılarak bunların ortalaması alınmıştır. Örneklerin spektrumları üzerinde su ve karbondioksit düzeltmesi yapılmıştır. OMNIC™ programı yardımıyla da gerekli düzeltmeler ve ayarlamalar yapılmıştır. Saf haldeki PVA, bakteri enkapsüle edilmiş PVA, saf haldeki PEO, bakteri enkapsüle edilmiş PEO nanoliflerinin Raman spektrumları Şekil 57’de verilmiştir.

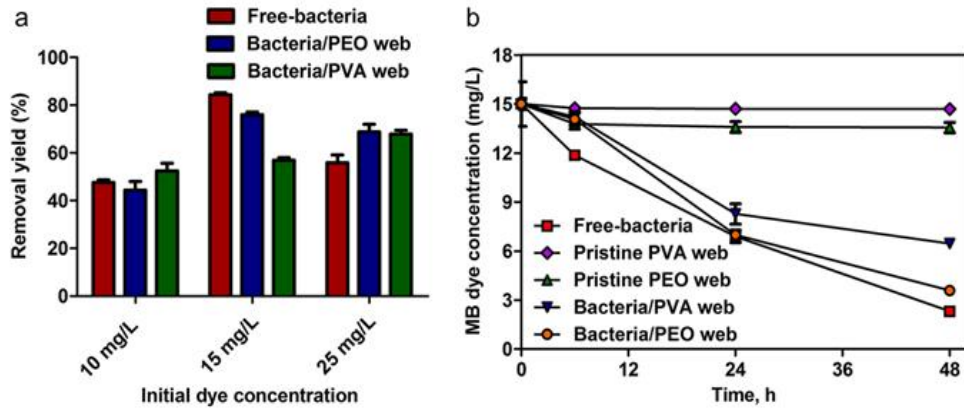


Şekil 57. Yalnızca PVA, bakteri-PVA, yalnızca PEO ve bakteri-PEO nanoliflerinin Raman spektrumları.

Bu sonuçlara göre bariz derecede belirgin olmasa da bakteri enkapsülasyonunun PVA ya da PEO nanoliflerinin kimyasal yapıları üzerinde etkisi olduğu sonucuna varılmıştır. Bakteri enkapsüle edilmiş ve edilmemiş PVA nanoliflerinin Raman spektrumlarını karşılaştırdığımızda, bakteri enkapsüle edilmiş PVA nanoliflerinde diğerine göre farklı olarak 922, 1615 ve 2155 cm^{-1} bölgelerinde yeni pikler görülmüştür. 922 cm^{-1} piki C-C esnemesi, 1615 cm^{-1} piki amino asitlere ve 2115 cm^{-1} piki de asimetrik C=C=O (keten) esnemesine tekabül etmektedir (Talari vd., 2007; Socrates 2004). Bu sonuç yeni görülen bu piklerin bakteri varlığı sonucu oluştuğunu düşündürmektedir. Bakteri enkapsüle edilmiş ve edilmemiş PEO nanoliflerinin Raman spektrumlarını karşılaştırdığımızda ise, bakteri enkapsüle edilmiş PEO nanoliflerinde diğerine göre farklı olarak 1400 cm^{-1} bölgesinde küçük

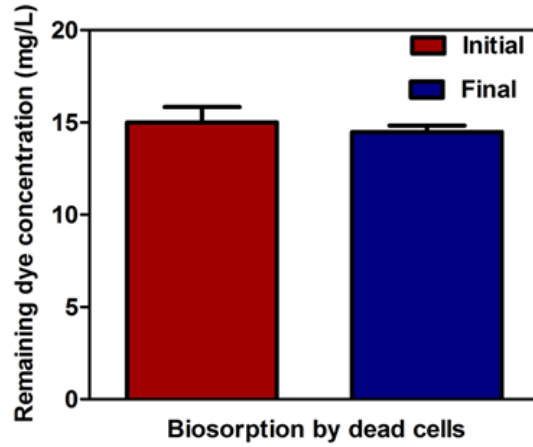
bir pik görülmüştür. Bu yeni oluşan pik NH düzlem deformasyonuna tekabül etmektedir (Talari vd., 2007), bu sonuç da önceki gibi yeni oluşan bu pikin bakteri enkapsülasyonundan kaynaklı olarak oluştuğunu düşündürmektedir.

Bakteri enkapsüle edilmiş PVA ve PEO nanoliflerinden benzer büyüklük ve eşit ağırlıkta kesilerek metilen mavisi giderimi deneylerinde kullanılmıştır. Tüm deneyler belirli konsantrasyonlarda metilen mavisi (10, 15, 25 mg/L) içeren LB büyüme ortamı içerisinde gerçekleştirilmiştir. Örnekler 30°C, 125 rpm'de 48 saat süre ile büyütülmüş, bu süreçte belli aralıklarda sıvı örnekler alınarak 660 nm'de spektrofotometrik ölçümleri yapılmış ve böylece metilen mavisi konsantrasyonundaki değişim takip edilmiştir. Ayrıca serbest haldeki bakteriler ve saf haldeki nanolifler de pozitif ve negatif kontrol olarak test edilerek metilen mavisi giderim özelliklerine bakılmıştır. Sonuçlar Şekil 58'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre genel olarak en yüksek giderim yüzdeleri 15 mg/L konsantrasyonunda elde edilmiştir. Metilen mavisi konsantrasyonu ile giderim kapasiteleri arasında doğrudan bir ilişki olmayıp, belli bir aralıkta giderim yüzdeleri artmıştır. Bunun nedeninin adsorpsiyon temelli bir giderimden ziyade biyolojik giderimden kaynaklandığı, bundan dolayı da belirli konsantrasyonlarda genetik aktivitenin artmasından dolayı giderim yüzdelerinin de arttığı sonucuna ulaşılmıştır. Yalnızca nanolif örneklerinin metilen mavisi giderim özellikleri minimal düzeyde bulunmuştur, bu da bakteri enkapsüle edilmiş nanolif örneklerinin gerçekleştirmiş olduğu giderimin esas nedeninin bakteri varlığından kaynaklı olduğunu göstermektedir.



Şekil 58. (a) Yalnızca bakteri, bakteri/PVA ve bakteri/PEO nanolif örneklerinin 10, 15, 25 mg/L konsantrasyonlarında 48 saat içerisindeki metilen mavisi giderimi, (b) yalnızca bakteri, yalnızca PVA nanolifi, yalnızca PEO nanolifi, bakteri/PVA ve bakteri/PEO nanolif örneklerinin 15 mg/L konsantrasyonunda 48 saat içerisindeki zamana göre metilen mavisi giderimi.

Daha önce belirtildiği üzere enkapsüle edilen bakterilerin bir kısmı elektrospin işlemi sırasında ölmektedir. Bu nedenle bakteri/nanolif örneklerinde canlı bakteriler kadar ölü bakteriler de bulunmaktadır. Bu nedenle ölü haldeki bakterilerin metilen mavisi gideriminde etkisi olup olmadığının araştırılması için 10^{10} cfu/mL seviyesindeki bakteriler (elektrospin işlemi öncesinde enkapsüle olmak üzere solüsyonda bulunan miktarda) yüksek sıcaklığa maruz bırakılıp öldürülerek, daha önce belirtilen eş koşullarda metilen mavisi giderim özelliklerinin olup olmadığına bakılmıştır. Sonuç Şekil 59'da verilmiştir. Bu sonuçtan anlaşılabacağı üzere ölü haldeki bakterilerin metilen mavisi giderimindeki etkisi minimal düzeydedir ve giderimin temel sebebi canlı haldeki enkapsüle edilmiş bakterilerden kaynaklanmaktadır.



Şekil 59. Ölü haldeki bakteri hücrelerinin 15 mg/L konsantrasyonunda 48 saat içindeki metilen mavisi giderimi.

Şekil 58'de elde edilen sonuçlara göre hesaplanan giderim kapasiteleri ve yüzde giderim değerleri Tablo 6'da verilmiştir. Bu sonuçlara göre önceden belirtildiği gibi metilen mavisi konsantrasyonu ile giderim kapasiteleri arasında doğrudan bir ilişki olmayıp, belli bir aralıkta giderim yüzdeleri artmış, hatta bazı örneklerde konsantrasyon artışıyla birlikte giderim yüzdeleri azalmaya başlamıştır. En yüksek giderim kapasiteleri 25 mg/L'de bakteri/PVA ve bakteri/PEO örnekleri için hesaplanmıştır. 10 mg/L'de giderim kapasiteleri diğer tüm örnekler için birbirine çok yakındır. 15 mg/L'de serbest bakteri örneğinin giderim kapasitesi diğer iki örnekten (özellikle bakteri/PVA örneğinden) daha yüksek olarak hesaplanmıştır. 25 mg/L'de ise bakteri/PVA ve bakteri/PEO örneklerinin giderim kapasiteleri neredeyse aynı olup, serbest bakteri örneğine göre daha yüksek olarak hesaplanmıştır. Örnekler arasındaki bu tarz farklılıkların sebebinin, bakteri miktarındaki farklılıklar ve biyolojik temelli enzimatik giderimden kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Tablo 6. Serbest bakteri, bakteri/PVA ve bakteri/PEO örneklerinin denge durumunda giderim işlemi sonrasında hesaplanan giderim kapasiteleri ve yüzde giderim değerleri. Sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 125 rpm, inkübasyon süresi: 48 saat.

Örnek ismi	İlk konsantrasyon (C ₀)	Giderim (%)	Q _{eq} (mg/g)
Serbest bakteri	10 mg/L	47.6 ± 1.09	25.04 ± 0.58
	15 mg/L	84.4 ± 0.8	66.75 ± 6.59
	25 mg/L	56 ± 3.21	74.02 ± 8.61
Bakteri/PVA ağı	10 mg/L	52.5 ± 3.24	27.79 ± 3.18
	15 mg/L	57 ± 1.08	45 ± 1.38
	25 mg/L	68 ± 1.58	89.22 ± 1.17
Bakteri/PEO ağı	10 mg/L	44.4 ± 3.63	23.57 ± 3.24
	15 mg/L	76 ± 1.02	60.04 ± 1.46
	25 mg/L	69 ± 3.13	89.47 ± 3.94

Bakteri enkapsüle edilmiş nanoliflerin ve serbest haldeki bakterilerin metilen mavisi giderim sonuçları ek olarak adsorpsiyon izotermi ve kinetik çalışmaları ile analiz edilmiştir. Adsorpsiyon katsayıları ve tahmin edilen değerlerden elde edilen izotermi Tablo 7’de verilmiştir. Serbest bakteri ve bakteri/PEO ağı örnekleri için test edilen hiçbir izoterm modelinde uygunluk (fitting) görülmemiştir ve R_y^2 değerleri yeteri kadar yüksek değildir. Bu nedenle bu örneklerin izoterm modelleri üzerinde bir tartışma yapılmamıştır. Bakteri/PVA örneği için ise en yüksek uygunluk (fitting) Freundlich ve Toth izoterm modelleri için ($R_y^2 = 0,926$) bulunmuştur. Bu sonuçlar ışığında bakteri/PVA örneği ile metilen mavisi gideriminin tek katmanlı değil de, çok katmanlı ve heterojen bir yapıda gerçekleştiği düşünülmektedir. Toth izoterm modeline göre Q_{max} değeri 591 mg/g olarak hesaplanmıştır.

Tablo 7. Serbest bakteri, bakteri/PVA ve bakteri/PEO örneklerinin her izoterm modeli için hesaplanmış adsorpsiyon izoterm katsayıları.

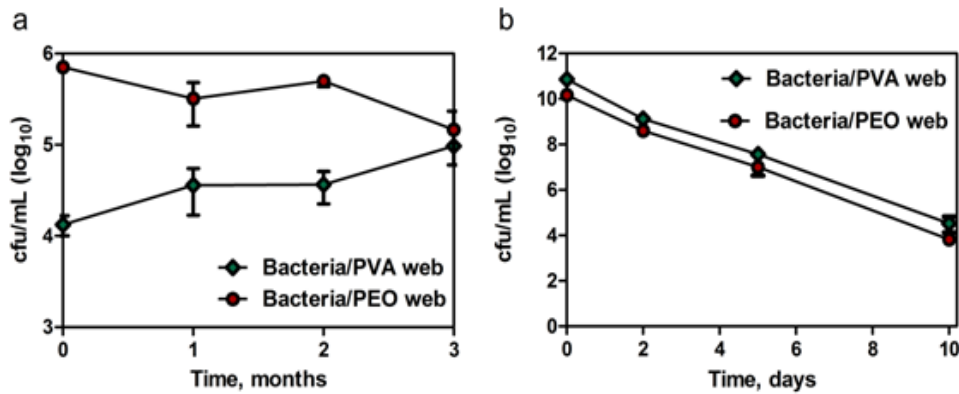
Örnekler	İzoterm	Parametreler	Değerler	Ry ² değeri
Serbest bakteri	Freundlich	Kf	47.4	0.017
		1/n	0.09	
	Langmuir	Q _{max}	66.6	0.001
		b	1.00	
	Toth	Q _{max}	55.3	0.131
		b	1.00	
		n	5.00	
Bakteri/PVA ağı	Freundlich	Kf	8.85	0.926
		1/n	1.00	
	Langmuir	Q _{max}	11400	0.925
		b	0.0008	
	Toth	Q _{max}	591	0.926
		b	0.015	
		n	4.98	
Bakteri/PEO ağı	Freundlich	Kf	11.86	0.232
		1/n	0.92	
	Langmuir	Q _{max}	1770	0.233
		b	0.006	
	Toth	Q _{max}	1890	0.239
		b	0.005	
		n	3.29	

Her bir örnek için reaksiyon kinetiği sonuçları ise hesaplanarak Tablo 8’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre, bakteri/PVA örneği ile giderim enzimatik degradasyonlardakine benzer şekilde 0. düzende bulunurken (Tinoco vd., 1996), serbest bakteri ve bakteri/PEO örnekleri ile giderimin literatürde de örnekleri olduğu üzere 1. düzende olduğu bulunmuştur (San-Keskin vd., 2015b; Lugo-Lugo vd., 2010) (Tablo 8).

Tablo 8. Serbest bakteri, bakteri/PVA ve bakteri/PEO örneklerinin metilen mavisi gideriminde hesaplanan sıfırıncı, birinci, ikinci ve üçüncü düzenden elde edilen R² değerleri.

Örnekler	Model	R ² değerleri
Serbest bakteri	sıfırıncı düzen	0.9717
	birinci düzen	0.9912
	ikinci düzen	0.916
	üçüncü düzen	0.8408
Bakteri/PVA ağı	sıfırıncı düzen	0.9797
	birinci düzen	0.9398
	ikinci düzen	0.885
	üçüncü düzen	0.8378
Bakteri/PEO ağı	sıfırıncı düzen	0.8839
	birinci düzen	0.943
	ikinci düzen	0.9399
	üçüncü düzen	0.8959

Bakteri enkapsüle edilmiş PVA ve PEO nanolifleri üzerinde son olarak saklanabilirlik testi uygulanmıştır. Bu amaçla ilk etapta 5'er mg'lık bakteri/PVA ve bakteri/PEO örnekleri hazırlanmış, daha sonra örnekler 4 ve 25°C'de saklanarak periyodik olarak VCC yöntemi uygulanmış ve bakteri miktarlarındaki değişimler gözlemlenmiştir. Sonuçlar Şekil 60 ve Tablo 9'da verilmektedir. Bu deneyde öncekilerden farklı olarak 25°C'de saklanmak için üretilen bakteri/PVA örneklerinin ilk halinde bakteri/PEO örneklerine göre daha fazla bakteri içerdiği gözlemlenmiştir. Bunun sebebinin üretilen nanoliflerdeki deneysel bir farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir, zira önceki üretilen nanoliflerin hiçbirisinde bakteri/PVA örneklerindeki bakteri miktarı bakteri/PEO örneklerindeki bakteri miktarından daha yüksek çıkmamıştır. Yine de bakteri miktarlarındaki değişimler spesifik olarak her örnek için ayrı ayrı ve oransal olarak incelendiği için bu tarz bir farklılık olması deney sonuçları ve yorumlanması açısından bir sıkıntı oluşturmamıştır. Sonuçlar incelendiğinde, 4°C'de uzun süreler boyunca bakterilerin canlılığını koruduğu gözlemlenirken, 25°C'de bakteri miktarlarında radikal azalışlar olduğu ve hızla canlılıklarını kaybettiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlardan yapılabilecek çıkarım şudur; bakteri enkapsüle edilmiş nanolif örnekleri uzun süreler boyunca serin/soğuk koşullarda bakteri canlılığını muhafaza ederek saklanabilir. Üretilmiş olan bu nanoliflerin sıvı bakteri kültürlerine göre saklama ve kullanım kolaylığı, hafiflik ve az yer tutması dolayısıyla avantajlı olduğu ve benzer özelliklere sahip liyofilize edilmiş bakterilere alternatif olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmamız "***Bacteria encapsulated electrospun nanofibrous webs for remediation of methylene blue dye in water***" başlığı altında *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* dergisine yayınlanmak üzere gönderilmiştir.



Şekil 60. Bakteri/PVA ve bakteri/PEO örneklerindeki bakteri miktarlarındaki değişimin (a) 4°C'de 3 ay boyunca, (b) 25°C'de 10 gün boyunca saklanması sürecinde elde edilmiş sonuçları.

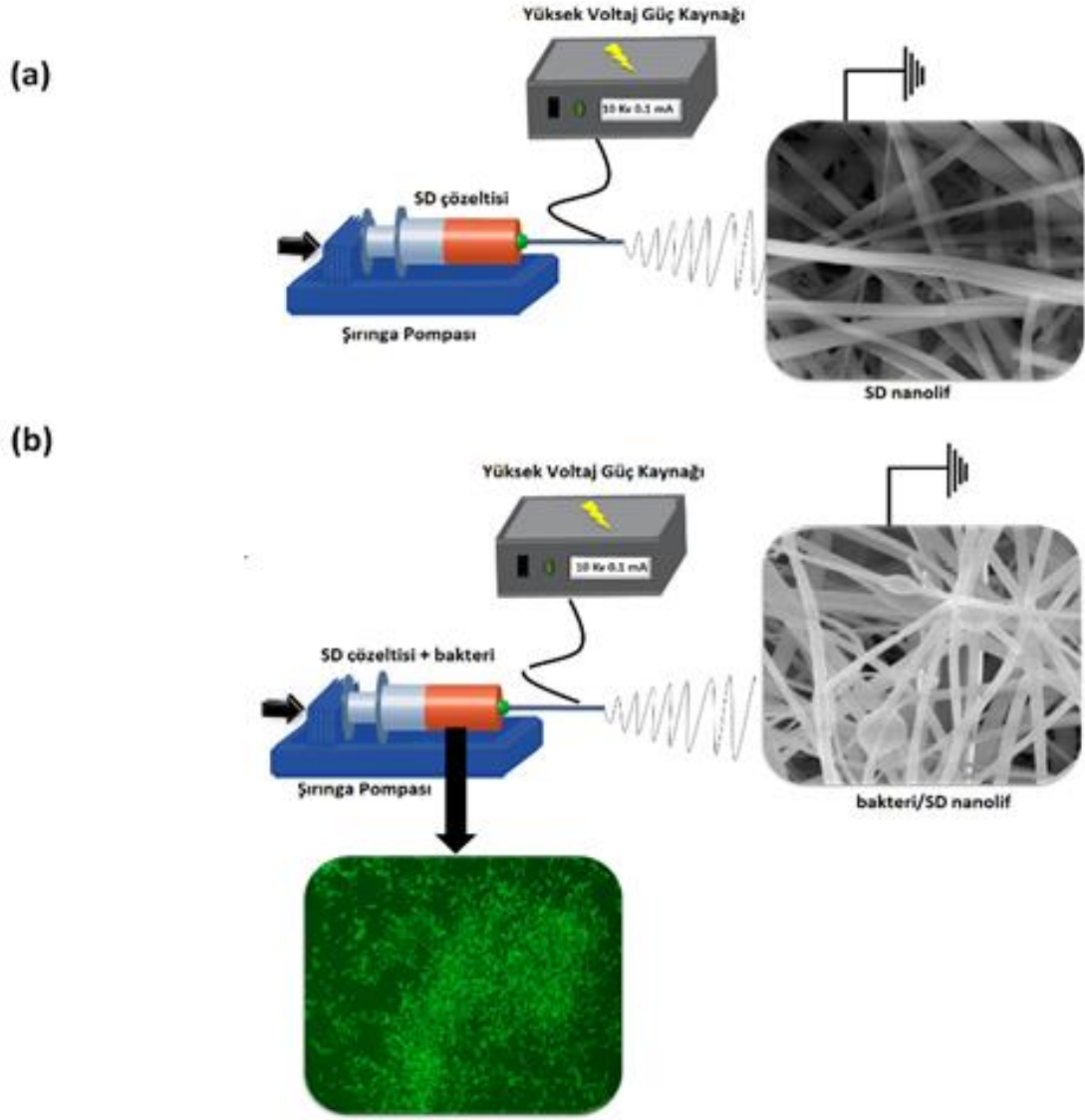
Tablo 9. Bakteri/PVA ve bakteri/PEO örneklerinin 4°C veya 25°C'de farklı periyotlarda hesaplanmış canlı hücre sayımı (VCC) sonuçları. Sonuçlar cfu/mL olarak verilmiştir. Ağırlık/hacim (w/v) oranı her bir örnek için eşit tutulmuş (5 mg/mL), bakteriler eşit miktarda distile su içerisinde çözüldükten sonra VCC yöntemi uygulanmıştır.

Sıcaklık	Zaman	Bakteri/PVA ağı	Bakteri/PEO ağı
4 °C	İlk hali	$1.3 \times 10^4 \pm 0.3$	$7.1 \times 10^5 \pm 0.5$
4 °C	1 ay sonra	$5.4 \times 10^4 \pm 1.1$	$4.8 \times 10^5 \pm 0.2$
4 °C	2 ay sonra	$3.7 \times 10^4 \pm 1.4$	$5.0 \times 10^5 \pm 0.6$
4 °C	3 ay sonra	$9.7 \times 10^4 \pm 1.2$	$2.2 \times 10^5 \pm 0.8$
25 °C	İlk hali	$7.2 \times 10^{10} \pm 2.1$	$1.5 \times 10^{10} \pm 0.3$
25 °C	2 gün sonra	$1.3 \times 10^9 \pm 0.3$	$4.0 \times 10^8 \pm 1.5$
25 °C	5 gün sonra	$3.7 \times 10^7 \pm 0.8$	$1.5 \times 10^7 \pm 0.5$
25 °C	10 gün sonra	$1.0 \times 10^5 \pm 0.3$	$2.0 \times 10^4 \pm 0.7$

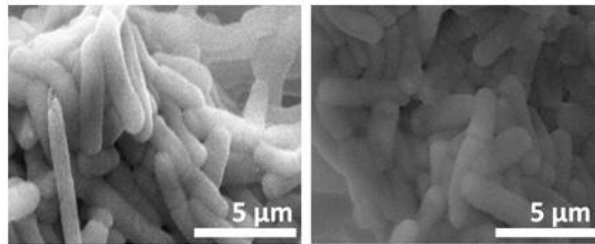
4.2.3 Ağır metal ve boyar madde giderim özelliği olan bakterinin siklodekstrin nanolife enkapsülasyonu ve Ni(II), Cr(VI) ve RB5 giderimi çalışması.

Bu çalışmamızda, *Lysinibacillus* sp. NOSK bakterisi, siklodekstrin (SD) nanofiber yapısına enkapsüle edilmiş ve elde edilen malzemenin nikel, krom ve boyar madde içeren atıksuların gideriminde kullanım potansiyelleri araştırılmıştır. Şekil 61'de çalışma şematik olarak verilmiştir. *Lysinibacillus* sp. NOSK bakterisi çubuk şeklinde olup morfolojisi Şekil 62'de görülmektedir. Şekil 63'de bakteri içermeyen ve bakteri enkapsülasyon çalışmasında bakteri miktar optimizasyonları sonucu elde edilen SD nanoliflerin SEM mikrografları verilmiştir. Mikrograflarda (a-b) düzgün yapılı, boncuksuz ve homojen dağılımlı SD nanolif örneklerini gösterirken (c-j) %0,25-2 arasında farklı oranlarda bakteri içeren SD nanolif örneklerini göstermektedir. Bu amaçla SD elektrospin çözeltisine %0,25, %0,5, %1 ve %2 (w/w) bakteri kütlesi eklenmiştir. Bakteri enkapsülasyonu sonucu nanoliflerde boncuklu bir yapı oluşmuştur. SEM mikrograflarında görüldüğü üzere, %1 (w/v) bakteri miktarının homojen ve düzgün yapıda SD nanolif eldesinde optimum miktar olduğu belirlenmiştir.

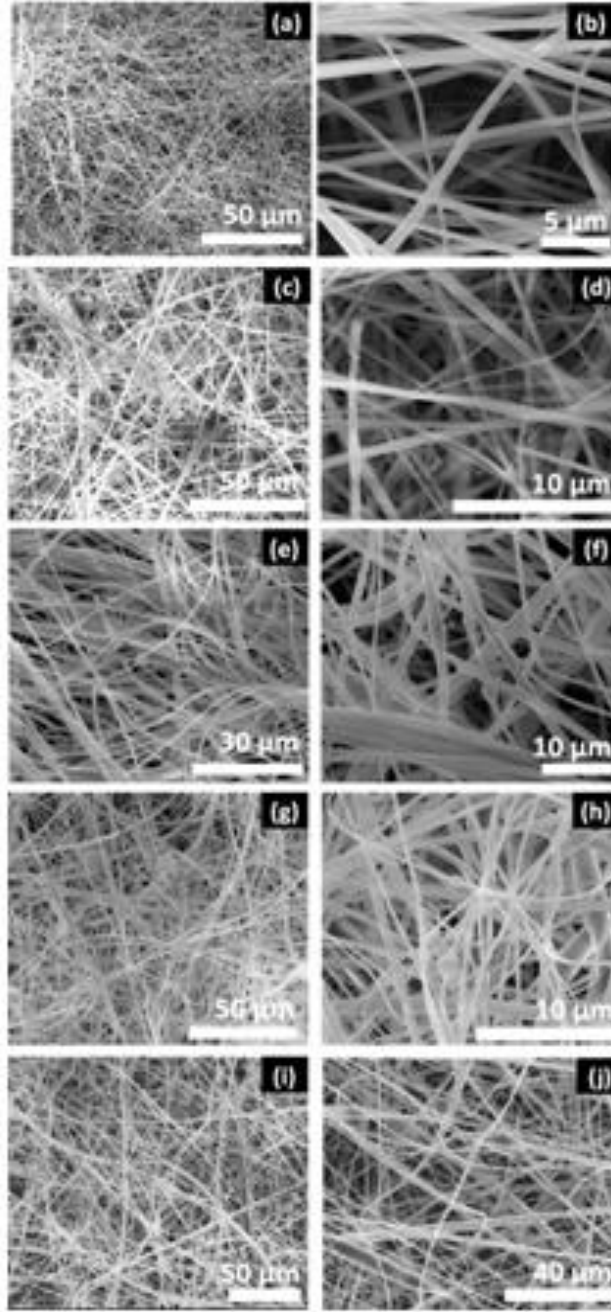
Lysinibacillus sp. NOSK bakterisinin SD solüsyonu içerisinde elektrospin öncesi ve sonrasındaki bakteri miktarları koloni oluşturma birimi (KOB/mL veya cfu/mL) cinsinden belirlenmiştir. Bu amaçla, öncelikle SD solüsyonu içerisindeki bakteri miktarı belirlenmiş ve ek olarak farklı zamanlarda (24 saat ve 7 gün) 4°C'de nanolif içerisindeki canlılık durumları belirlenmiştir (Şekil 64).



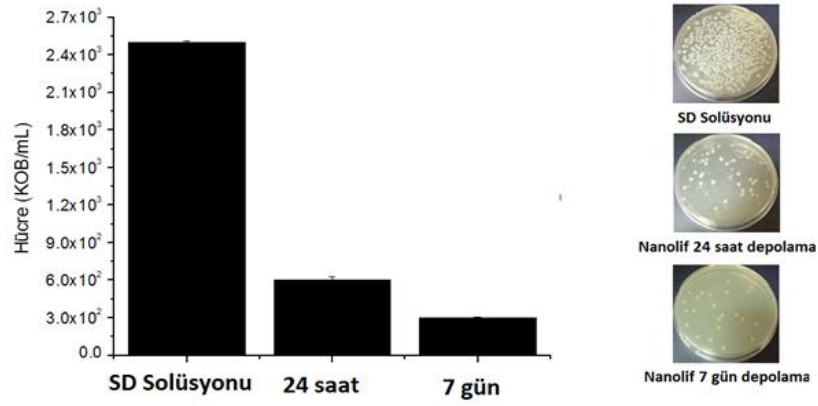
Şekil 61. (a) Elektrospin yöntemi ile SD liflerinin elde edilmesinin şematik gösterimi (b) bakteri enkapsüle edilmiş SD liflerinin şematik gösterimi.



Şekil 62. *Lysinibacillus* sp. NOSK bakterisi SEM mikrosafı.



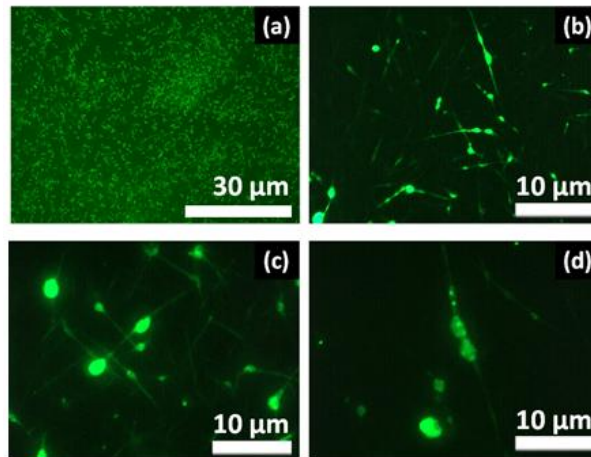
Şekil 63. Elektrospin yöntemi ile üretilmiş (a-b) saf haldeki SD nanoliflerinin, (c-d) %0,25 (w/v) oranında bakteri, (e-f) %0,5 (w/v) oranında bakteri, (g-h) %1 (w/v) oranında bakteri, (i-j) %2 (w/v) oranında bakteri içeren SD nanoliflerinin SEM mikroagrafları.



Şekil 64. *Lysinibacillus* sp. NOSK içeren SD çözeltisi ve SD nanoliflerinin 4°C ve farklı depolama süreçlerinde canlı bakteri miktarlarının KOB/mL (cfu/mL) olarak analizi.

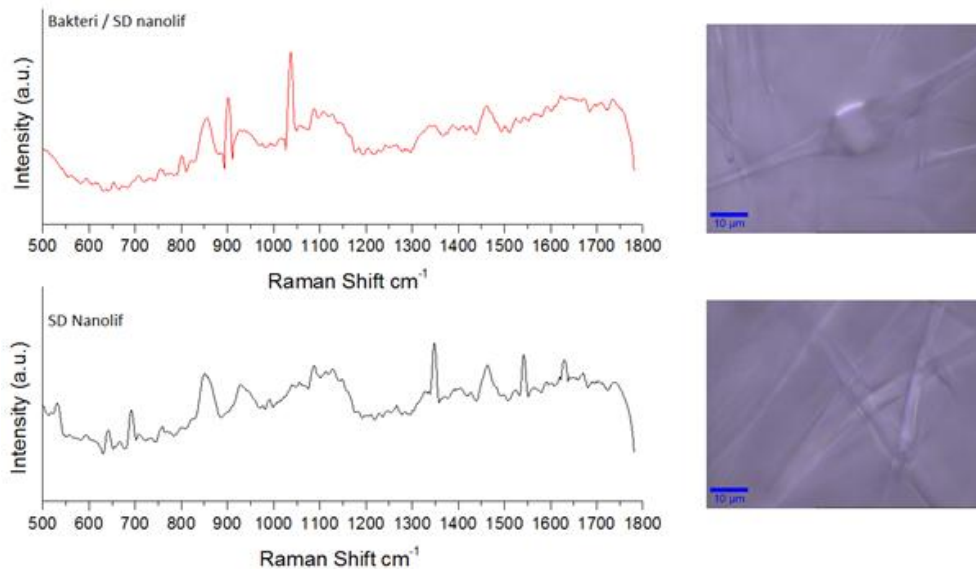
Zaman arttıkça bakteri hücrelerinin canlılığı da azalmaya başlamıştır. *Lysinibacillus* sp. NOSK bakterisi SD çözeltisi içerisinde $2,5 \times 10^3$ cfu/mL iken enkapsülasyon sonrası 24 saat 4 °C'de bekletildiğinde bu sayı $6,0 \times 10^2$ cfu/mL olarak bulunmuştur. 7 gün sonra canlılık durumu ise $3,0 \times 10^2$ cfu/mL olarak belirlenmiştir. Enkapsülasyon sonrası çözelti içerisindeki bakteri miktarındaki azalışa elektrospin yönteminde kullanılan yüksek voltajın etki etmiş olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, elektrospin yönteminde hızlı evaporasyondan dolayı bakterinin ozmotik basıncında sert bir değişme söz konusu olmaktadır. Bu da canlılık azalışında etkili olmuş olabilir.

Şekil 65'de florasan boyalar ile boyanmış *Lysinibacillus* sp. NOSK bakterisinin enkapsülasyon sonrasında florasan mikroskobu altında yeşil florasan vermesi (canlı bakterilerin varlığına işaret etmektedir) gösterilmektedir. Bakteri enkapsüle edildiğinde nanolif yapısında boncuk yapılarına benzer yapılar oluşmaktadır.



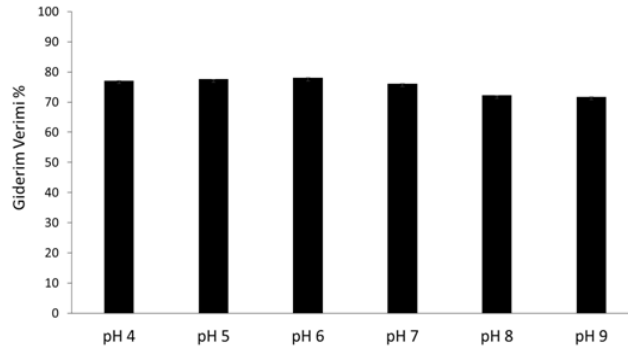
Şekil 65. Bakterinin (a) enkapsülasyon öncesi öncesi (b-d) enkapsülasyon sonrası florasan mikroskobu görüntüleri.

Raman spektroskopisi, polimer ve mikroorganizmaların moleküler parmak izinin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır (Hanlon vd., 2000). Şekil 66'da saf haldeki ve bakteri enkapsüle edilmiş SD nanoliflerinin Raman spektrumları verilmektedir. Saf haldeki SD nanolifinde 851 cm^{-1} piki aromatik CCH ve CH düzlem dışı bükülmesi olarak verilmiştir. 1542 cm^{-1} piki ise C=O esneme, CCC ve CC=O düzlemsel bükülmeye karşılık gelmektedir. Bakteri/SD nanolif yapısında farklı olarak 1005 cm^{-1} 'de protein yapısından gelen pikler mevcuttur. Ayrıca, 1200-900 cm^{-1} arasında polisakkaritlerden gelen pikler elde edilmiştir, bu durumda yeni görülen bu piklerin bakteri varlığından ve bakteri hücre duvar yapısında bulunan peptidoglikandan kaynaklandığı sonucuna ulaşılabilir.



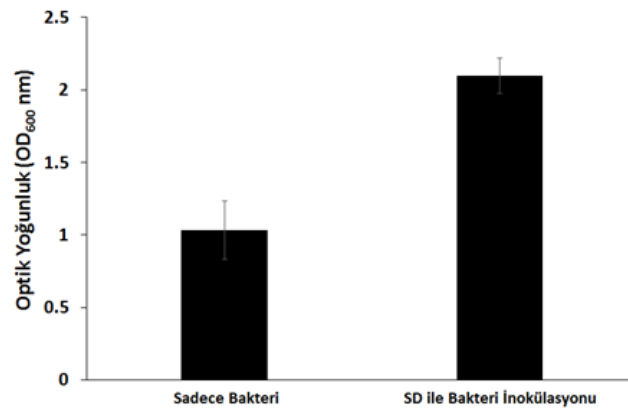
Şekil 66. (a) Saf haldeki SD nanoliflerinin (b) bakteri/SD nanoliflerinin Raman spektrumları. Yandaki fotoğraflardan görülebileceği üzere bakteri/SD örneklerinde spektrum boncuk yapısı üzerine odaklanarak elde edilmiştir.

Optimum pH değerinin bulunması amacıyla pH 4-9 değerlerinde Ni(II) giderim çalışması yapılmış ve 30 mg/L Ni(II) konsantrasyonunda, 24 saat sonunda %77, %77,5, %78, %76,1, %72,1 ve %71,7'lik giderim değerleri sırası ile pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0 için bulunmuştur (Şekil 67). Buna göre Ni(II) giderimi için optimum pH değeri pH 6 olarak bulunmuştur. Ekibimizin önceki çalışmasında, bakterinin Cr(VI) ve boyar madde gideriminde optimum pH değeri 8,0 olarak bulunmuştur (San-Keskin vd., 2015b). Atıksuların nötral pH değerlerinde olmasından dolayı, bu malzemenin gerçek atıksu uygulamalarında kullanılmasının avantaj taşıyacağı düşünülmektedir.



Şekil 67. Bakterinin 10 mg/L konsantrasyonunda Ni(II) giderimine pH etkisinin belirlenmesi (Sıcaklık: 30 °C; çalkalama hızı: 100 rpm).

Şekil 69a'da Ni(II) giderim yüzdesi sadece bakteri için $25,5 \pm 0,3$ bulunmuştur. Enkapsülasyon sonrası, bu oran $70 \pm 0,23$ olarak artmıştır. 7 gün 4 °C depolandıktan sonra kullanılan nanolifte ise bu oran $48,07 \pm 0,45$ olarak bulunmuştur. Ni(II) giderimi bakteri/SD nanolif kullanımı ile en yüksek giderim değerine ulaşmıştır. Bu durumun sebebinin nanolif besiyeri içerisinde çözündüğünde SD'nin ekstra karbon kaynağı olarak kullanılmış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir, böylece enkapsüle edilmiş bakterinin optik yoğunluk (OD) değeri sadece besiyeri içerisinde geliştirilen bakteriye göre daha yüksek değere ulaşmıştır. Şekil 68'de görüleceği üzere sadece bakterinin OD600 değeri 1,03 olarak ölçülürken, bakteri SD nanolif içerisinde enkapsüle edilerek besiyeri içinde çözündüğünde OD600 değeri 2,09 olarak bulunmuştur.

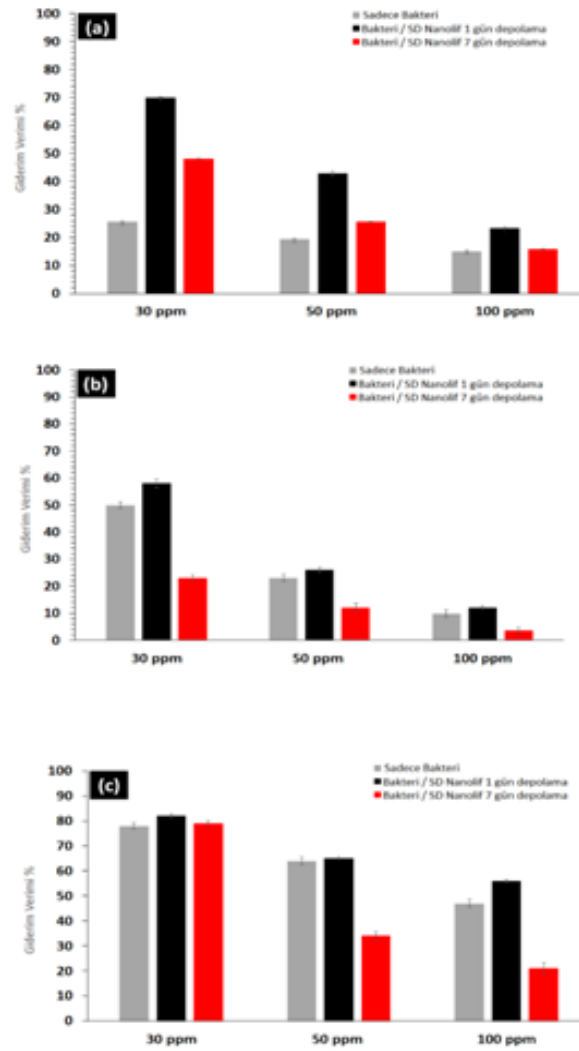


Şekil 68. Sadece bakteri ve SD ile inoküle edilmiş bakterilerin 30 °C'de 24 saat inkübasyonu sonrasında ölçülen optik yoğunluk değerleri.

Cr(VI) konsantrasyonunun giderimi Şekil 69b'de verilmektedir. *Lysinibacillus* sp. NOSK, 30, 50 ve 100 mg/L Cr(VI) konsantrasyonunu sırası ile $50 \pm 1,2$, $23 \pm 1,3$ ve $9,8 \pm 1,34$ gidermektedir. Enkapsülasyon sonrası, en yüksek giderim $58 \pm 1,43$, $26 \pm 0,98$ ve $12 \pm 0,78$, 30, 50 ve 100 mg/L Cr(VI) konsantrasyonu için bulunmuştur. Enkapsülasyon sonrası,

7 günlük depolama sonrası kullanıldığında, Cr(VI) giderim değerleri 30 mg/L için $23 \pm 1.2\%$, 50 ppm için 12 ± 1.67 ve 100 mg/L için 3.5 ± 1.23 değerlerine düşmüştür. Bu sonuçlara bakteri sayısının 7 günlük depolama sonrası azalmasından dolayı ulaşıldığı düşünülmektedir.

Şekil 69c'de ise boyar madde giderimindeki konsantrasyon etkisi çalışılmıştır. İnkübasyon süresi sonrası en yüksek RB5 giderimi 30 mg/L'de 78 ± 1.1 olarak hesaplanmıştır. Bakteri/SD nanolifi için boyar madde giderim verimleri daha farklıdır. En yüksek giderim 82 ± 0.87 'dir. 7 günlük depolama sonrası elde edilen giderim değerleri 30, 50 ve 100 mg/L için sırası ile 79 ± 1.2 , 34 ± 1.56 ve 21 ± 2.3 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 69. Sadece bakteri, bakteri enkapsüle edilmiş ve 1 gün boyunca 4 °C'de depolanmış SD nanolifi, bakteri enkapsüle edilmiş ve 7 gün boyunca 4 °C'de depolanmış SD nanolifi örneklerinin (a) Ni(II) (b) Cr(VI) ve (c) Reactive Black 5 kirleticileri üzerinde farklı konsantrasyonlardaki giderim verimleri (Sıcaklık: 30 °C; çalkalama hızı: 100 rpm).

Çalışmada ayrıca bakteri ve bakteri/SD nanoliflerinin ağır metal ve boyar madde giderimi üzerine adsorpsiyon izotermi kullanılarak analizleri yapılmıştır. Ni(II) giderimi için hesaplanmış adsorpsiyon izoterm katsayıları Tablo 10'da verilmiştir. Bakteri/SD nanolif test edilen tüm modellere uygunluk (fitting) göstermemiştir. İki farklı örnek için de Ni(II) gideriminde en uygun model Langmuir adsorpsiyon modeli olup Bakteri/SD-NF 24 saat örneği için R_y^2 değeri 0,993 iken ($Q_{\max} = 45,95$ mg/g), Bakteri/SD-NF 7 gün örneği için R_y^2 değeri 0,924'dir ($Q_{\max} = 30,95$ mg/g). Bu sonuca göre Ni(II) gideriminin homojen ve tek katmanlı adsorpsiyon ile gerçekleştiği çıkarımı yapılabilir.

Tablo 10. Bakteri/SD-NF için Ni(II) adsorpsiyon izoterm katsayıları.

Materyal	İzoterm	Parametre	Değerler	R_y^2 değeri
Bakteri/SD-NF 24 saat	Freundlich	K_f	29.45	0.976
		$1/n$	1.078×10^{-6}	
	Langmuir	$Q_{\max}$	45.95	0.993
		b	100	
	L-F	$Q_{\max}$	58.90	0.606
		b	0.20	
		$1/n$	1.14×10^{-6}	
	Linear	K_p	1.18	0.490
	Toth	$Q_{\max}$	35.17	0.877
		b	0.058	
		n	5.00	
Bakteri/SD-NF 7 gün	Freundlich	K_f	42.66	0.786
		$1/n$	1.0×10^{-6}	
	Langmuir	$Q_{\max}$	30.95	0.924
		b	0.99	
	L-F	$Q_{\max}$	85.33	0.613
		b	0.25	
		$1/n$	1.17×10^{-6}	
	Linear	K_p	2.09	0.611
	Toth	$Q_{\max}$	29.73	0.909
		b	1	
		n	5.00	

Tablo 11 bakteri/SD-NF örnekleri ile gerçekleştirilen Cr(VI) giderimi için hesaplanmış adsorpsiyon izoterm katsayılarını göstermektedir. Cr(VI) adsorpsiyon verilerine göre en çok uygunluk gösteren model Langmuir adsorpsiyon modeli olup, R_y^2 verileri bakteri/SD-NF 24 saat örneği için 0,993 iken ($Q_{\max} = 45,95$ mg/g) bakteri/SD-NF 7 gün örneği için 0,944'dir ($Q_{\max} = 22,23$ mg/g). Bu sonuca göre Cr(VI) gideriminin Ni(II) gideriminde olduğu gibi homojen ve tek katmanlı adsorpsiyon ile gerçekleştiği çıkarımı yapılabilir.

Tablo 11. Bakteri/SD-NF için Cr(VI) adsorpsiyon izoterm katsayıları.

Materyal	İzoterm	Parametre	Değerler	Ry ² değeri
Bakteri/SD-NF 24 saat	Freundlich	K _f	4.31	0.919
		1/n	0.41	
	Langmuir	Q _{max}	45.95	0.993
		b	100	
	L-F	Q _{max}	58.90	0.606
		b	0.20	
		1/n	1.14x10 ⁻⁶	
	Linear	K _p	1.18	0.490
	Toth	Q _{max}	72.23	0.908
		b	0.39	
		n	0.28	
Bakteri/SD-NF 7 gün	Freundlich	K _f	2.41	0.882
		1/n	0.57	
	Langmuir	Q _{max}	22.23	0.944
		b	0.07	
	L-F	Q _{max}	22.24	0.940
		b	0.076	
		1/n	0.99	
	Linear	K _p	0.68	0.805
	Toth	Q _{max}	13.72	0.988
		b	0.08	
		n	4.99	

Tablo 12. Bakteri/SD-NF için RB5 adsorpsiyon izoterm katsayıları.

Materyal	İzoterm	Parametre	Değerler	Ry ² değeri
Bakteri/SD-NF 24 saat	Freundlich	K _f	0.82	0.973
		1/n	1	
	Langmuir	Q _{max}	1.2x10 ⁴	0.970
		b	6.4x10 ⁻⁵	
	L-F	Q _{max}	3.84x10 ⁻⁴	0.971
		b	2.16x10 ⁻⁵	
		1/n	0.99	
	Linear	K _p	0.82	0.972
	Toth	Q _{max}	35.17	0.977
		b	0.058	
		n	5.00	
Bakteri / SD-NF 7 gün	Freundlich	K _f	6.2	0.943
		1/n	0.15	
	Langmuir	Q _{max}	21.30	0.989
		b	0.04	
	L-F	Q _{max}	21.30	0.983
		b	0.04	
		1/n	1	
	Linear	K _p	0.09	0.914
	Toth	Q _{max}	20.98	0.999
		b	0.02	
		n	2.43	

Tablo 12 ise bakteri/SD-NF örnekleri ile gerçekleştirilen RB5 giderimi için hesaplanmış adsorpsiyon izoterm katsayılarını göstermektedir. RB5 adsorpsiyon verilerine göre en çok uygunluk gösteren model Toth adsorpsiyon modeli olup, Ry^2 verileri bakteri/SD-NF 24 saat örneği için 0,977 iken ($Q_{max} = 35,17$ mg/g) bakteri/SD-NF 7 gün örneği için 0,999'dir ($Q_{max} = 20,98$ mg/g). Buna göre boyar madde giderimi hererojen olup bakteri/CD nanofiber için çok katmanlı bir yapısı vardır.

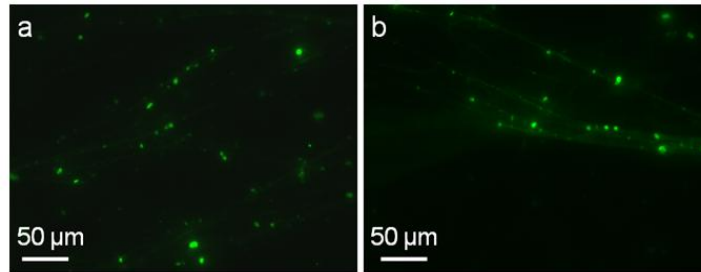
Bu çalışma ile atıksulardaki kirleticileri başarılı bir şekilde giderme özelliği olan *Lysinibacillus* sp. NOSK bakterisinin SD nanoliflerine enkapsülasyonu çalışması başarılı bir şekilde yapılmıştır. Elektrospin koşulları homojen ve boncuksuz nanoliflerin en yüksek bakteri içerecek şekilde optimize edilmiştir. Ayrıca, canlı boyama yöntemi ile nanolif içerisine enkapsüle edilen bakteriler florasan mikroskobu ile gösterilmiştir. Ayrıca, bakteriler nanolif içerisinde 24 saat ve 7 gün boyunca buzdolabında (4°C'de) bekletilerek kalan canlı hücre sayısı belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda, SD nanolifi içerisine enkapsüle edilmiş *Lysinibacillus* sp. NOSK hücrelerinin canlılıklarının uzun süre korunduğu ve SD nanolif sisteminin uygulama çalışmalarında kolaylık sağlayacağı belirlenmiştir. Çalışma sonunda üretilen biyokompozit sisteminin gerekli optimizasyonları yapıldıktan sonra atık sulardaki ağır metal ve boyar madde gideriminde kullanılabileceği sonucuna ulaşılmaktadır.

4.3 Çekirdek-kabuk yöntemi ile bakterilerin nanolif yapılarına enkapsülasyonu ve elde edilen nanoliflerin atık su gideriminde kullanımı

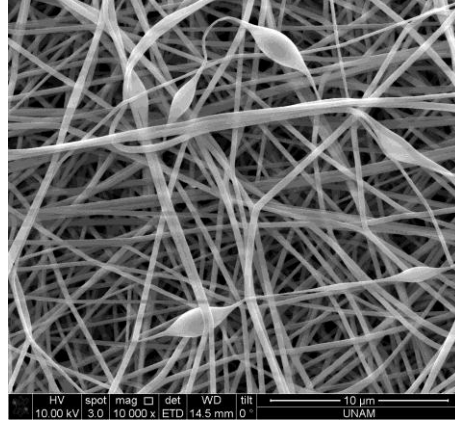
4.3.1 Çekirdek-kabuk yöntemini kullanarak PVA nanoliflerinin içerisine bakteri enkapsülasyonu ve elde edilen nanoliflerin atık su gideriminde kullanımı

Projenin bu aşamasında sulu sistemde hazırlanan polivinil alkol (PVA) çözeltisi kabuk, bakteri çözeltisi ise çekirdek kısmını oluşturacak şekilde çekirdek-kabuk yöntemi kullanılarak bakterilerin PVA nanolifleri içerisine enkapsülasyonu sağlanmıştır. Bu yöntemin direkt enkapsülasyona göre bakteri canlılığının korunmasında daha etkili olacağı düşünülmüştür. Enkapsüle edilecek bakteri için önceden bahsedilen *Halomonas variabilis* izolesi seçilmiştir. Bu izolenin seçilme nedeni ekstrem koşullara dayanıklılık ve boya giderimi için kullanılabilme potansiyelinin olmasıdır (Şekil 46). Su içerisinde %10'luk hazırlanan PVA çözeltisi ile OD₆₀₀ değeri 1,0'e tekabül eden optik yoğunluktaki bakteri karışımı sırasıyla çekirdek ve kabuk yapılarını oluşturmuştur. Özel bir aparat yardımıyla iki şırınganın bağlantısı sağlanmış, ve iki şırınga farklı şırınga pompaları üzerine yerleştirilip farklı hızlarla ittirilerek çekirdek-kabuk yapısında nanolifler elde edilmeye çalışılmıştır. Kabuk yapıyı oluşturan PVA çözeltisi çok daha hızlı bir şekilde ittirilirken (0,3 mL/saat), çekirdek yapıyı oluşturan bakteri çözeltisinin

yavaş bir şekilde ittirilmesi gerekmiştir (0,06 mL/saat). Nanolifler 10-15 kV aralığında yüksek voltaj uygulanarak üretilmiştir. Diğer parametreler ve deney koşulları direkt enkapsülasyon çalışmasında bahsedilenlerle aynıdır. Enkapsülasyon öncesinde üretilcek olan nanoliflerin bir kısmı için bakteriler yukarıda belirtilen Live/Dead boyama kiti yardımıyla boyanmış ve elektrospin sonrasında floresan mikroskobu ile görüntülenmiştir. Şekil 70’de görüleceği üzere canlı bakteri enkapsülasyonuna bağlı olarak parlak yeşil floresan gözlemlenmiştir. Bakteri enkapsülasyonu ayrıca SEM analizi ile de görüntülenmiş ve bakteri enkapsülasyonunu teyit eden Rugby topuna benzer şekilde ortada şişkin ama kenarlarda daha ince top benzeri yapılar gözlemlenmiştir (Şekil 71). Enkapsüle olmuş olan bakterilerin canlılığını doğru bir şekilde tespit edebilmek için üretilen nanolifler belli miktarda su içerisinde çözünüp normalizasyon işlemi uygulanmış, ve optik yoğunluk ölçümü yapılarak ilk girişteki ve enkapsülasyon sonrasındaki bakteri canlılıkları kıyaslanmıştır. Buna göre enkapsülasyon sonrasındaki bakterilerin optik yoğunluğu (OD_{600}) 0.47 dolaylarında ölçülmüştür. Bu sonuç beklenildiği üzere çekirdek-kabuk yönteminin bakteri canlılığının korunmasında direkt enkapsülasyon yöntemine göre çok daha verimli olduğu sonucunu desteklemektedir. Ancak direkt enkapsülasyon yönteminin çok daha kolay olması (örn. yalnızca bir adet şırınga pompası gerekmesi) ve bakteri canlılığının korunmasında çekirdek-kabuk yöntemine göre daha başarısız olsa bile aynı sürede pompalama hızından dolayı çok daha fazla bakteri enkapsülasyonu sağlaması direkt enkapsülasyon yönteminin başlıca avantajlarını oluşturmaktadır. Direkt enkapsülasyon yönteminde, ilk giren bakteri miktarının gereken şekilde ayarlanması ile yüksek miktarda bakteri kaybında bile elektrospin sonrasında yeterli miktarda canlı bakteri içeren nanoliflerin üretilebileceği görülmüştür. Bu nedenle çekirdek-kabuk yönteminin çok büyük bir avantaj getirmediği söylenilebilir.

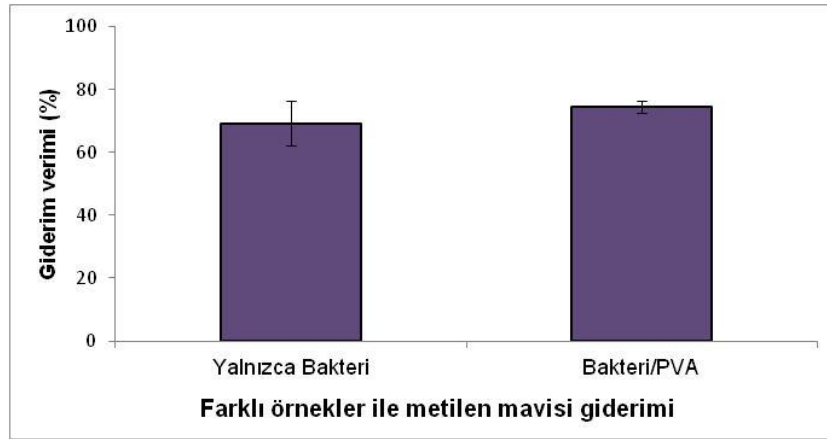


Şekil 70. Bakteri enkapsüle edilmiş PVA nanoliflerinin farklı bölgelerden alınmış floresan mikroskobu görüntüleri (a-b). Parlak yeşil floresan ışması canlı bakteri varlığına tekabül etmektedir.



Şekil 71. Bakteri enkapsüle edilmiş PVA nanoliflerinin SEM görüntüsü. Şişkin top benzeri yapılar bakteri enkapsülasyonuna işaret etmektedir.

Nanoliflerin üretiminden sonra eşlenik örnekler hazırlanarak (1,6 mg/mL, w/v), 50 mg/L'lik başlangıç metilen mavisi konsantrasyonu için bakteri enkapsüle edilmiş PVA nanoliflerinin boya giderim başarıları test edilmiştir. Şekil 72'de görüleceği üzere bu nanolifler 48 saat içerisinde yalnızca bakteri örneğini de geçerek, %75 civarında giderim başarıları göstermiştir. Bu sonuç oldukça tatminkardır ve enkapsüle edilen bakteri miktarında yapılacak olan optimizasyon ile daha başarılı sonuçların elde edilmesi mümkündür.



Şekil 72. Yalnızca bakteri (*Halomonas variabilis*) ve bakteri enkapsüle edilmiş PVA nanolif örneklerinin metilen mavisi giderim yüzdeleri (sıcaklık 30°C, çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon süresi: 48 saat).

5. SONUÇ

Sonuç olarak, bu projede elektrospin yöntemi ile üretilen nanoliflere, ağır metal, tekstil boyar maddesi ve deterjan giderimi yapabilen özellikteki bakterilerin farklı yöntemlerle entegrasyonu sağlanmış, daha sonra üretilen bu malzemelerin atık su arıtımındaki potansiyelleri araştırılmıştır. Bakterilerin nanoliflerle entegrasyonu doğal tutunma, direkt enkapsülasyon ve çekirdek-kabuk enkapsülasyon olmak üzere üç farklı yaklaşımla gerçekleştirilmiştir. Birinci yaklaşımda, homojen morfolojide elde edilen selüloz asetat (SA), polisülfon (PSU), polikaprolakton (PCL), polilaktikasit (PLA) ve polistiren (PS) nanoliflerinin yüzeyine bakteriler doğal yollarla tutundurulmuştur. Nanoliflerin bir kısmı gözenekli, paralel diziliimli ve farklı çaplara sahip olarak üretilmiş, böylece nanolif/nanoağ yapılarının morfoloji veya dizilimindeki değişikliklerin bakteri tutunmasında neden olabileceği farklılıklar incelenmiştir. Bu yaklaşımda üretilen biyokompozitler hem deterjan, hem ağır metal, hem de boya giderimi çalışmalarında kullanılmıştır. İkinci yaklaşımda, polivinilalkol (PVA) ve polietilenoksit (PEO) polimerleri ile siklodekstrin (CD) molekülleri kullanılarak, bakterilerin nanolif yapılarına direkt enkapsülasyonu sağlanmıştır. Bu yaklaşımda üretilen biyokompozitler hem boya, hem de ağır metal giderimi çalışmalarında kullanılmıştır. Üçüncü yaklaşımda, bakterilerin polimer yapısına direkt entegrasyonu sırasında çıkabilecek kayıpları minimize etmek amacıyla eş merkezli hizalanmış iki iğnenin kullanıldığı koaksiyal elektrospin sistemi ile, çekirdek-kabuk yapısında nanolifler üretilmiştir. Bu yaklaşımda üretilen biyokompozit malzeme yalnızca boya giderimi çalışmasında kullanılmıştır. Üretilen tüm biyokompozit malzemelerin daha sonra entegre edilen bakterinin özelliğine göre endüstriyel atık su arıtımındaki kullanım potansiyelleri test edilerek değerlendirilmiş ve umut vaat eden sonuçlara ulaşılmıştır. Başarılı bir şekilde tamamladığımız bu projemizdeki çıktıların fonksiyonel yeni nesil filtrasyon malzemelerinin geliştirilmesine öncülük edeceğini düşünmekteyiz.

Bu proje kapsamında çıkan yayınlar:

- 1)** Omer Faruk Sarioglu, Asli Celebioglu, Turgay Tekinay*, **Tamer Uyar***, “Evaluation of fiber diameter and morphology differences for electrospun fibers on bacterial immobilization and bioremediation performance” **International Biodeterioration & Biodegradation**, 120, 66-70, **2017** (DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.02.010)
- 2)** Omer Faruk Sarioglu, Nalan Oya San Keskin, Asli Celebioglu, Turgay Tekinay*, **Tamer Uyar***, “Bacteria encapsulated electrospun nanofibrous webs for remediation of textile dye in water” **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 152, 245–251, **2017** (DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.01.034)
- 3)** Omer Faruk Sarioglu, Asli Celebioglu, Turgay Tekinay*, **Tamer Uyar***, “Bacteria immobilized electrospun fibrous polymeric webs for hexavalent chromium remediation in

water" **International Journal of Environmental Science and Technology**, 13(8), 2057-2066, **2016** (DOI :10.1007/s13762-016-1033-0).

4) Omer Faruk Sarioglu, Asli Celebioglu, Turgay Tekinay*, **Tamer Uyar***, "Evaluation of contact time and fiber morphology on bacterial immobilization for development of novel surfactant degrading nanofibrous webs" **RSC Advances**, 5, 102750-102758, **2015** (DOI: 10.1039/C5RA20739H)

5) Nalan Oya San Keskin, Asli Celebioglu, Omer Faruk Sarioglu, **Tamer Uyar**, Turgay Tekinay, "Removal of Reactive Dye and Hexavalent Chromium by Reusable Bacteria Attached Electrospun Nanofibrous Web" **RSC Advances**, 5, 86867 - 86874, **2015** (DOI: 10.1039/C5RA15601G)

6) Nalan Oya San Keskin*, Asli Celebioglu, **Tamer Uyar***, Turgay Tekinay*, "Microalgae immobilized nanofibrous web for removal of reactive dyes from wastewater" **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 54 (21), 5802–5809, **2015** (DOI: 10.1021/acs.iecr.5b01033)

Bu proje kapsamında değerlendirme aşamasında olan yayınlar:

1) Nalan Oya San, Asli Celebioglu, Omer Faruk Sarioglu, Turgay Tekinay, **Tamer Uyar***, "Encapsulation of Living Bacteria in Electrospun Cyclodextrin Nanofibers for Bioremediation of Heavy Metals and Reactive Dye from Wastewater" **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** (under review)

2) Omer Faruk Sarioglu, Nalan Oya San, Asli Celebioglu, Turgay Tekinay, **Tamer Uyar***, "Bacteria immobilized electrospun polycaprolactone and polylactic acid fibrous webs for remediation of textile dyes in water" **Chemosphere** (revised)

Bu proje kapsamında sunulan uluslararası bildiriler:

1) Omer Faruk Sarioglu, N. Oya San Keskin, Asli Celebioglu, Turgay Tekinay, **Tamer Uyar** "Bacteria encapsulated/immobilized electrospun polymeric nanofibrous webs for wastewater treatment", **MACRO 2016-46th IUPAC World Polymer Congress**, Istanbul, Turkey, 17-21 July **2016** (Invited Talk)

2) Omer Faruk Sarioglu, N. Oya San Keskin, Asli Celebioglu, Turgay Tekinay, **Tamer Uyar** "Reusable bio-integrated electrospun fibrous webs for water cleaning purposes", **Electrospinning: Principles, Practice and Possibilities**, 3-4 December 2015, London, UK. **2015** (Oral Presentation)

3) Nalan O. San, Omer F. Sarioglu, Asli Celebioglu, Turgay Tekinay, **Tamer Uyar**, "Reusable bacteria immobilized electrospun nanofibrous webs for wastewater treatment" **250th American Chemical Society (ACS) National Meeting & Exposition**, Boston, Massachusetts, USA, August 16-20, 2015. (Oral Presentation)

Bu proje kapsamında sunulan ulusal bildiriler:

1) **Tamer Uyar*** "Electrospinning of Functional Nanofibers and Their Applications" **28th National Chemistry Congress**, Mersin, Turkey, August 15-21, 2016 (Invited Talk)

6. KAYNAKLAR

Agarwal, S., Greiner, A. 2011. "Nanofibers by electrospinning", *Polymers for Advanced Technologies*, 22, 372-8.

Agarwal, S., Wendorff, J. H., Greiner, A. 2010. "Chemistry on electrospun polymeric nanofibers: Merely routine chemistry or a real challenge?", *Macromolecular Rapid Communications*, 31, 1317-31.

Amna, T., Hassan, M. S., Pandeya, D. R., Khi, M. S. L., Hwang, I. H. 2013. "Classy non-wovens based on animate *L. gasseri*-inanimate poly(vinyl alcohol): upstream application in food engineering", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 4523–31.

Aoki, N., Nishikawa, M., Hattori, K. 2003. "Synthesis of chitosan derivatives bearing cyclodextrin and adsorption of p-nonylphenol and bisphenol A", *Carbohydrate Polymers*, 52, 219-23.

Barhate, R. S., Ramakrishna, S. 2007. "Nanofibrous filtering media: Filtration problems and solutions from tiny materials", *Journal of Membrane Science*, 296, 1-8.

Berna, J. L., Cassani, G., Hager, C. D., Rehman, N., Lopez, I., Schowanek, D., Steber, J., Toeger, K., Wind T. 2007. "Anaerobic biodegradation of surfactants", *Tenside Surfactants Detergents*, 44, 312-47.

Birgöl, A., Akal-Solmaz, S. K. 2007. "Tekstil endüstrisi atıksuları üzerinde ileri oksidasyon ve kimyasal arıtma prosesleri kullanılarak KOİ ve renk gideriminin araştırılması", *Ekoloji*, 15 (62), 72-80.

Bolong, N., Ismail, A. F., Salim, M. R., Matsuura T. 2009. "A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal", *Desalination*, 239, 229–46.

Celebioglu, A., Uyar, T. 2010. "Cyclodextrin nanofibers by electrospinning", *Chemical Communications*, 46, 6903-05.

Celebioglu, A., Uyar, T. 2011. "Electrospun porous cellulose acetate fibers from volatile solvent mixture", *Materials Letters*, 65, 2291–94.

Celebioglu, A., Uyar, T. 2012. "Electrospinning of nanofibers from non-polymeric systems: polymer-free nanofibers from cyclodextrin derivatives", *Nanoscale*, 4, 621-31.

Celebioglu, A., Uyar, T. 2013a. "Electrospinning of nanofibers from non-polymeric systems: Electrospun nanofibers from native cyclodextrins", *Journal of Colloid and Interface Science*, 404,1-7. (a)

Celebioglu, A., Uyar, T. 2013b. "Electrospun gamma-cyclodextrin (γ -CD) nanofibers for entrapment of volatile organic compounds", *RSC Advances*, 3, 22891–95. (b)

Chen, K. C., Wu, J. Y., Liou, D. J., Hwang, S. C. 2003. "Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains", *Journal of Biotechnology*, 101, 57–68.

Cooper, A., Oldinski, R., Ma, H., Bryers, J. D., Zhang, M. 2013. "Chitosan-based nanofibrous membranes for antibacterial filter applications", *Carbohydrate Polymers*, 92, 254–59.

Crini, G., Morcellet, M. 2002. "Synthesis and applications of adsorbents containing cyclodextrins", *Journal of Separation Science* 25, 789-813.

Ergul-Ulger, Z., Ozkan, A. D., Tunca, E., Atasagun, S., Tekinay T. 2013. "Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by live and acid-modified biomass of a novel *Morganella morganii* isolate", *Separation Science and Technology*, in press.

Eroglu, E., Agarwal, V., Bradshaw, M., Chen, X., Smith, S. M., Raston, C. L., Iyer, S. 2012. "Nitrate removal from liquid effluents using microalgae immobilized on chitosan nanofiber mats", *Green Chemistry*, 14, 2682-85.

Forrez, I., Carballa, M., Boon, N., Verstraete, W. 2009. "Biological removal of 17 α -ethinylestradiol (EE2) in an aerated nitrifying fixed bed reactor during ammonium starvation", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84, 119–25.

Fung, W., Yuen, K. H., Liong, M. T. 2011. "Agrowaste-based nanofibers as a probiotic encapsulant: fabrication and characterization", *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 59, 8140–47.

Gensheimer, B., Becker, M., Brandis-Heep, A., Wendorff, J. H., Thauer, R. K., Greiner, A. 2007. "Novel biohybrid materials by electrospinning: nanofibers of poly(ethylene oxide) and living bacteria", *Advanced Materials*, 19, 2480–82.

Gibson, D. J. 1984. "Microbial degradation of organic compounds", *Microbiology Series*, 13-21.

Greiner, A., Wendorff, J. H. 2007. "Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers", *Angewandte Chemie International Edition*, 46, 5670-5703.

Hanlon, E. B., Manoharan, R., Koo, T. W., Shafer, K. E., Motz, J. T., Fitzmaurice, M., Kramer, J. R., Itzkan, I., Dasari, R. R., Feld, M. S. 2000. "Prospects for in vivo Raman spectroscopy", *Physics in Medicine and Biology*, 45(2), R1-59.

Huang, L., Manickam, S. S., Cutcheon, J. R. 2013. "Development of eco-efficient micro-porous membranes via electrospinning and annealing of poly (lactic acid)", *Journal of Membrane Science*, 436, 213–20.

Iglewski, B.H. 2003. *Pseudomonas*. Texas: University of Texas Medical Branch.

Ispir, E., Serin, S. 2006. "Polysiloxanes and Their Applications", *KSU Journal of Science and Engineering*, 9, 46-51.

Kayaci, F., Aytac, Z., Uyar, T. 2013. "Surface modification of electrospun polyester nanofibers with cyclodextrin polymer for the removal of phenanthrene from aqueous solution", *Journal of Hazardous Materials*, 261, 286-94.

Klein, S., Avrahami, R., Zussman, E., Beliaevski, M., Tarre, S., Green, M. 2012. "Encapsulation of *Pseudomonas* sp. ADP cells in electrospun microtubes for atrazine bioremediation", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39, 1605–13.

Klein, S., Kuhn, J., Avrahami, R., Tarre, S., Beliaevski, M., Green, M., Zussman, E. 2009. "Encapsulation of bacterial cells in electrospun microtubes", *Biomacromolecules*, 10, 1751–56.

Korehei, R., Kadla, J. F. 2014. "Encapsulation of T4 bacteriophage in electrospun poly(ethyleneoxide)/cellulose diacetate fibers", *Carbohydrate Polymers*, 100, 150-57.

Li, S. F., Fan, Y. H., Hu, R. F., Wu, W. T. 2011a. "*Pseudomonas cepacia* lipase immobilized onto the electrospun PAN nanofibrous membranes for biodiesel production from soybean oil", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72, 40-45.

Li, S. F., Fan, Y. H., Hua, J. F., Huang, Y. S., Wu, W. T. 2011b. "Immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase onto the electrospun PAN nanofibrous membranes for transesterification reaction", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 73, 98-101.

- Li, L., Hashaikh, R., Arafat, H. A. 2013. "Development of eco-efficient micro-porous membranes via electrospinning and annealing of poly (lactic acid)", *Journal of Membrane Science*, 436, 57–67.
- Li, D., Xia, Y. 2004. "Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel?", *Advanced Materials*, 16, 1151-70.
- Liu, Y., Gan, L., Chen, Z., Megharaj, M., Naidu, R. 2012. "Removal of nitrate using *Paracoccus* sp. YF1 immobilized on bamboo carbon", *Journal of Hazardous Materials*, 229–30.
- Lopez-Rubio, A., Sanchez, E., Sanz, Y., Lagaron, J. M. 2009. "Encapsulation of living bifidobacteria in ultrathin PVOH electrospun fibers", *Biomacromolecules*, 10, 2823–29.
- Lugo-Lugo, V., Barrera-Díaz, C., Bilyeub, B., Balderas-Hernández, P., Ureña-Nuñez, F., Sánchez-Mendieta, V. 2010. "Cr(VI) reduction in wastewater using a bimetallic galvanic reactor", *Journal of Hazardous Materials*, 176, 418–25.
- Mahanta, N., Valiyaveetil, S. 2013. "Functionalized poly(vinyl alcohol) based nanofibers for the removal of arsenic from water", *RSC Advances*, 3, 2776–278.
- O'Hara, C. M., Brenner, F. W., Miller, J. M. 2000. "Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*", *Clinical Microbiology Reviews*, 13 (4), 534–46.
- Olah, J., Cserhati, T., Szejtli, J. 1988. "β-Cyclodextrin enhanced biological detoxification of industrial wastewaters", *Water Research*, 22, 1345-55.
- Pagga, U., Beimborn, D. B. 1993. "Anaerobic biodegradation test for organic compounds", *Chemosphere*, 27, 1499-1509.
- Pham, Q. P., Sharma, U., Mikos, A. G. 2006. "Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: A review", *Tissue Engineering*, 12, 1197-1211.
- Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W., Lim, T., Ma, Z. 2005. "An introduction to electrospinning and nanofibers", *World Scientific Publishing Company*.
- Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W., Lim, T., Ma, Z., Ramaseshan, R. 2006. "Electrospun nanofibers: solving global issues", *Materials Today*, 9, 40–50.

Raveendran, S., Dhandayuthapani, B., Nagaoka, Y., Yoshida, Y., Maekawa, T. D. S., Kumar, 2013. "Biocompatible nanofibers based on extremophilic bacterial polysaccharide, Mauran from *Halomonas maura*", Carbohydrate Polymers, 92, 1225-33.

Sahay, R., Kumar, S., Sridhar, R., Sundaramurthy, J., Venugopal, J., Mhaisalkar, S. G., Ramakrishna, S. 2012. "Electrospun composite nanofibers and their multifaceted applications", Journal of Material Chemistry, 26, 12953-71.

Sakai, S., Liu, Y., Yamaguchi, T., Watanabe, R., Kawabe, M., Kawakami, K. 2010. "Production of butyl-biodiesel using lipase physically-adsorbed onto electrospun polyacrylonitrile fibers", Bioresource Technology, 101, 7344-49.

Salalha, W., Kuhn, J., Dror, Y., Zussman, E. 2006. "Encapsulation of bacteria and viruses in electrospun nanofibres", Nanotechnology, 17, 4675-81.

San, N. O., Celebioglu, A., Tümtaş, Y., Uyar, T., Tekinay, T. 2014. "Reusable bacteria immobilized electrospun nanofibrous webs for decolorization of methylene blue dye in wastewater treatment", RSC Advances, 2014, 4, 32249-55.

San-Keskin, N. O., Celebioglu, A., Uyar, T., Tekinay, T. 2015a. "Microalgae Immobilized by Nanofibrous Web for Removal of Reactive Dyes from Wastewater", Industrial & Engineering Chemistry Research, 2015, 54, 5802-09. (a)

San-Keskin, N. O., Celebioglu, A., Sarioglu, O. F., Ozkan, A. D., Uyar, T., Tekinay, T. 2015b. "Removal of a reactive dye and hexavalent chromium by a reusable bacteria attached electrospun nanofibrous web", RSC Advances, 2015, 5, 86867-74. (b)

Sarioglu, O. F., Yasa, O., Celebioglu, A., Uyar, T., Tekinay, T. 2013. "Efficient ammonium removal from aquatic environments by *Acinetobacter calcoaceticus* STB1 immobilized on electrospun cellulose acetate nanofibrous web", Green Chemistry, 15, 2566-72.

Sarioglu, O. F., Celebioglu, A., Tekinay, T., Uyar, T. 2015. "Evaluation of contact time and fiber morphology on bacterial immobilization for development of novel surfactant degrading nanofibrous webs", RSC Advances, 5, 102750-8.

Sarioglu, O. F., Celebioglu, A., Tekinay, T., Uyar, T. 2016. "Bacteria-immobilized electrospun fibrous polymeric webs for hexavalent chromium remediation in water", International Journal of Environmental Science and Technology, 13, 2057-66.

Socrates, G. 2004. Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts (3. Basım), New Jersey: Wiley.

Talari, A. C. S., Movasaghi, Z., Rehman, S., ur Rehman, I. 2007. "Raman Spectroscopy of Biological Tissues", Applied Spectroscopy Reviews, 42, 493–541.

Tong, H. W., Mutlu, B. R., Wackett, L. P., Aksan, A. 2013. "Silica/PVA biocatalytic nanofibers", Materials Letters, 111, 234–37.

Tuttolomondo, M. V., Alvarez, G. S., Desimone, M. F., Diaz, L. E. 2014. "Removal of azo dyes from water by sol–gel immobilized *Pseudomonas* sp.," Journal of Environmental Chemical Engineering, 2, 131–36.

Uyar, T., Havelund, R., Hacaloglu, J., Besenbacher, F., Kingshott, P. 2010. "Functional electrospun polystyrene nanofibers incorporating α -, β -, and γ -cyclodextrins: Comparison of molecular filter performance", ACS Nano, 4, 5121-30.

Uyar, T., Havelund, R., Nur, Y., Hacaloglu, J., Besenbacher, F., Kingshott, P. 2009. "Molecular filters based on cyclodextrin functionalized electrospun fibers", Journal of Membrane Science, 332, 129–37.

Vajdai, A., Szabó, B., Süveg, K., Zelkó, R., Újhelyi, G. 2012. "Tracking of the viability of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteria population in polyvinylalcohol nanofiber webs by positron annihilation lifetime spectroscopy", International Journal of Pharmaceutics, 429, 135-37.

Van Ginkel, C. G. 1996. "Complete degradation of xenobiotic surfactants by consortia of aerobic microorganisms", Biodegradation, 7, 151-64.

Wendorff, J. H., Agarwal, S., Greiner, A. 2012. "Electrospinning: materials, processing, and applications", Wiley-VCH, Germany.

Xiao, Y. C., Chung, T. S. 2007. "Functionalization of cellulose dialysis membranes for chiral separation using beta-cyclodextrin immobilization", Journal of Membrane Science, 290, 78-85.

Xie, J., Li, X., Xia, Y. 2008. "Putting electrospun nanofibers to work for biomedical research", Macromolecular Rapid Communications, 29, 1775-92.

Xie, J., Mac Ewan, M. R., Schwartz, A.G., Xia, Y. 2010. "Electrospun nanofibers for neural tissue engineering", Nanoscale, 2, 35-44.

Yılmaz, Ö., Sunlu, U, Sunlu, F.S. 2006. "İzmir Körfezi'nde Anyonik Deterjan Düzeylerinin Araştırılması", E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, 23, 107-11.

Yoon, K., Hsiao, B., Chu, B. 2008. "Functional nanofibers for environmental applications", Journal of Material Chemistry, 18, 5326–34.

Zhou, X., Xiang, X. 2013. "Effect of different plants on azo-dye wastewater bio-decolorization", Procedia Environmental Sciences, 18, 540-46.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. TAMER UYAR
Proje No:	114Y264
Proje Başlığı:	Elektrospin yöntemi ile üretilmiş nanolif/nanoağ yapılara biyoremediasyon özelliği bulunan bakteri entegrasyonu ve bu biyokompozit malzemelerin farklı endüstriyel kirleticiler içeren atık su giderimindeki verimliliğinin araştırılması
Proje Türü:	Uluslararası
Proje Süresi:	24
Araştırmacılar:	TURGAY TEKİNAY, NALAN OYA SAN KESKİN
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İHSAN DOĞRAMACI BİLKENT Ü. NANOTEKNOLOJİ ARAŞTIRMA MERKEZİ
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/11/2014 - 01/11/2016
Onaylanan Bütçe:	266787.0
Harcanan Bütçe:	202667.58
Öz:	Elektrospin yöntemi, değişik polimerlerden, polimer karışımlarından, inorganik malzemelerden, supramoleküler yapılardan ve kompozitlerden nanolif/nanoağ elde edilen, kolay ve maliyeti düşük bir üretim tekniğidir. Üstün özelliklere, birçok işleve sahip olan ve fiziksel/kimyasal yollarla modifiye edilebilen bu nanolifler özellikle membran/filtre uygulamalarında yüksek kullanım potansiyeline sahiptirler. Günümüzde biyoteknoloji alanındaki gelişmeler sayesinde ağır metal, tekstil boyar maddesi ve deterjan kirleticilerini içeren atık sularda üreyebilen ve bu kirleticilere karşı direnci fazla olan bakterilerin bahsedilen kirleticilerin gideriminde kullanılabildikleri bilinmektedir. Bakterilerden daha verimli bir şekilde yararlanmak ve daha kullanışlı hale getirebilmek için, taşıyıcı bir malzeme ile entegre ederek kullanmak oldukça yeni ve özgün bir yaklaşımdır. Nanoboyutta kompozit yapıların geliştirilmesine olanak sağlayan elektrospin tekniği ve bu teknik kullanılarak elde edilen nanolif yapıları, farklı amaçlarla kullanılabilecek bakterilerin immobilizasyonu/enkapsülasyonu için oldukça elverişli malzemelerdir. Proje çalışması kapsamında, elektrospin yönetimi ile üretilen nanoliflere, ağır metal, tekstil boyar maddesi ve deterjan giderimi yapabilen bakterilerin immobilizasyon/enkapsülasyon teknikleri kullanılarak entegrasyonu sağlanarak elde edilen biyokompozit malzemelerin atık su arıtımındaki potansiyelleri araştırılmıştır. Bu projede ağır metal, tekstil boyar maddesi ve deterjan giderim özelliği gösteren bakterilerin nanoliflerle entegrasyonu üç farklı yaklaşımla gerçekleştirilmiştir. Birinci yaklaşımda, homojen morfolojide elde edilen selüloz asetat (SA), polisülfon (PSU), polikaprolakton (PCL), polilaktik asit (PLA) ve polistiren (PS) nanoliflerinin yüzeyine fiziksel yollarla bakteriler immobilize edilmiştir. Nanolif/nanoağ morfoloji veya dizilimdeki değişikliklerin bakteri tutunmasında neden olabileceği farklılıkları incelemek açısından, nanoliflerin bir kısmının gözenekli, paralel dizimli ve farklı çaplara sahip halleri de üretilerek etkileri araştırılmıştır. İkinci yaklaşımda ise, polivinilalkol (PVA), polietilenoksit (PEO) polimerleri ile siklodekstrin (CD) molekülleri kullanılarak, bakterilerin nanolif yapılarına eş zamanlı enkapsülasyonu sağlanmıştır. Üçüncü yaklaşımda ise, bakterilerin polimer yapısına direkt entegrasyonu sırasında çıkabilecek kayıpları azaltmak amacıyla eş merkezli hizalanmış iki iğnenin kullanıldığı koaksiyal elektrospin sistemi kullanılarak, çekirdek-kabuk yapısında nanolifler üretilmiştir. Daha sonra, tüm bu yöntemlerle üretilen biyokompozit malzemelerin, entegre edilen bakterinin özelliğine göre endüstriyel atık su arıtımındaki kullanım potansiyelleri değerlendirilmiştir.
Anahtar Kelimeler:	elektrospin, nanolif, bakteri, ağır metal, boya, biyoremediasyon, immobilizasyon, enkapsülasyon
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır

Proje Den Yapılan Yayınlar:	1- Microalgae Immobilized by Nanofibrous Web for Removal of Reactive Dyes from Wastewater (Makale - Diğer Hakemli Makale), 2- Removal of Reactive Dye and Hexavalent Chromium by Reusable Bacteria Attached Electrospun Nanofibrous Web (Makale - Diğer Hakemli Makale), 3- Reusable bacteria immobilized electrospun nanofibrous webs for wastewater treatment (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum), 4- Evaluation of contact time and fiber morphology on bacterial immobilization for development of novel surfactant degrading nanofibrous webs (Makale - İndekli Makale), 5- Reusable bio-integrated electrospun fibrous webs for water cleaning purposes (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum), 6- Bacteria-immobilized electrospun fibrous polymeric webs for hexavalent chromium remediation in water (Makale - İndekli Makale), 7- Elektro-Eğirme Yöntemi ile Fonksiyonel Nanoliflerin Üretilmesi ve Uygulama Alanları (Bildiri - Ulusal Konferans - Davetli Konuşmacı), 8- Bacteria encapsulated/immobilized electrospun polymeric nanofibrous webs for wastewater treatment (Bildiri - Uluslararası Konferans - Davetli Konuşmacı), 9- DEVELOPMENT OF BIOINTEGRATED ELECTROSPUN NANOFIBERS FOR ENVIRONMENTAL APPLICATIONS (Tez (Araştırmacı Yetiştirilmesi) - Doktora Tezi),
-----------------------------	---

TÜBİTAK