

**LİGNİN VE TEKSTİL BOYALARININ *STREPTOMYCES* SP. SUŞLARI
KULLANILARAK PARÇALANMASININ ARAŞTIRILMASI**

ELİF AYŞE ERDOĞAN

**Mersin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü**

Biyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Münir TUNCER**

**MERSİN
Haziran – 2008**

Bu tezin gerek bilimsel içerik gerekse elde edilen sonuçlar açısından tüm gerekleri sağladığı kanaatine ulaşan aşağıda imzaları bulunan biz jüri üyeleri sunulan tezi oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul ediyoruz.

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Münir TUNÇER



Jüri Üyesi
Prof. Dr. Mustafa ÖZYURT



Jüri Üyesi
Doç. Dr. Gökhan CORAL



Bu tezin Fen Bilimleri Enstitüsü yazım kurallarına uygun olarak yazıldığı Enstitü yönetim kurulunun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mahir TURHAN
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ÖZ

Bu çalışmada, lignoselülitik aktiviteleri bilinen, fakat tekstil boyalarının renklerinin giderilmesi konusundaki aktiviteleri henüz araştırılmamış olan; farklı bölgelerinden izole edilmiş ve tanımlaması yapılmış olan üç mezofilik *Streptomyces* sp. suşu seçilmiştir. Çalışmada kullanılan suşların hepsinde de en yüksek renk giderim aktiviteleri, 10 günlük inkübasyon periyodunun 4. ve 5. günlerinde belirlenmiştir. Çalışılan suşların hepsi de en yüksek renk giderim aktivitesini, Remazol Blue içeren kültür ortamına ilave karbon ve enerji kaynağı olarak yulaf ksilanının (%0,4 w/v) eklenmiş olduğu kültür koşullarında gerçekleştirmiştir. En yüksek renk giderim aktivitesi ise *Streptomyces* sp. IAUR8812 (%92) tarafından %0,4 (w/v) yulaf ksilanı içeren kültür ortamlarında belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan diğer iki suş olan *Streptomyces* sp. F0812 ve *Streptomyces* sp. Y1401'in renk giderim aktiviteleri ise aynı kültür ortamında sırasıyla, %88 ve %86 olarak gerçekleşmiştir. Buna paralel olarak, en yüksek peroksidaz aktivitesi ise *Streptomyces* sp. IAUR8812 (1,465 U/mL) ve *Streptomyces* sp. Y1401 (0,638 U/mL) tarafından yulaf ksilanı içeren sıvı kültür ortamlarında üretilirken, *Streptomyces* sp. F0812 (0,572 U/mL) ise en yüksek peroksidaz aktivitesini buğday samanı ilave edilmiş kültür ortamında üretmiştir.

Streptomyces sp. suşları tarafından gerçekleştirilen renk giderim aktiviteleri ile paralel olarak ürettiği oldukları ekstrasellüler peroksidaz aktivitelerinin PAGE analizleri sonucunda ise *Streptomyces* sp. F0812 suşunun 3 ekstrasellüler peroksidaz izomeri tespit edilirken, *Streptomyces* sp. FY1401 ve *Streptomyces* sp. IAUR8812 suşlarının ise 2'şer ekstrasellüler peroksidaz izomeri tespit edilmiştir. Fakat yapılan zymogram çalışmaları, bu suşların Remazol Blue boyar maddesinin renk gideriminde rol alan enzimlerin ekstrasellüler peroksidaz enzimleri olmadığına işaret etmektedir.

Anahtar kelimeler: Renk giderimi, Remazol Blue, lignoselüloz, peroksidaz, tekstil boyası, *Streptomyces*.

ABSTRACT

In this study, decolorisation activities of three mesophilic *Streptomyces* sp. strains, which were isolated and identified from different regions and lignocelulolytic activities have been studied previously, were investigated. All of these strains exhibited the greatest decolorisation activities at the 4th-5th day of the incubation period. All of the strains used in this study also exhibited the greatest decolorisation activities in Remazol Blue containing liquid cultures with supplemented by oat spelt xylan (0,4% w/v) as additional carbon and energy sources. The greatest decolorisation activities (92%) were observed by *Streptomyces* sp. IAUR8812, which were grown in the presence of %0.4 (w/v) oat spelt xylan as a supplementary carbon and energy source. The highest decolorisation activities by *Streptomyces* sp. F0812 and *Streptomyces* sp. Y1401 which were the other strains used in this study, were observed as 88% and 86%, respectively, in the same culture medium. As parallel to these findings, the highest extracellular peroxidase production by *Streptomyces* sp. IAUR8812 (1.465 U/mL) and *Streptomyces* sp. Y1401 (0.638 U/mL) were occurred in the presence of %0.4 (w/v) oat spelt xylan as a supplementary carbon and energy source while *Streptomyces* sp. F0812 (0.572 U/mL) in ball milled wheat straw containing culture conditions.

The analysis of extracellular peroxidases by PAGE revealed that *Streptomyces* sp. F0812 has 3 extracellular peroxidase isomers, while each of the *Streptomyces* sp. IAUR8812 and *Streptomyces* sp. Y1401 have 2 extracellular peroxidase isomers. But, zymogram analysis of extracellular peroxidase isomers with Remazol Blue as a substrate showed no activity against this substrate. These findings indicate that decolorisation activities of *Streptomyces* sp. Strains are different than extracellular peroxidases.

Key words: Decolorisation, Remazol Blue, lignocellulose, peroxidase, textile dyes, *Streptomyces*.

TEŐEKKÖR

Tez hazırlığının bütÖn aşamalarında yanımda olup yol gösteren, bilgisini ve tecrÖbesini hiÇbir zaman esirgemedен paylaşan hocam DoÇ. Dr. MÖnir TUNCER'e sonsuz teŐekkÖrler.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa:

ÖZ	<i>i</i>
ABSTRACT	<i>ii</i>
TEŞEKKÜRLER	<i>iii</i>
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	<i>iv</i>
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. RENK VE BOYAR MADDELER	3
2.2. TEKSTİL BOYAR MADDELERİNİN SINIFLANDIRILMASI ...	5
2.2.1. Çözünürlük özelliklerine göre boyar maddeler	5
2.2.2. Kimyasal yapılarına göre boyar maddeler	6
2.2.3. Uygulandıkları elyaf türüne göre boyar maddeler	6
2.2.4. Boyama özelliklerine göre boyar maddeler	7
2.2.4.1. Direkt boyar maddeler	7
2.2.4.2. Asit boyar maddeler	7
2.2.4.3. Bazik boyar maddeler	8
2.2.4.4. Mordan boyar maddeler	8
2.2.4.5. Küpe boyar maddeleri	9
2.2.4.6. Azoik (Naftol As) boyar maddeler	9
2.2.4.7. Dispersiyon boyar maddeleri	9
2.2.4.8. Pigment boyar maddeler	10
2.2.4.9. Metal-kompleks boyar maddeleri	10
2.2.4.10. Reaktif boyar maddeler	10
2.3. EKOLOJİ AÇISINDAN TEKSTİL BOYAR MADDELERİNİN NEDEN OLDUKLARI PROBLEMLER.....	16
2.3.1. AB'nin ve Türkiye'nin ekolojik tekstil konusundaki Mevzuatı	19
2.3.1.1. AB mevzuatı	19
2.3.1.2. Türkiye'deki mevzuat	20

2.4. BOYAR MADDELERİN RENK GİDERİMİ ÇALIŞMALARI	20
2.4.1. Kimyasal Yöntemler	21
2.4.1.1. Oksidatif prosesler	21
2.4.1.2. Fenton ayıracağı ($H_2O_2/Fe(II)$ tuzları):	21
2.4.1.3. Ozonlama	21
2.4.1.4. Fotokimyasal işlemler	22
2.4.1.5. Sodyum Hipoklorit (NaOCl)	22
2.4.1.6. Elektrokimyasal işlemler	22
2.4.1.7. Kimyasal flokleştirme ve çöktürme yöntemi	22
2.4.2. Fiziksel Arıtım	23
2.4.2.1. Membran filtrasyonu	23
2.4.2.2. İyon değiştiriciler	23
2.4.2.3. Adsorpsiyon	23
2.4.2.4. Radyasyon	24
2.4.3. Biyolojik Arıtım	24
2.4.3.1. Biyosorbsiyon	24
2.4.3.2. Aerobik Yöntem	25
2.4.3.3. Anaerobik Yöntem	25
2.5. BOYAR MADDELERİN MİKROBİYOLOJİK OLARAK AYRIŞTIRILMASI	26
2.5.1. Funguslar, Algler ve Mayalarla Yapılan Çalışmalar	26
2.5.2. Bakterilerle Yapılan Çalışmalar	30
2.5.2.1. Aktinomisetlerle boyar maddelerin ayrıştırılması	33
2.5.3. Boyar Maddelerin Renk-Giderimini Gerçekleştiren Enzimler	35
3. MATERYAL ve METOD	41
3.1. MATERYAL	41
3.1.1. Kimyasallar ve Proteinler	41

3.1.2. Kullanılan <i>Streptomyces</i> Suşları	41
3.1.3. Cam Malzemeler	42
3.1.4. İnkübatörler	42
3.1.5. Santrifüjler	42
3.1.6. UV/Visible Spektrofotometre	42
3.1.7. Ultrafiltrasyon Sistemi	43
3.1.8. Elektroforez Sistemi	43
3.2. METOD	43
3.2.1. <i>Streptomyces</i> Suşlarının Kültürü ve Muhafazası	43
3.2.2. Buğday Samanının Hazırlanması	46
3.2.3. İnokulum Hazırlanışı	46
3.2.4. Remazol Blue dekolorizasyonunun büyüme kinetiği ile olan ilişkisi	46
3.2.5. Remazol Blue Dekolorizasyon Oranının Belirlenmesi	47
3.2.6. Farklı karbon kaynaklarının ekstrasellüler peroksidaz üretimi üzerine olan etkisi	47
3.2.7. Ekstrasellüler Protein Miktarlarının Tayini	48
3.2.8. Peroksidaz Aktivitesinin Tayini	49
3.2.9. <i>Streptomyces</i> sp. Enzimlerinin Elektroforetik Analizi	49
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	52
4.1. Remazol Blue Renk Giderimini Gerçekleştiren <i>Streptomyces</i> Suşlarının Seçimi	52
4.2. Remazol Blue Renk Gideriminin Büyüme Kinetiğine Bağlı Değişimi	55
4.3. Farklı Karbon Kaynaklarının Renk Giderimi Üzerine Olan Etkisi	60
4.4. Renk Giderimi İle Ekstrasellüler Peroksidaz Üretimi Arasındaki İlişki	64
4.5. <i>Streptomyces</i> Suşlarının Ekstrasellüler Proteinlerinin Elektroforetik Analizi	72

5. SONUÇ VE ÖNERİLER	75
KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ	94

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa :

Şekil 2.1. Kromofor ve oksokrom gruplar	4
Şekil 2.2. Kromojen ve oksokrom boyar maddeler	5
Şekil 2.3. Örnek bir reaktif boya molekülü	11
Şekil 2.4. Reaktif boya maddelerinin bazı önemli grupları	12
Şekil 2.5. Sülfatoetilsülfon yapıdaki boyalarının bazılarının kimyasal oluşumu ortaya çıkarılmıştır.	13
Şekil 2.6. Reaktif boyalardan olan bazı remazol boyalarının kimyasal yapıları ve ışık spektrumunda absorbladıkları dalga boyları.	14
Şekil 2.7. Azo boyar maddeleriyle Cr(III) metal iyonunun bağlanması	15
Şekil 2.8. <i>Trametes versicolor</i> ATCC 20869 suşu tarafından Amaranth boyasının dekolorizasyonunun önerilen mekanizması.	39
Şekil 3.1. Protein standardı olarak kullanılan BSA'nın değişik derişimlerinin Bradford metodu ile analizi sonucu elde edilen standart eğri.	48
Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan <i>Streptomyces</i> sp. ve <i>Actinomyces alboflavus</i> suşlarının Remazol Blue içeren katı besiyerindeki büyümeleri ve koloni görüntüleri.	52
Şekil 4.2. Çalışmada kullanılan <i>Streptomyces</i> sp. ve <i>Actinomyces alboflavus</i> suşlarının Remazol Blue (150 µg/mL) içeren sıvı besiyerinde statik olarak, 30 °C'de, 5 günlük inkübasyonları sonucundaki dekolorizasyon görüntüleri.	54
Şekil 4.3. Çalışmada kullanılan <i>Streptomyces</i> sp. ve <i>Actinomyces alboflavus</i> suşlarının Remazol Blue (150 µg/mL) içeren sıvı besiyerinde statik olarak, 30 °C'de, 5 günlük inkübasyonları sonucundaki dekolorizasyon aktiviteleri sonucunda kültür sıvılarının 1000-400 nm dalga boyundaki taramaları.	56
Şekil 4.4. Mikrobiyal suşların Remazol Blue (150 µg/mL) içeren sıvı besiyerinde statik olarak, 30 °C'de, 10 günlük inkübasyonları süresince renk giderim aktivitelerinin büyüme kinetiğine bağlı değişimi.	57

- Şekil 4.5. (a) *Streptomyces* sp. suşlarının Remazol Blue (150 µg/mL) içeren sıvı besiyerine ek karbon ve enerji kaynağı olarak öğütülmüş buğday samanının (% 0,6 w/v) ilave edilmiş olduğu statik koşullardaki, 30 °C’de, 10 günlük inkübasyonları süresince renk giderim aktivitelerinin büyüme kinetiğine bağlı değişimi. 62
- Şekil 4.6. *Streptomyces* sp. suşlarının Remazol Blue (150 µg/mL) içeren sıvı besiyerine ek karbon ve enerji kaynağı olarak yulaf ksilanının (%0,4 w/v) ilave edilmiş olduğu statik koşullardaki, 30 °C’de, 10 günlük inkübasyonları süresince renk giderim aktivitelerinin büyüme kinetiğine bağlı değişimi. 63
- Şekil 4.7. *Streptomyces* sp. suşlarının ilave karbon ve enerji kaynağı içermeyen sıvı besiyerinde (MS-YEM) statik koşullardaki, 30 °C’de, 10 günlük inkübasyonları süresince üretilen ekstrasellüler peroksidaz aktivitelerinin büyüme kinetiğine bağlı değişimi. 66
- Şekil 4.8. *Streptomyces* sp. suşlarının sıvı besiyerine ek karbon ve enerji kaynağı olarak öğütülmüş buğday samanı (%0,6 w/v) ilave edilmiş olduğu statik koşullardaki, 30 °C’de, 10 günlük inkübasyonları süresince üretilen ekstrasellüler peroksidaz aktivitelerinin büyüme kinetiğine bağlı değişimi. 67
- Şekil 4.9. *Streptomyces* sp. suşlarının Remazol Blue (150 µg/mL) içeren sıvı besiyerine ek karbon ve enerji kaynağı olarak yulaf ksilanı (%0,4 w/v) ilave edilmiş olduğu statik koşullardaki, 30 °C’de, 10 günlük inkübasyonları süresince üretilen ekstrasellüler peroksidaz aktivitelerinin büyüme kinetiğine bağlı değişimi.69
- Şekil 4.10. *Streptomyces* sp. suşları tarafından üretilen ekstrasellüler enzimlerinin elektroforetik (PAGE) olarak ayrıştırılması ve zymogram olarak geliştirilmesi 73

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa:

Çizelge 2.1. Tekstil liflerinin boyanmasında kullanılan boyar maddeler.....	18
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan <i>Streptomyces</i> sp. suşları ve optimal gelişme sıcaklıkları.	41
Çizelge 3.2. PAGE'lerin hazırlanması için kullanılan tampon sistemleri.....	51
Çizelge 4.1. Çeşitli tekstil boyalarını içeren katı besiyerlerindeki <i>Streptomyces</i> sp. suşlarının bu ortamlardaki büyüme, absorbsiyon ve renk giderim sonuçları.	53

1. GİRİŞ

Kâğıt, deri ve boya sanayii gibi birçok endüstriyel alanda özellikle de tekstil sanayiinde kullanılan boyar maddeler, sanayi atığı olarak çevreye verildiğinde ekosistemi önemli boyutta tehdit etmektedir. Tekstil ürünlerinin boyama, baskı ve yıkama işlemleri sonucunda oluşan renkli atıksular fabrikanın çıkış suyuna verilmektedir [1]. Gerek boyamada gerekse diğer işlemlerde kullanılan bu organik ve inorganik formdaki bileşiklerin çeşitliliğine bağlı olarak, ortaya çıkan atıksuların özellikleri de farklı olmaktadır.

Alıcı ortama verilen renkli atıksular, su ortamındaki ışık geçirgenliğini azaltır ve fotosentetik aktiviteyi olumsuz yönde etkiler. Ayrıca bu atıksular doğal ortamı renk, koku ve görüntü yönünden bozmakta, böylece ortamda bulunan doğal flora ve faunayı yok etmektedir. Bu nedenle boyar madde içeren tekstil endüstrisi atıksuların renk-giderim (dekolorizasyon) prosesleri ekolojik açıdan önem kazanmaktadır. Ancak kompleks kimyasal yapılarına ve sentetik kökenlerine bağlı olarak, boyar maddelerin giderilmesi oldukça zor bir işlemdir [1,2].

Tekstil ve boyama endüstrisinde kullanılan boyalar iki tiptir: doğal boyalar ve sentetik boyalar. Doğal boyar maddeler; doğada mevcut bitkilerin kök, gövde, yaprak, meyve ve meyve kabuklarının yapısında veya hayvanların, genelde ise kabuklu deniz böcekleri, salyangoz ve koşnil yapısında olan mevcut boyar maddeler olarak tanımlanabilir. Sentetik boyalar ise doğal boyar maddeye karşın hazır petrokimyasal hammaddeye dayanarak üretilirler. Sentetik boyalar doğal boyalarla karşılaştırıldığında renkleri oldukça çeşitli olup, sentezlenmeleri kolay, dayanıklı ve maliyeti ise ucuzdur. Doğal boyalar ise çok fazla miktarda bitki ve hayvan yetiştirilmesine ve endüstriyel olarak ürün toplama ve ekstraksiyon teknolojisine gerek duyulduğundan alan, maliyet ve zaman gibi sınırlayıcı etkenlere sahiptir [3,4].

Boyar maddenin kullanılabilirliğinin en önemli ölçütü, ışıkta ve yıkama esnasında kararlılığını en yüksek oranda koruması ve mikrobiyal saldırıya karşı dirençli olmasıdır. Bu nedenle boyar maddeler çoğunlukla parçalanamazlar ve arıtma tesislerinde tam olarak arıtılamazlar. Bütün boyar maddeler toksik olmasa da çevre kirleticisi olarak tanımlanmaktadır [5-7].

Tekstil'in yıllık dünya üretimi 30 milyon ton kadardır ve bunun için yılda ortalama 7×10^5 tonun üzerinde yaklaşık 10 000 farklı boya üretilmekte olup, bu boyaların %10'u endüstriyel arıtma tesisi çıkış suları ile alıcı su ortamlarına verilmektedir [8-10]. Atıksularda renk ve organik maddelerin varlığı bir sorundur ve deşarj edilmeden önce giderilmesi gerekmektedir. Boya, tekstil atıksularında arıtımı en zor olan parametredir. Boyalı atıksuyun tipine bağılı olarak, renk çeşitlerinin giderimi için alternatif arıtma yöntemleri uygulanmaktadır [8,11].

Tekstil endüstrisinde boyama işlemi sonucunda oluşan atıksuların karakterizasyonu; boyaların kimyasal yapısındaki farklılıklardan ve boyama prosesinin değışim göstermesinden dolayı oldukça karmaşıktır. Atıksulardan renk giderimi için fiziksel, kimyasal ve biyolojik arıtma sistemleri kullanılabilir. Bu yöntemlerle elde edilen renk giderim veriminin atıksudaki boya türüne bağılı olarak değışiklik göstermesi, atıksulardan renk giderim için en uygun metodun seçimini daha da zorlaştırmaktadır [2,12].

Ticari olarak mevcut olan boyalar asidik, bazik, disperso, azo, diazo, antrakınon temelli ve metal kompleks boyalar olmak üzere birkaç farklı çeşittedirler. Son zamandaki temel çalışmalar, çok sayıda boyanın dekolorizasyonunu gerçekleştirme yeteneğine sahip olan mikroorganizmaların varlığını tespit etmeye yöneliktir. Çevre kirleticisi olan boyar maddelerin parçalanması ile ilgili biyolojik çalışmalarda boya molekülünün yapısına bağılı olarak, uygun mikroorganizma ve uygun ortam koşullarının belirlenmesi gerekmektedir. Laboratuvar koşullarında temel bilim düzeyinde araştırmaların yapılması ve uygun maliyet düzeyinde uygulamaya geçilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada, çevreye zararlı etkileri olan ve tekstil fabrikalarında yaygın olarak kullanılan vinilsülfon yapıya sahip reaktif bir azo boya olan aromatik yapıdaki Remazol Blue BB %133 tekstil boyar maddesini:

- i.* En iyi degrede eden *Streptomyces* sp. suşları ile katı ve sıvı fazda renk giderimi karşılaştırmalı olarak araştırılmış,
- ii.* Renk gideriminin optimal olduğu çevresel koşullar belirlenerek,
- iii.* Renk giderimi ile lignin degradasyonunda rol alan peroksidaz enzimlerinin üretimi arasında bir korelasyonun olup olmadığı incelenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. RENK VE BOYAR MADDELER

Renk ışığa bağlı bir kavram olup, ancak ışığın varlığında fark edilebilirler. Cisimlerin renkli görünebilmeleri için; görünen ışık spektrumu içerisinde, cismin, üzerine düşen ışığın bir kısmını absorbe etmesi ve bir kısmını ise yansıtması gerekir. Cisimler fiziksel ve kimyasal farklılıklarına göre belirli dalga boyundaki ışığı absorbe ederler ve kalanını ise geri yansıtırlar. Cismin görülmesi yansıtılan ışığın dalga boyuna eşdeğer renktedir [4].

Cisimlerin kendilerini renkli hale getirmek için kullanılan maddelere “boyar madde” denir. Boyar maddeler 400-700 nm arasında görünür ışığı absorbe edebilme yetenekleriyle karakterize edilirler ve ışığı absorbe ederek renkli görünürler. Genellikle tekstilde kullanılan boyar maddeler organik olup, anorganik yapıda boyalar da vardır. Fe_2O_3 , Cr_2O_3 , Pb_3O_4 , HgS ve grafit gibi boyalar anorganik kökenli doğal boyalardır [4,13;14]. Endüstri alanında kullanılan boyaların çoğunluğu sentetik olup bu boyalar tekstil sanayide yün, pamuk, ipek, deri vb. maddelerin boyanmasında kullanılır. Tekstil sanayi dışında sentetik boyalar plastik materyaller, sentetik lifler, lastik sanayi, ağaç-selüloz sanayi vb. alanlarda da kullanılmaktadırlar [4].

Maddelerin kimyasal yapısı ile renkliliği arasındaki ilişkinin araştırılması sentetik boyaların keşfi ile başlamıştır. İlk kez 1868 yılında Graebe ve Lieberman, organik bileşiklerin renkli olmasını, bu bileşiklerin doymamış karakterde olmaları ile ilişkilendirmişlerdir. Bu araştırmacılar yaptıkları çalışmalarında, renkli organik bileşiklere hidrojen katıldığında rengin kaybolduğunu, aynı bileşikten hidrojenin çıkarılması ile de rengin tekrar ortaya çıktığını gözlemişlerdir. Bu çalışmaların sonucunda ileri sürülen “rengin moleküldeki doymamışlıktan ileri geldiği” tezi bugün de geçerliliğini korumaktadır [4].


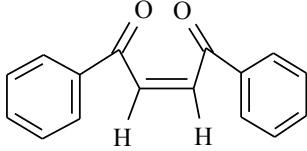
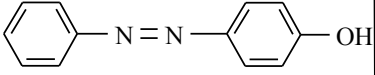
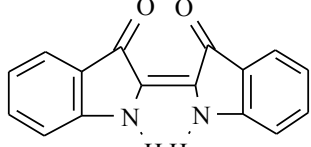
Bir diğer çalışma ise 1896’da Witt tarafından yapılan “kromofor gruplar” teorisi. Bu teoriye göre; bütün hidrokarbonların rensiz oldukları ve bunlara kromofor gruplar bağlanarak renkli göründükleri belirtilmiştir. Kromofor grup bağlanmış hidrokarbonlara “kromojen” adı verilmektedir. Ancak kromojenler boyar

madde özelliği göstermediklerinden “oksokrom” adı verilen ikinci seri grup moleküllerin bileşiğe bağlanması ile kromojenlerin boyar madde özelliği kazandıkları belirtilmiştir. Oksokrom gruplar ise renk oluşumunda kromoforu tamamlamakla kalmayıp, molekülün suda çözünmesini ve life karşı belirli bir affiniteye sahip olmasını sağlamaktadırlar. Ayrıca oksokrom gruplar kromojene bağlanarak renk şiddeti ve renk derinliğini de arttırmaktadırlar [14, 15].

Witt'in bu teorisi, kromofor gruplar ile oksokrom gruplar arasındaki ilişkiyi tam olarak açıklayamamaktadır. Witt'ten sonra bu alanda birçok çalışma yapılmıştır. Bugün de geçerli olan “ara-hal teorisi” ise Arnt tarafından 1931 yılında öne sürülmüştür. Bu teoriye göre; boyar maddeler elektron alan ve veren gruplar içermeleri nedeni ile mesomer sistemlerdir. Kromofor gruplar, genel olarak elektron alan (elektrofil) gruplardır. Oksokrom gruplar ise yapılarındaki ortaklaşmamış elektron çifti içeren gruplar olduklarından, elektron veren gruplardır. Boyar maddeler ise hem kromofor hem de oksokrom gruplar taşıdıklarından dolayı mesomer sistemlerdirler (Şekil 2.1). Yani, elektronları sabit olmayıp sınır formüller arasında ara kademeler üzerinde yer değiştirirler. Böyle bir mekanizma ise polarize olabilen gruplar (çift bağ yapısında) sayesinde mümkündür. Bu nedenle organik bir bileşiğin renkli olması ve boyar madde olarak kullanılması için kromofor ve oksokrom grupların yanında polarize olabilen grupların da olması gerekmektedir (Şekil 2.2) [4,14,15].

Kromofor Gruplar		Oksokrom Gruplar	
$\text{-}\ddot{\text{N}}=\ddot{\text{N}}\text{-}$	Azo	-HN_2	Amino
>C=O	Karbonil	-NHR -NR_2	Substitue amino
$\text{-N}\begin{matrix} \text{O}^- \\ \text{O}^- \end{matrix}$	Nitro	-OH	
>C=C<	Etilen	-SH	Tiyoalkol
>C=NH	Karbamino	-OCH_3	Metoksi
>C=S	Tiyokarbonil	$\text{-SO}_3\text{H}$	Sulfonik asid
-N=O	Nitrozo	$\text{-O-C}_6\text{H}_5$	Fenolik

Şekil 2.1. Kromofor ve oksokrom gruplar [14].

Kromojen	Oksokrom	Boyarmadde
 <p>Azobenzen</p>  <p>Dibenzoil-etilen</p>	<p>- OH</p> <p>H - N -</p>	 <p><i>p</i>-hidroksi-azobenzen</p>  <p>Indigo</p>

Şekil 2.2. Kromojen ve oksokrom boyar maddeler [15].

2.2. TEKSTİL BOYAR MADDELERİNİN SINIFLANDIRILMASI

Tekstil endüstrisinde kullanılan boyar maddeler çözünürlüklerine, kimyasal yapılarına, kullanıldıkları elyaf türüne ve boyama özelliklerine göre dört ana sınıfa ayrılmaktadırlar [14,16].

2.2.1. Çözünürlük özelliklerine göre boyar maddeler

Çözünürlük özelliklerine göre boyar maddeler suda çözünen boyar maddeler ve substratta çözünen boyar maddeler olarak iki grupta taplanmaktadırlar:

i. Suda çözünen boyar maddeler:

- Suda çözünen anyonik boyar maddeler.
- Suda çözünen katyonik boyar maddeler.
- Suda çözünen zwitter iyon karakterli boyar maddeler.

ii. Substratta çözünen boyar maddeler:

- Organik çözücülerde çözünen boyar maddeler.
- Geçici çözünürlüğü olan boyar maddeler.
- Polikondensasyon boyar maddeleri.
- Elyaf içinde oluşturulan boyar maddeler.
- Pigmentler.

2.2.2. Kimyasal yapılarına göre boyar maddeler

- Azo boyar maddeleri.
- Nitro ve nitroza boyar maddeleri.
- Polimetin boyar maddeleri.
- Arilmetin boyar maddeleri.

2.2.3. Uygulandıkları elyaf türüne göre boyar maddeler

Boyar maddelerin, uygulandıkları elyaf türüne göre sınıflandırılmasında ise boyamada kullanılan elyafın selülozik temelli mi, protein temelli mi yoksa sentetik temelli mi olduğu dikkate alınmaktadır:

i. Selülozik esaslı elyaf (pamuklu, keten v.b.) boyamada kullanılan boyalar

- Direkt (substantif) boyar maddeler.
- Azoik (naftol) boyar maddeler.
- Küp boyar maddeler.
- Reaktif boyar maddeler.
- Kükürt boyar maddeler.

ii. Protein esaslı elyaf (deri v.b) boyamada kullanılan boyar maddeler

- Asit boyar maddeler.
- Metal-kompleks boyar maddeler.
- Krom boyar maddeler.
- Reaktif boyar maddeler.

iii. Sentetik esaslı elyaf boyamada kullanılan boyar maddeler: Bu tip boyar maddeler ise sentetik elyafın türüne bağlı olarak:

a. Poliamid elyaflarda:

- Dispers boyar maddeler.
- Asit boyar maddeler.
- Metal-kompleks boyar maddeler.

b. Polyester elyaflarda:

- Dispers boyar maddeler.

c. Poliakrilonitril elyaflarda:

- Katyonik bazik boyar maddeler.

2.2.4. Boyama özelliklerine göre boyar maddeler

- Direkt boyar maddeler (Substantif boyar maddeler)
- Asit boyar maddeler.
- Bazik boyar maddeler.
- Mordan boyar maddeler.
- Küpe boyar maddeler.
- Azoik boyar maddeler.
- Dispersiyon boyar maddeleri.
- Pigment boyar maddeleri.
- Metal-kompleks boyar maddeler.
- Reaktif boyar maddeler.

Tekstil endüstrisi boyamacılığında boyaların kimyasal yapısından ziyade uygulama yöntemleri daha önemlidir. Çünkü boyaların uygulama işlemleri, boyanın kumaşa bağlanma biçimleri, boyaların kalıcılığı, haslık özellikleri ile yakından ilgilidir. Bu nedenle de bu tezde, boyaların gruplandırılması ve özelliklerinin belirlenmesi, boyama özelliklerine göre ele alınmıştır.

2.2.4.1. Direkt boyar maddeler (substantiv boyar maddeler)

Substantivite; elyaf tarafından boyar maddenin absorblanması ve absorblanan bu boyar maddenin elyaftan ayrılmaması için gösterdiği dirençtir. Genellikle sülfonik, bazen de karboksilik asitlerin sodyum tuzlarıdır. Bu tip boyalar ile mordanlama (ön-işlem) olmaksızın direk boyama işlemi yapılabilir. Yani substantiviteyi yüksektir [17-19]. Mordan sözcüğü, boyar maddeyi elyafa tespit eden madde veya bileşim anlamını taşır. Birçok doğal ve sentetik boyar madde direkt boyar maddeler sınıfına girmektedir. Bu boyalar selülozik elyafı doğrudan boyayabilirler. Bu nedenle selüloz menşeli elyaflarda kullanılmakla birlikte ucuz ve uygulanması kolaydır [20].

2.2.4.2. Asit boyar maddeler

Genel formülleri $Bm-SO_3Na^+$ (Bm: boyar madde renkli kısmı) şeklinde yazılabilen asit boyar maddeleri, molekülde bir veya birden fazla sülfonik asit grubu

(-SO₃H) veya karboksilik asit grubu (-COOH) içerirler. Sülfonik asit grubu içeren asit boyar maddeler anyonik boyar maddeler grubuna girerler. Asit boyar maddeler ile yapılan uygulamalar, asit banyolarında yapılmaktadır. Bu nedenle çoğu uygulamalar sonucunda organik asit tuzları oluşur. Bu boyar maddeler yün, ipek, poliamid, katyonik modifiye akrilonitril elyafı ile kâğıt, deri ve besin maddelerinin boyanmasında kullanılır. Asit boyar maddelerle elyaf ilişkisi iyonik bağ şeklindedir [4].

2.2.4.3. Bazik boyar maddeler

Bazik boyar maddeler katyonik yapıda olup, bazik olarak etki ettiklerinden anyonik grup içeren liflere bağlanırlar. Ayrıca renkli bir katyona ve renksiz bir anyona sahiptirler. Pozitif yük taşıyıcısı olarak N ve S atomu içerirler. Bazik boyar maddeler, poliakrilnitrillerin, yün ve pamuk elyafın boyanmasında kullanılır. Boyar madde katyonu, elyafın anyonik grupları ile tuz oluşturur. Elyaf-boyar madde ilişkisi iyoniktir. Selülozik elyafın boyanmasında, tanen, K-antimonil tartarat gibi maddelerle mordanlama (ön-işlem) yapılır. Bazik boyar maddelerin ışığa ve suya karşı haslıkları düşüktür [4,14,15].

2.2.4.4. Mordan boyar maddeler

Mordan söcüğü, boyar maddeyi elyafa tespit eden madde demektir. Yapılan işleme ise mordanlama denir. Mordan olarak, suda çözünmeyen hidroksitler oluşturan Al, Sn, Fe, Cr tuzları kullanılır. Bu boyalar asidik veya bazik fonksiyonel grup içerirler ve bitkisel ve hayvansal elyaf ile kararsız bileşikler oluştururlar. Bu nedenle hem boyar maddeye hem de elyafa karşı aynı kimyasal ilgiyi gösterirler. Mordanlama işleminde, mordan önce elyafa yerleştirilir; daha sonra elyaf ile boyar madde suda çözünmeyen bir bileşik oluşturmak üzere reaksiyona sokulur. Böylelikle boyar maddenin elyafa tutunması sağlanmış olur ve elyaf üzerinde suda çözünmeyen kompleksler oluşur. Günümüzde yalnız krom tuzları yün boyamada önem taşımaktadır [4].

2.2.4.5 Küpe boyar maddeleri

Küpe boyar maddeleri, suda çözünmeyen fakat indirgeme yolu (küpeleme) ile sulu alkali çözeltide çözünebilen leuko şeklinde, renkli bir bileşiğe dönüşebilen karbonil bileşiklerdir. Oksidasyon yolu ile yükseltgenerek yeniden çözünmez hale getirilebilirler. Selüloz ve protein elyafın boyanmasında ve baskısında kullanılır. Bu boyalar yüksek haslıklara (dayanıklılık) sahiptirler ve oldukça pahalıdırlar. Çözölmeleri ve uygulamaları zordur [17,19,21].

2.2.4.6. Azoik (Naftol As) boyar maddeler

Bu boyalar ile ipek, naylon ve poliesterler boyanır. Bir boyar madde karakterinde olmayan diazonyum tuzu ile bir β -naftol türevinin elyaf üzerinde reaksiyona sokulması ile elde edilir. Suda çözünmeyen ve yıkanmaya karşı dayanıklı bir yapısı vardır [22].

2.2.4.7. Dispersiyon boyar maddeleri

Suda az miktarda çözünebilirler. Bu nedenle sudaki dispersiyonları halinde uygulanırlar. Dispersiyon boyar maddeleri boyama işlemi sırasında dispersiyon ortamından hidrofob elyaf üzerine difüzyon yolu ile çekilmektedirler. Boyama ise boyar maddenin elyaf içerisinde çözünmesi şeklindedir. Özellikle poliester elyafın boyanmasında tercih edilir. Ayrıca, selüloz, triasetat poliamid ve akrilik elyafın boyanmasında kullanılır. Fakat, selüloz asetat ve naylon elyaflar için uygun bir boyar madde değildir. Dispers boyaların haslıkları ise oldukça yüksektir [18,20,23].

Dispers boyar maddeler genellikle üç tiptir. Bunlar:

- i.* Azo grubu içerenler: Birçok farklı rengi mevcuttur ve monoazo ya da diazo yapısında olabilirler.
- ii.* Nitrodifenilamin grubu içerenler: Sarı ve turuncular.
- iii.* Antrakininon grubu içerenler: Turuncudan yeşilimsi maviye kadar renkleri mevcuttur.

2.2.4.8. Pigment boyar maddeler

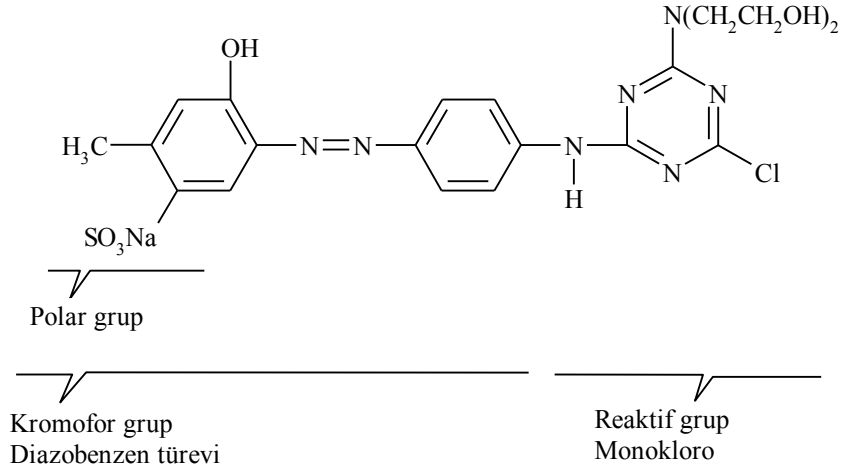
Pigmentlerin elyaf affinitesi yoktur. Kimyasal bağ ve absorpsiyon yapamazlar. Bağlayıcı madde denilen sentetik reçineler ile elyaf yüzeyine bağlanırlar. Pigment boyar maddeler elyafın kimyasal ve histolojik (ince doku) yapısına bakmaksızın basit bir teknikle her cins elyafa uygulanabilirler [17,18]. Pigment boyaların daha çok organik olanları tercih edilir. Bunlar suda çözünmediklerinden, sudaki yağ ve yağdaki su emülsiyonları şeklinde ince dağılmış olarak kullanılırlar.

2.2.4.9. Metal-kompleks boyar maddeleri

Belirli gruplara sahip bazı azo boyar maddeler ile metal iyonlarının kompleks oluşturmaları sonucu meydana gelen boyalardır. Metal katyonu olarak Co, Cr, Cu ve Ni iyonları kullanılır. Krom kompleksleri daha çok yün ve poliamid; bakır kompleksleri ise pamuk ve deri boyacılığında kullanılmaktadır. Işık ve yaş haslıkları yüksektir [4].

2.2.4.10. Reaktif boyar maddeler

Selülozik lifler için kullanılan boyar maddelerin üçte birini reaktif boyar maddeler oluşturmaktadır (Şekil 2.3). Günümüzde kullanılan reaktif boyar maddeler çok geniş bir çeşitlilik gösterirler ve tüm boyama yöntemlerine göre boyayabilmek mümkündür [24]. Reaktif boyar maddelerin en önemli özelliği, uygulandığı tekstil materyaliyle kovalent bağ oluşturmasıdır. Bu nedenle, boyar madde molekülü liflerde bulunan OH, SH ve NH₂ gruplarıyla adisyon ya da substitüsyon reaksiyonu oluşturacak özel gruplar içerirler. Reaktif boyar maddeler, difüzyon sistemine göre çalışan direkt boyaların aksine, selülozla kovalent bağ oluşturarak yıkama haslığı yüksek boyama sağlar. Pamuklu, viskon, rejenere selüloz, lyocell ve tencel'den üretilmiş mamüllerin boyanmasında, günümüzde yeterli haslık sağlayan ve en yaygın kullanılan boyar madde sınıfıdır. Haslıkları, çok yönlü kullanım alanları, parlak canlı renkleri ile pamuklu sektöründe vazgeçilmez bir öneme sahiptirler [25].



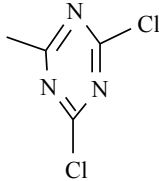
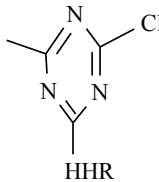
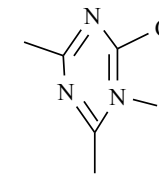
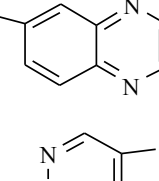
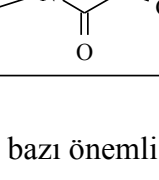
Şekil 2.3. Örnek bir reaktif boya molekülü [26].

Reaktif boyar maddelerin sınıflandırılması ise (i) reaktif grubun kimyasal yapısına, (ii) kromofor gruplarına ve (iii) reaktifliklerine göre yapılmaktadır:

i. Reaktif grubun kimyasal yapısına göre reaktif boyar maddelerin sınıflandırılması (Şekil 2.4):

a. Nükleofilik bimoleküler substitüsyon mekanizmasına göre reaksiyon veren gruplar: Oynak halojen atomu içeren heterohalka sistemlerine sahiptirler. Bu gruba ait önemli reaktif gruplar şunlardır:

- Diklorotriazin
- Monoklorotriazin
- Monoflorotriazin
- Triklorprimidin
- Difloromonoklorprimidin
- Flormetilklorprimidin
- Diklorkinoksazin

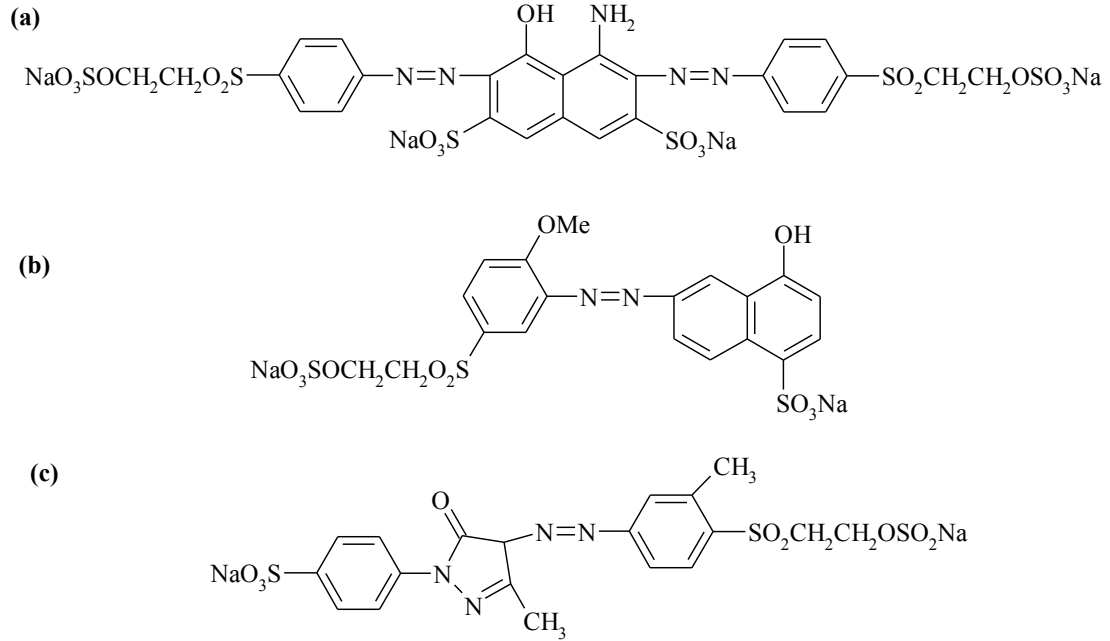
Boya Grupları	Reaktif Grupların Yapısı	Ticari adı
Diklorotriazin		Sinakron
Monoklorotriazin		Subakron
Halojenprimidin		Reakton
Diklorokinoksazin		Levafiks E
Dikloronitridazon		Primazin R

Şekil 2.4. Reaktif boyar maddelerin bazı önemli grupları [4].

b. Nükleofilik adisyon mekanizması ile eter bağı oluşturanlar: Selülozik elyafın boyanmasında kullanılan bu gruba ait olan önemli boyar madde grubu β -sulfatoetilsülfon (vinilsülfon) boyar maddeleridir [27]. Nükleofilik adisyonla reaksiyon veren bu gruplar, önce bazla katalizlenen bir eliminasyon reaksiyonu, daha sonra ise yine bazla katalizlenen bir katılma reaksiyonu verirler. Katılma reaksiyonu tekstil lifinin fonksiyonel grubu ile gerçekleşir. Bu boyar maddeler genellikle vinilsülfon ($-\text{SO}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), sülfatoetilsülfon ($-\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OSO}_3\text{Na}$) (Şekil 2.5) veya kloroetilsülfon ($-\text{SO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Cl}$) gibi gruplardır.

Nükleofilik substitüsyon reaksiyonunda reaktif gruplarla selüloz anyonu arasında ester bağı oluşurken, nükleofilik adisyon reaksiyonunda vinilsülfonla hidroksil arasında eter bağı oluşmaktadır. Adisyon tepkimesiyle selüloza bağlanan

vinilsülfon boyar maddeleri ile oluşan eter bağı asidik hidrolize karşı mükemmel dayanıklılık gösterir [24].



Şekil 2.5. Sülfatoetilsülfon yapıdaki boyaların bazılarının kimyasal oluşumu ortaya çıkarılmıştır. Reaktif vinilsülfon boyasının (a) Reactive Black 5, (b) Reactive Red 22 ve (c) Reactive Yellow 15 ile olan kimyasal yapıları [28].

Sülfatoetilsülfon (-SO₂CH₂CH₂OSO₃Na) gruplarına sahip olan reaktif boyar maddelerden olan Remazol boyalardan Gelb GR, Brillantorange 3R ve Blau 3R'nin kimyasal yapıları ve ışık spektrumunda absorbladıkları dalga boyları ise Şekil 2.6'da verilmektedir.

ii. Kromofor gruplarına göre reaktif boyar maddelerin sınıflandırılması:

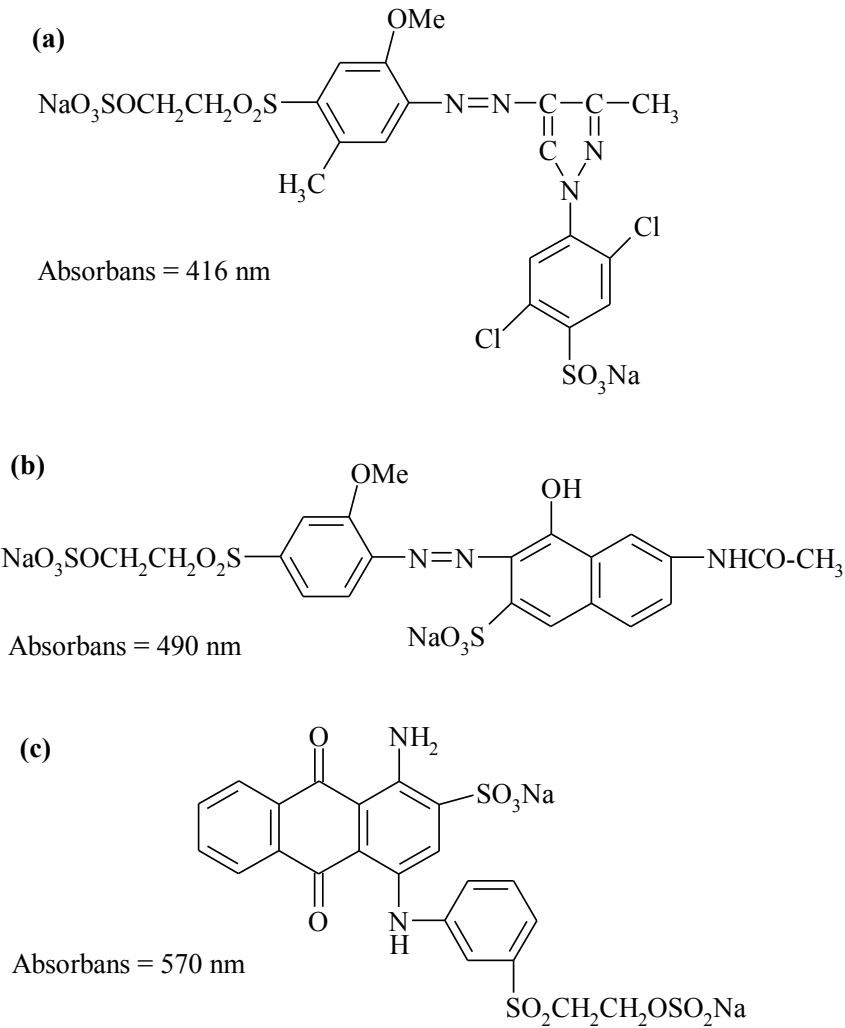
Reaktif boyar maddelerde bulunan kromofor gruplarının çoğu asit boyar maddelerinden türetilmiştir. Çoğunlukla azo, antrakinon ve fitalosiyenin türevleridir:

a. Azo grubuna sahip reaktif boyar maddeler: Kromofor yapılarında azo (-N=N-) grubu bulunduran reaktif boyar maddeler olup, çoğu reaktif boyar madde grupları bu sınıfa dahildir.

b. Antrokinon grubuna sahip reaktif boyar maddeler: Kromofor yapılarında antrokinon grubu bulunduran reaktif boyar maddelerdir.

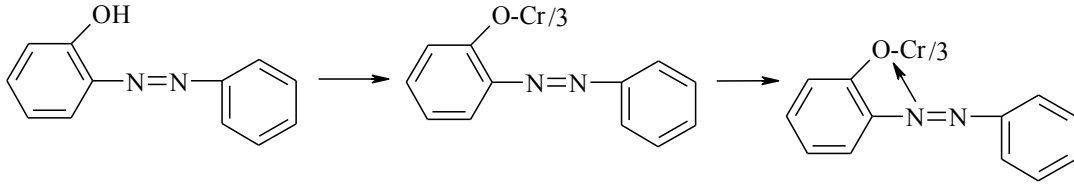
c. Fitalosiyanin grubuna sahip reaktif boyar maddeler: Kromoforlarında fitalosiyanin grubu bulunduran reaktif boyar maddelerdir.

d. Metal-kompleks azo grubuna sahip reaktif boyar maddeler: Kromofor yapılarında metal-kompleks azo grubu bulunduran reaktif boyar maddelerdir. Metal kompleksi azo grubunun ışık enerjisine karşı dayanıklılığını artırmaktadır [27].



Şekil 2.6. Reaktif boyalardan olan bazı remazol boyalarının kimyasal yapıları ve ışık spektrumunda absorbladıkları dalga boyları. (a) Gelb GR, (b) Brillantorange 3R ve (c) Blau 3R. [29].

Boyar madde firmaları içerikleri bakımından krom, kobalt gibi bazı metal iyonlarıyla kompleksleşmeye elverişli olan bileşikleri, 130 °C’de uygun pH’larda metal tuzu çözeltileriyle ısıtıp, metal kompleksi haline getirdikten sonra piyasaya çıkarırlar. Bunlara “premetalize boyar maddeler” denir [30]. Boyar maddenin sadece azo grubuna bağlı benzen halkaları gösterilmek suretiyle mekanizma Şekil 2.7’deki şekilde yazılır.



Şekil 2.7. Azo boyar maddeleriyle Cr(III) metal iyonunun bağlanması [30].

iii. Reaktivliklerine göre reaktif boyar maddelerin sınıflandırılması:

Reaktif boyar maddeleri reaktivliklerine göre soğukta boyayanlar (ılıkta boyayanlar da bu gruba dâhil) ve sıcakta boyayanlar olarak iki gruba ayırmak mümkündür [27]:

a. Soğukta boyayan reaktif boyar maddeler: Diklortriazin, diflormonoklorprimidin, monoflortriazin, diklorkinoksalin ve vinilsülfon boyar maddeleri bu gruba dahildir. Ancak vinilsülfon boyar maddelerini soğuk ve sıcak reaktif gruplar arasında geçiş grubu olarak kabul etmek daha doğru olacaktır.

b. Sıcakta boyayan reaktif boyar maddeler: Monoklortriazin, triklorprimidin ve florklormetilprimidin gibi reaktif boyar maddeler bu grubun önemli üyelerindedir.

Reaktif boyar maddelerde lif ile reaksiyona girme koşulları ve mekanizması, boyar maddedeki grupların reaktivlik derecesine bağlı olarak değişmekle birlikte boyar maddenin hangi boyama yöntemine göre uygulanacağı, kromofor ve reaktif grubuna göre belirlenmektedir. Reaktif grup ayrıca reaksiyon süresi üzerinde de etki sahibidir [31].

Substantivite, elyafla boyarmadde arasındaki reaksiyonun gerçekleşmesi için gerekli bir ön koşuldur. Alkali ilavesinde elyaf üzerine tutunmamış boyar maddeler hidrolize uğrarlar ve boyama özelliklerini kaybederler. Substantivite, büyük ölçüde boyar madde yapısındaki renk verici gruplara (kromofor) bağlıdır [32]. Reaktiflik sıcaklık ve pH ile değişebilmektedir. Vinilsülfon esaslı Remazol boyar maddeleri haricindeki tüm reaktif boyar maddelerin yapısında reaktif grup olarak heterosiklik halkalı bileşikler bulunmaktadır. Elyaf ile boyar madde arasında kurulan kovalent bağ, halkaya bağlı bir substituent grubun elyaftaki fonksiyonel gruplar ile (-OH, -NH₂, -SH) yer değiştirmesi sonucu oluşmaktadır. Reaktif boyama sonrası uygulanan ard yıkama işlemlerinde elyaf üzerine tutunan fikse olmamış boyar maddelerin kolay uzaklaştırılabilmesi substantivite tarafından belirlenir. Substantivite düşük olursa daha kolay uzaklaştırma gerçekleştirilir. Reaktif boyar maddeler genelde düşük substantiviteye sahiptirler [32].

Tekstil ve boyar madde üretim endüstrilerinden alıcı ortama deşarj edilen atıksular önemli derecede sağlık ve çevre kirliliği problemlerine sebep olmaktadır. Bu nedenle renk giderimi son yıllarda önemli bir bilimsel ilgi alanı oluşturmaktadır.

2.3. EKOLOJİ AÇISINDAN TEKSTİL BOYAR MADDELERİNİN NEDEN OLDUKLARI PROBLEMLER

1970'li yıllardan sonra hızlanan sanayi ile birlikte çevre sorunları da ekosisteme ciddi boyutlarda zarar vermeye başlamıştır. Daha sonraki yıllarda ise doğanın korunmasına yönelik çevre hareketleri tekstil endüstrisini de etkilemiştir. Bunun sonucu olarak "tekstil ekolojisi" kavramı ortaya çıkmıştır. Tekstil ekolojisi, tekstil üretiminde ekoloji, insan ekolojisi ve atık ekolojisini kapsamakta olup, elyaf üretiminden başlayarak giysi elde edilinceye kadar olan tüm üretim aşamalarında çevreye ve insanlara zarar verilmemesi amacını kapsamaktadır. Bir tekstil ürününü eko-tekstil (çevre dostu tekstil) olarak tanımlanabilmesi için gereken şartlar üç grupta toplanmaktadır. Bunlar:

i. Üretim ekolojisi: Tekstil endüstrisinde kullanılan hammaddelerin ve kimyasalların çevre dostu bir anlayışla seçilmesi ve üretim aşamasının mümkün olan her safhasında arıtma metotlarının kullanılmasıdır.

ii. Atık ekolojisi: Üretim sonucu ortaya çıkan atıksuların teknolojik olanaklar çerçevesinde çevreye zararsız ürünlere dönüştürülmesini veya atık tekstillerin geri kazanılmasını kapsar [33,34].

iii. İnsan ekolojisi: İnsanların kullandıkları giysilerin solunum, sindirim, ter yoluyla veya hiçbir şekilde insana zarar vermemesini kapsar [34].

Sentetik boyar maddelerin insan sağlığına ve çevreye olumsuz yönde etkisi, doğal boyar maddelere ilginin artmasına sebep olmuştur. Ancak, boyama bitkisinin üretimi için son derece büyük ekim alanlarına ihtiyaç duyulması veya böceklerden doğal boya üretimi için çok fazla böceğin üretilmesi gerekliliği ekolojiye uygun bir durum değildir.

Sentetik boyar madde üretimine bağlı olarak tekstilde son ürün, ağır metal kalıntılarını içermektedir. Bu nedenle, elde edilen sentetik boyar maddelerdeki düşük metal içeriği, metalin ek bir yöntemle uzaklaştırılması zorunlu olduğu için kalite belirtisidir. İyi bir haslık (dayanıklılık) derecesi elde etmek için metal-kompleks boyar madde kullanma zorunluluğu vardır. Metal, kimyasal olarak boyar madde molekülüne bağlıdır ve boyar madde parçalanmadan ayıramamaktır. Bu durum ekoloji için metal kirliliği açısından olumsuz bir durumdur. Sentetik boyar maddeler toksikolojik olarak incelenmektedir. Bunun için kimyasal maddelerin kalıtsal olarak değişen özelliklerini gösteren "Ames Testi" uygulanmaktadır [35]. Bakteri ırkının gen değişikliğine dayanan bu test, bu gün yeni bir boyar maddenin geliştirilmesinin hazırlık döneminde rutin olarak yapılmaktadır.

Doğal boyar maddeler, genellikle metal içermemektedir; ancak genellikle mordan boyar maddeleri olarak kullanılmaktadırlar. Bu işlem esnasında, ağır metal tuzları büyük oranda kullanılmakta olduğundan, boyama sonrası metal iyonlarının uzaklaştırılması sorunu ortaya çıkmakta ve metallerin uzaklaştırılma prosesi ise fazladan bir çevre yükü meydana getirmektedir.

Günümüzde kullanımda olan boyar maddelerin %70'i azo boyar kromofor grup maddeler sınıfına girerler. Azo boyar maddeleri nispeten kolay ve bütün boyar madde nüanslarında ve farklı kullanım amaçları için farklı haslıklarda üretilmektedir. Biyolojik sistemlerde enzimlerin etkisiyle organizmada aromatik

aminlere indirgenebilmektedir. Bazı aromatik aminler ise kanserojeniktir. Yaklaşık olarak piyasada bulunan 3200 adet azo boyar maddesinden 130 tanesinin belirli koşullar altında redüktif parçalanması sonucunda kanserojen arilamin bileşiklerinin oluşturduğu saptanmıştır.

Tekstil endüstrisinde sık sık kullanılan reaktif boyar maddeler de tehlikeli boyar maddelerdendir. Yüksek haslıklara ve parlak renklere sahip olan reaktif boyar maddeler, proteinlerle reaksiyona girebilmekte ve alerjiye neden olmaktadır.

Çevre açısından kullanılan boyar maddenin rengi de önemlidir. Bir mamulü koyu renklere boyamak demek daha fazla boyar madde kullanmak, bunun sonucu olarak da daha fazla kimyasal madde ve su kullanmak demektir [4].

Tekstil fabrikalarında liflerin boyanması esnasında kullanılan boyar maddeler Çizelge 2.1’de gösterilmektedir. Tekstil liflerinin boyanmasında kullanılan bu boyar madde gruplarından bazıları indirgenerek parçalanıp alerjik ve karsinojenik etkilere yol açabilmektedirler [36].

Çizelge 2.1. Tekstil liflerinin boyanmasında kullanılan boyar maddeler.

Lif türü	Kullanılan boyar maddeler
Yün, ipek	Asidik, bazik, reaktif, metal-kompleks
Pamuk, keten, viskon	Direkt, reakti, küpe, kükürt
Poliamid	Dispers, asidik
Poliakrilonitril	Dispers, bazik
Polyester	Dispers

Nikel, kobalt, bakır, çinko ve krom gibi ağır metal iyonları tekstil mamülleri üzerinden ter yoluyla insan vücuduna geçebilmektedir. Ağır metal iyonları tekstil materyaline ise ham tekstil materyalinden, boyar maddelerden ve atım işlemlerinden geçebilmektedir. Bu metallerin insan vücuduna geçmesi ile kromun etkisi sonucu krom ülseri, civanın etkisi ile akut ve kronik zehirlenmeler görülmektedir. Ayrıca; anemi, akciğer hastalıkları, alerji gibi vakalar da metal iyonları ile etkileşim sonucu oluşmaktadır [4].

2.3.1. AB'nin ve Türkiye'nin ekolojik tekstil konusundaki mevzuatı

2.3.1.1. AB mevzuatı

AB, tekstil ürünlerinde ekoloji konusunu ilk kez 1976 yılında yayınlanan 76/69/EEC Konsey Direktifi'nde ele almıştır. Söz konusu direktif ile tekstil ürünlerinde kullanılan bazı ürünlerin zararlı olabileceği belirtilmiştir.

19 Temmuz 2002 tarihli, söz konusu direktifin 19. kez değiştirilmiş şekli olan 2002/61/EC Direktifi ile kanserojen olduğu belirlenmiş 22 adet aromatik arilamine parçalanabilen azo boyar maddelerin tekstil ve deri ürünlerinde kullanımı ve söz konusu boyar maddelerle boyanmış tekstil ve deri ürünlerinin pazarda yer alması yasaklanmıştır. Söz konusu yasaklanmış arilaminlerin bulunabileceği maksimum derişimleri ise 30 ppm olarak belirlenmiştir.

6 Ocak 2003 tarihli 2003/3/EC Direktifi ile 611-070-00-2 indeks nolu blue colourant-mavi boyar maddenin- tekstil ve deri ürünlerini boyamada kullanılması ve pazarda yer alması yasaklanmıştır. 30 Haziran 2004 tarihinden itibaren söz konusu yasaklamanın uygulamaya konacağı belirtilmiştir.

Avrupa Komisyonu 2003/03/EC Direktifi ile 30 Haziran 2004 tarihinden itibaren tekstil ürünlerini boyamada kullanılan krom bazlı azo boyar maddelerin kullanımını ve pazarlamasını yasaklamıştır.

29 Nisan 2004 tarihli Komisyon Tavsiyesi'nde ise asetonitril, akrilamid, akrilonitril, akrilik asit, bütadien, hidrojen florür, hidrojen peroksit, metakrilik asit, metil metakrilat, toluen, triklorobenzen maddelerinin çeşitli üye ülkelerde incelendiği bildirilmiştir.

Metakrilik asitin çevresel olarak, su ekosistemi için gene belirli bir limit değere ihtiyaç olduğu belirtilmektedir. Toluene maddesi için su ve kara ekosistemi açısından limit değerlerin olması gerektiği belirtilmiştir. Ayrıca 2000/60/EC (Su Çevre Direktifi) Direktifi'nin X. Ek'inde yer alan öncelikler listesinin toluene içine alacak şekilde genişletilmesinin göz önüne alınması gerektiği bildirilmektedir. 1,2,4-Triklorobenzen için su ve kara ekosistemler için limit değerler olması gerektiği belirtilmiştir [36].

2.3.1.2. Türkiye'deki mevzuat

İnsan sağlığına zararlı etkilerinin olması sebebiyle, Sağlık Bakanlığı'nın 29.12.1994 tarihli ve 15488 sayılı genelgesi ile bazı arilaminlerin yurt içinde deri, tekstil ve hazır giyim boyahanelerinde boya imalı için kullanılması ve bazı boyar maddelerin yurt içinde deri, tekstil ve hazır giyim ürünlerinde kullanılması 1.3.1995 tarihinden itibaren yasaklanmıştır. Söz konusu olan boyar maddelerin ithali de 1996/16 sayılı ve 31.12.1995 tarihli İthalat Tebliği ile yasaklanmıştır [36].

2.4. BOYAR MADDELERİN RENK GİDERİMİ ALIşMALAR

Tekstil endüstrisi atıksuları çok çeşitli kimyasallardan ve özellikle boyar maddelerden dolayı arıtılması zor olan endüstriyel atıksulardandır. Değişik organik boyar madde, ağır metal, çözünmüş tuzlar, renk, bulanıklık içeren ve değişen pH'larda dış ortama verilen atıksular, birinci derece arıtma ihtiyaı duyar sulardır. Ülkemizde Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliğinde, deşarj standartlarında renkle ilgili parametre olmamasından dolayı, bu atıksuların arıtımında daha çok KOİ (Kimyasal Oksijen İhtiyacı), BOİ (Biyolojik Oksijen İhtiyacı) ve AKM (Askıda Katı Madde) giderimi amaçlanmaktadır. Bununla birlikte ABD ve AB lkelerinde renkle ilgili kesin deşarj sınırlamaları getirildiği için son yıllarda çalışmalar renk giderimi üzerine yoğunlaşmıştır [16,37].

Boyarlar uygulandığı ipliğin tipine göre ve kimyasal yapısına göre farklılıklar gösterir. Bu nedenle literatürde yüzlerce çeşit boyaya rastlanmaktadır. Tekstil fabrikalarında boyama işlemi esnasında birden fazla boyanın ve bazı yardımcı kimyasalların bir arada kullanılması, atıksuyu daha da kompleksleştirmektedir [38]. Günümüzde boyar maddelerin gideriminde fiziksel ve kimyasal işlemler kullanılmakta, ancak bu yöntemlerin çoğu ekonomik olarak ve arıtım sonucu ortaya çıkan aktif çamurun bertaraf edilmesi gerekliliği gibi bazı dezavantajlara sahiptir. Renk giderim çalışmaları ile ilgili bazı yöntemler ise takip eden alt-kısımlarda ele alınmaktadır.

2.4.1. Kimyasal Yöntemler

2.4.1.1. Oksidatif prosesler

Bu işlem, kimyasal maddeler kullanılarak renk gideriminin sağlandığı bir metottur ve kimyasal yöntemler içerisinde en fazla uygulanılandır. Bu işlemde temel oksitleyici ajan olarak hidrojen peroksit (H_2O_2) kullanılmaktadır. Oksidatif proseslerde boya molekülündeki aromatik halka kırılarak atıksudan boya arıtılmış olur [39].

2.4.1.2. Fenton ayırıcı ($H_2O_2/Fe(II)$ tuzları)

Fenton ayırıcı yani $Fe(II)$ tuzları ile inhibe edilmiş hidrojen peroksit toksik atıkların oksidasyonu için iyi bir yöntemdir. Bu işlem ön-oksidasyon ve koagülasyon olmak üzere iki adımda gerçekleşir ve renk giderim hızı ilk basamakta daha yüksektir [40]. Atıksularda bulunan renk bileşikleri bu yöntemle yok edilebilir ve özellikle metal-kompleks türündeki boyalardan kaynaklanan ağır metaller, demir oksitlerle birlikte nötralizasyon basamağında çöktürülebilirler. Fenton ayırıcı yönteminin KOİ, renk ve toksisite giderimi gibi avantajların yanında dezavantajları da mevcuttur. Bunlardan birisi floklama prosesinde ortaya çıkan çamur problemidir [41,42].

2.4.1.3. Ozonlama

Ozonlama aromatik hidrokarbonlar, pestisitler, fenoller ve klorlu hidrokarbonların yıkımında, boyar madde ve KOİ gideriminde kullanılan etkili bir yöntemdir [43]. Boyar maddedeki kromofor gruplar genellikle çift bağlı organik bileşiklerdir ve bunların ozonlama ile kırılmaları sonucu renksiz moleküller oluşur [44]. Boyar madde bulunan atığa uygulanacak ozon dozajı toplam renge ve KOİ oranına bağlıdır. Ozonlama işlemi sonucunda çamur oluşumu gözlenmemektedir [45]. Ozonlamanın dezavantajı ise gaz halde uygulanması ve uygulamada suyun hacminin arttırılamamasıdır. Bunlar dışında yüksek maliyet, yarılanma ömrünün kısa olması (20 dak.), pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonu gibi değişkenlerden kolayca etkilenmesidir [43]. Ozon, radyasyonla ve membran filtrasyon tekniği ile kullanıldığında iyi sonuç vermekte ancak bu uygulama esnasında kullanılan iyon

tutuculardan dolayı ozonlama işleminin renk giderimini üzerine etkisi azalmaktadır [46].

2.4.1.4. Fotokimyasal işlemler

Bu metod ile boyar madde H_2O_2 varlığında UV ile birlikte karbondioksit ve suya parçalanmaktadır [44]. Parçalanma sonucu yüksek derişimde hidroksil radikalleri üretilmektedir. UV-hidrojen peroksit ile renk giderimi, UV ışığının yoğunluğuna, ortamın pH'sına ve boyar maddenin yapısına bağlıdır [47]. Renk giderim işleminin süresi ortamda bulunan metallere, inorganik asitlere, organik aldehitlere ve organik asitlere bağlıdır [48]. Fotokimyasal işlemlerin en önemli avantajı ise arıtım sonucunda çamur oluşmaması ve kötü kokulara neden olan organiklerin azalmasına neden olmasıdır [39].

2.4.1.5. Sodyum Hipoklorit (NaOCl)

Ortamdaki klor derişimine bağlı olarak, renk giderim hızının değişiklik gösterdiği bir yöntemdir. Bu metotta, kullanılan kimyasaldaki klor, boyar maddelerin amino gruplarını etkilemektedir ve boyar maddenin azo grupları kırılmaktadır. Bu metod dispers boyar maddeler için uygun değildir. Metotta klorun kullanılması ve fazla klorun atıksuda kalması, işlemi dezavantajlı duruma sokar. Ayrıca reaksiyon sonucu karsinojenik ve aromatik aminlerin oluşması bir diğer olumsuz yanıdır [47].

2.4.1.6. Elektrokimyasal işlemler

Boyar madde gideriminde kimyasal maddenin oldukça az kullanıldığı, arıtım sonucunda etkili bir boya gideriminin sağlandığı ve çamurun oluşmadığı bir yöntemdir. Ancak bu yöntemin uygulanmasında tehlikeli bileşiklerin oluşumu söz konusudur [39].

2.4.1.7. Kimyasal floklaştırma ve çöktürme yöntemi

Kimyasal maddelerin yardımı ile floklaşma ve çökeltmenin sağlandığı bir yöntemdir. En çok kullanılan kimyasallar arasında, $Al_2(SO_4)_3$, $FeCl_3$, $FeSO_4$ ve kireç sayılabilir. Tünay ve arkadaşları (1996) tarafından yapılan çalışmada asit boya

içeren bir atıksuda kimyasal çöktürme, kimyasal oksidasyon ve adsorpsiyon yöntemleri denenmiş ve yöntemler renk giderim verimlilikleri açısından incelenmiştir. Bu yöntemin kullanılması ekonomik açıdan, floklaştırılan maddelerin ve oluşan çamurun bertaraf edilmesi açısından dezavantaja sahiptir [49].

2.4.2. Fiziksel Arıtım

2.4.2.1. Membran filtrasyonu

Bu metod atıkların arıtımında, konsantre edilmesinde, en önemlisi sürekli şekilde boyar maddeleri atıksudan ayırabilmesi ile karakterizedir [43, 50]. Bu metodun en önemli avantajı, diğer yöntemlerden farklı olarak sıcaklık değişimine, kimyasal çevreye ve mikrobiyal, aktiviteye karşı dirençli olmasıdır [39,51]. En büyük dezavantajı ise oldukça yüksek yatırım maliyetinin olmasıdır. Sistemde atıksuyun membrandan dışarı çıkabilmesi için kimyasal potansiyel, basınç, elektrik gibi zorlayıcı kuvvetler uygulanmaktadır. Ayrıca sistemin atıksudan KOİ gideriminde de etkili olduğu rapor edilmiştir [52, 53].

2.4.2.2. İyon değiştiriciler

Bu yöntemde atıksu, mevcut değişim bölgeleri doygunluğa erişene kadar iyon değiştirici reçineler üzerinden geçer. Böylelikle atıksudaki hem anyonik hem de katyonik boyalar uzaklaştırılabilmektedir. Dispers boyalar için uygun olmayan bu yöntemin maliyetinin oldukça yüksek olmasının yanında, boyar maddelerin çok farklı kimyasal yapıya sahip olması bu metodun kullanımını sınırlar [42].

2.4.2.3 Adsorpsiyon

Adsorpsiyon yönteminin işleyişi, boya/sorbent etkileşimi, adsorbanın yüzey alanı, tanecik büyüklüğü, sıcaklık, pH ve temas süresi gibi birçok fiziko-kimyasal etkiye bağlıdır. Metot oldukça etkili olup, maliyeti de uygundur. Adsorbsiyonla renk gideriminde en fazla kullanılan yöntem aktif karbon yöntemi olup, katyonik, mordant ve asit boyalar için oldukça etkili; dispers, direkt, pigment, vat ve reaktif boyalar için etkisi azdır. Metodun performansı kullanılan karbonun tipine ve atıksuyun karakteristiğine bağlıdır. Ayrıca rejenerasyon ve tekrar kullanım performansta azalmaya neden olur, bu nedenle aktif karbon miktarı arttırılmalıdır.

Bu durum ise maliyeti yükseltir. Adsorban olarak kullanılan diğerk bir malzeme bataklık kömürüdür. Bataklık kömürü boya içeren atıksulardaki polar organik bileşikleri ve geçiş metallerini absorblayabilmektedir. Bu yöntem özellikle bataklık kömürünün bol bulunduğu İrlanda ve İngiltere gibi ülkelerde uygulanabilir. Bunlar dışında, ağaç kırıntıları, uçucu kül+kömür karışımı, silika jeller, doğal killer, mısır koçanı gibi malzemeler de adsorban olarak kullanılabilir [42].

2.4.2.4. Radyasyon

Organik maddelerin radyasyonla parçalanabilmesi için uygun miktarda çözünmüş oksijen gereklidir. Ortama verilen oksijen ise hızla tüketilir ve tekrar verilmesi gerekir. Boyar maddelerin parçalanmasını sağlayan bu yöntem yalnızca laboratuvar koşullarında uygulanabilmektedir [54].

2.4.3. Biyolojik Arıtım

Biyolojik arıtım endüstriyel atıkların giderimi için en önemli yöntemdir. Fiziksel ve kimyasal yöntemlerin yüksek maliyet gerektirmeleri ve her boya için kullanılamıyor olması, uygulamaların sınırlı olmasına neden olmuştur. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, birçok boya türünü atıksudan giderebilme yeteneğine sahip yaygın mikroorganizma türlerinin varlığını tespit etmiş ve biyoteknolojik uygulamaları ön plana çıkarmıştır. Bu uygulamalar, arıtım sonucu az çamur üretilmesi, maliyetinin düşük olması, zararlı yan-ürünlerin oluşmaması gibi nedenlerden ötürü dikkat çekicidir [39].

2.4.3.1. Biyosorbsiyon

Kimyasal maddelerin mikrobiyal kütle tarafından adsorbsiyonu veya kütlede birikimi olarak ifade edilir. Bu yöntem için ölü bakteriler, mayalar ve mantarlar kullanılmaktadır. Tekstil boyalarının çok çeşitliliğe sahip olması, mikroorganizma ile boyanın etkileşimini etkiler. Bu nedenle mikroorganizmanın cinsine göre ve boyaya bağlı olarak farklı bağlanma hızları ve kapasiteleri söz konusu olmaktadır. Boyar madde içeren atıksu çok toksik olduğunda, biyosorpsiyon avantajlı bir yöntemdir [42].

2.4.3.2. Aerobik Yöntem

Endüstriyel atıkların arıtılmasında yaygın olarak kullanılan geleneksel aktif çamur sistemleri için tekstil endüstrisindeki birçok boya bileşiği biyolojik olarak çok zor indirgenebilmekte ya da inert kalmaktadır. Mikroorganizmalar, suda çözünebilen bazik, dispers ve azo boya ları biyolojik olarak indirgeyememekte fakat boyanın bir kısmını adsorbe ederek atıksuyun rengini almakta ve renk giderimi sağlanabilmektedir. Sentetik boyaların aerobik ortamda parçalanmaya karşı dirençli olmalarının nedeni boya malzemelerinin ışık, kimyasal kaynaklı oksidatif etkiler sonucu renklerinin solmayacak şekilde sentezlenmeleridir [55,56]. Atıksudaki azo boyar maddeler gibi reaktif boyaların ortalama %10'unun aerobik biyokütleyle adsorbe olduğunu, geri kalanının ise aktif çamur tesisinden herhangi bir değişime uğramadan geçtiğini belirtmişler ve azo boyar madde içeren tekstil atıksularının renginin giderilmesinde aerobik arıtmanın yetersizliğini vurgulamışlardır. Fakat, son yıllarda bazı boyalarla ilgili çalışmalar, boyaların aerobik olarak da parçalandığını göstermiştir. Odunsu bitkilerde bulunan polimer lignini degrades edebilen bazı bakteriler ve funguslar lignin peroksidaz ya da mangan peroksidaz gibi enzimler kullanarak boya ları degrades edebildiği gösterilmiştir [42,57].

2.4.3.3. Anaerobik yöntem

Boyar maddelerle yapılan çalışmalar özellikle suda çözünebilen azo-reaktif boyalar üzerine yoğunlaşmıştır. Bu boyalar aerobik ortamda parçalanmamaktadır. Anaerobik ortamda bu boyaların parçalanabilmesi mümkündür, ancak bunun için ilave karbon kaynağına ihtiyaç vardır. İlave karbon kaynağı metabolik faaliyet sonucu metan ve karbondioksit dönüşmekte ve elektronlar açığa çıkmaktadır. Bu elektronlar ise elektron taşıma zincirinden son elektron alıcısına yani azo-reaktif boyaya taşınmakta ve boya ile reaksiyona girerek azo bağını indirgemektedir. Bu olay oksijen tarafından inhibe edilmektedir. Bu nedenle, boya arıtımında ilk adım azo bağlarının kırıldığı anaerobik yöntem olmalıdır [42]. Reaktif Black 5 ve Synozol Red boyalarını anaerobik ortamda renksizleştirebilmek için yapılan bir çalışmada, kullanılan boya derişimine ve mikroorganizma kültürüne bağlı olarak %23 ile %78 arasında değişen KOİ giderme verimlerinin elde edilebileceği belirtilmiştir. Rengin tamamen giderilebilmesi azo bağının (N=N) anaerobik ortamda parçalanması ile

mümkün olmuştur. KOİ'nin tamamen giderilememesi ise meydana gelen ara ürünlerin anaerobik ortamda parçalanamamasındandır [10].

Aromatik aminler gibi ara-ürünler sitotoksik, mutajenik ve kanserojenik özellik gösterebilmektedirler. Boya maddesi normalde toksik özellikte olmasa bile anaerob ortamda sonderece toksik aminlerin oluşması mümkündür. Bu nedenle, anaerobik sistemler aerobik arıtmadan önce yer alan bir ön-arıtım yöntemi olarak önerilmektedir. Çünkü aromatik aminler, aromatik bileşiğin halkasının açılması ve hidroksilasyonla (OH grubunun ayrılması) aerobik ortamda mineralize olabilmektedirler. Böylece boyar madde atıksuların anaerobik-aerobik proseslerle arıtılması ile anaerobik basamakta etkili bir renk giderimi, aerobik sistemde ise anaerobik sistemde oluşan parçalanmaya dirençli aminlerin yıkımı sözkonusudur [58].

Yapılan bir çalışmada pamuklu tekstil fabrikasının atıksuyunu temsil eden simüle atıksuyun anaerobik/aerobik ardışık bir biyolojik sistemle verimliliği araştırılmıştır. Bu çalışmada, anaerobik reaktörde 2,8 günlük bir hidrolik bekleme süresi (HBS) ve 1,13 kg/m³ gün'lük organik yükleme hızında %67 KOİ giderilirken, renk tamamen giderilmiştir. Aerobik reaktörde ise 10 günlük HBS ve 0,104 kg/m³ gün'lük organik yükleme hızında %77 KOİ giderim verimi elde edilirken, toplam sistemde %92 KOİ giderimi gözlenmiştir. Toplam aromatik aminler (TAA) anaerobik kademedede birikirken, aerobik kademedede %50'si parçalanabilmiştir. Toplam sistemde ise KOİ ve renk giderimi etkin olarak giderilmiştir [59].

2.5. BOYAR MADDELERİN MİKROBİYOLOJİK OLARAK AYRIŞTIRILMASI

2.5.1. Funguslar, Algler ve Mayalarla Yapılan Çalışmalar

Kâğıt ve kâğıt hamuru atığının 1980'lerin başında *Phanerochaete chrysosporium* ve *Tinctoporia* sp. fungusları ile renk-giderimi, renk-giderimi çalışmalarının temelini oluşturmaktadır [60]. Daha sonraki çalışmalar renk-giderimi mekanizmasının lignin peroksidaz (LiP), mangan peroksidaz (MnP) ve lakkaz enzimleri ile ilişkili olduğunu ispatlamıştır [61]. *Phanerochaete chrysosporium*'un veratril alkol varlığında birçok boyayı ayrıştırdığı (degrede ettiği) gösterilmiştir. Veratril alkolün ligninaz aktivitesini stimüle ettiği bilinmektedir. Renk-giderimi

yeteneğine sahip birçok yeni funguslarla fazla sayıda çalışmalar mevcuttur. Lakkaz, MnP ve LiP enzimlerini üreten yeni mantar türleri izole edilerek renk-giderim verimlilikleri arttırılmaya çalışılmıştır. Bazı funguslar ile yapılan adsorbent çalışmalarında, örneğin *Rhizomucor pusillus* fungusunun adsorben olarak kullanılması ile kâğıdın beyazlatılmasında %48-%50 değerinde sonuçlar elde edilmiştir [62].

Fungusların ölü biyokütelleri ile yapılan adsorbsiyon çalışması ile enzimatik ayrıştırmanın (degredasyon) karşılaştırıldığı bir çalışmada, *Trametes vesicolor* fungusu kullanılmış ve biomasın hem adsorban ile hem de enzimatik ayrıştırma ile boyanın %90'ının elemine olduğu belirtilmiştir [63].

Funalia trogii fungusunun biyokütlesi ile yapılan bir çalışmada ise Astrozon Red boyasını %55'inin absorbe olup, ayrıştırıldığı belirtilmiştir. Bu çalışmada, yüksek biyokütle miktarının iyi bir renk-giderimiyle ilişkili olduğu ve renk-giderimini arttırabileceği rapor edilmiştir [64].

Beyaz çürükçül bir fungus olan *Thelephora* sp. suşu ile Orange G, Congo Red ve Amido Black 10 B boyalarının renk-giderimi amacıyla yapılan bir çalışmada ise bu fungal suşun gerçekleştirdiği renk-giderim oranlarının sırasıyla % 33.3; 97.1 ve 98.8 olduğu belirtilmiştir [65].

Boyar maddelerin biyolojik parçalanması amacıyla aerobik/anaerobik reaktörde *Phanerachyta cryosporium* ve *Coriolus versicolor* fungusları ile yüksek parçalanma verimlilikleri elde edilmekte ancak aerobik sistemde, renk-giderimi adsorbsiyonla gerçekleştiğinden etkili bir yöntem olmamaktadır. Ayrıca, *P. cryosporium* ve *C. versicolor* funguslarının özel besin ihtiyaçları, çevre şartlarına karşı hassas olmaları ve düşük pH değerlerinde (pH = 4,5) renk-giderimi yapmalarından dolayı arıtma tesislerinde uygulanabilirliği oldukça zordur [66,67]. Ancak anaerobik çalışmalarda daha iyi sonuçlar mevcuttur. Azo indirgenmesi elektokimyasal bir reaksiyondur ve azo boyar maddeler mikroorganizmalar tarafından elektron taşıma zincirindeki son elektron alıcı olarak kullanılmaktadırlar. Bu olay sırasında elektron taşıma zincirindeki elektron taşıyıcılar karbon kaynağına bağlı olarak yeniden oluşarak, azo halkalarını indirger ve boyar madde çekirdeğini kırarlar. Bu olayın oksijen

tarafından inhibe edildiği de belirtilmiştir. Türkiye’de tekstil atıksularının arıtımı için işletilmekte olan aktif çamur sistemlerinin önüne kurulacak anaerobik reaktörün, alıcı ortamların kalitesi açısından olumlu etkiler meydana getireceği kanaatine varılmıştır [66,67].

Yapılan başka bir çalışmada, Direct Violet (DV31) ve Remazol Black (RB5) reaktif tekstil boyalarının ortadan kaldırılması ile ilgili biyotik ve abiyotik adsorban çalışmasında 2, 4, 24 ve 48 saatlik inkübasyon deneyleri yapılmıştır. Çalışmanın amacı boyaların ortadan kaldırılması için ucuz ve yenilenebilir kaynakların kullanımınıdır. Biyotik ajanlar olarak *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium commune*, *Aspergillus terreus*, *Eurotium repens*, *Penicillium fregii*, *Penicillium alli* ve bu suşların karışımından oluşan funguslar kullanılmıştır. Abiyotik ajan olarak ise talaş, pirinç samanı, kömür ve şekerpancarı kullanılmıştır. Fungus suşları arasında DV31 boyası için en iyi biyotik adsorbanın 2 saatlik inkübasyon sonucunda *Penicillium commune*, *P. fregii* ve *P. alli* fungusları olduğu tespit edilmiştir. Bunlardan sırasıyla %96, %64 ve %65 oranlarında verim elde edilmiştir. *P. fregii* hariç aynı suşlar RB5 boyasını büyük oranda ortadan kaldırmışlardır. Abiyotik ajanlardan pirinç samanı ile iyi bir adsorban gerçekleştiği belirtilmiştir. Ancak adsorban, boyaların degradasyonu ile karşılaştırıldığında verimli bir arıtım olmamaktadır [68, 69].

Phanerochaete chrysosporium ile ilgili yapılan bir diğer renk-giderim çalışmasında ise azo boyar maddelerinden olan Remazol Blue RR Gran, Remazol Red RR Gran, Remazol Yellow RR Gran’ın belli oranlarda karıştırılmasıyla elde edilen model atıksuda biyolojik parçalanma verimleri araştırılmıştır. Çeşitli konsantrasyonlardaki renk, KOİ, bakır ve aromatik grup giderim verimleri incelenmiştir. Deneysel çalışmaların sonuçlarına göre, renk giderimi başarılı olsa dahi, rengi oluşturan bileşenlerden olan aromatik grubun belli oranlarda atıksu içerisinde bozunmamış halde kaldığı belirlenmiştir. Degradasyon oranları ise şu şekildedir; % 55 Remazol Yellow, % 33 Remazol Red, % 12 Remazol Blue [70].

Tekstil atığı ile kirlenmiş topraktan izole edilen karışık kültüre dayalı anaerobik-aerobik arıtım prosesi Remazol Brilliant Orange 3R. Remazol Black B ve Remazol Brilliant Violet 5R reaktif azo boyalarının degradasyonu için çalışılmıştır.

Paenibacillus ve *Pseudomonas* fungus cinsleri ile çalışılan ardışık anaerobik-aerobik arıtım prosesi rengin büyük bir kısmının anaerobik sistemde gerçekleştiğini kanıtlamıştır. Kimyasal oksijen ihtiyacının (KOİ) büyük bir kısmının ise aerobik sistemde ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir. Sonuçlar azo boyaların anaerobik sistemde aromatik aminlere indirgenmediğini ve aromatik aminlerin bakteri biyoması tarafından üretildiğini göstermektedir. İkinci bir basamak olan aerobik sistemde ise bu aromatik aminler aynı izolatlarla degrade edebildiği gösterilmiştir. Fakat bu boyaların ayrışma oranları farklıdır ve yeterli değildir. Makalede bunun sebebinin boyaların moleküler ya da kimyasal yapılarından kaynaklandığı belirtilmiştir [71].

Boyar maddelerin renklerinin giderilmesinde alglerin kullanıldığı çalışmaların sayısı ise oldukça sınırlıdır. İlk kez 1978 yılında kâğıt hamurunun beyazlatılması gibi çalışmalarla renk-giderim yeteneği rapor edilmiştir [72]. Saf alg kültürleri ile ya da karışık kültürlerle 3 aylık inkübasyon süresinde %50-70 oranında renk-giderimleri gözlenmiştir. Rengin ortadan kaldırılmasında üç mekanizma gözlenmiştir. Bunlar; algal biyokütlesinin büyümesi için kromoforların asimilasyonu; renkli bileşiklerin CO₂ ve H₂O'ya transformasyonu ile renksiz hale gelmesi ve algal biyokütlenin kromoforları adsorbe etmesidir. Algal renk-gideriminin azo redüktazlar ile gerçekleştiği çalışmalar da gösterilmiştir [73]. *Chlorella andoscellotria* alginin aromatik aminleri basit organik yapılara ve CO₂'ye indirgediği gösterilmiş, hatta bazı türlerinde azo boyaları karbon ve azot kaynağı olarak kullandığı da rapor edilmiştir [74].

Wasniewska (1985) tarafından kırmızı oksidatif mayalarla Kristal Violet boyasının biyolojik ayrıştırmasının çalışıldığı makalede, *Rhodotorula* sp. ve *Rhodotorula rubra*'nın Kristal Violet'i parçalayabilme yeteneğinde olduğunu belirtilmiştir. Bir başka çalışmada fermantasyon yeteneğinde sahip *Saccaromyces cerevisiae*'nin Kristal Violet'i parçalayamadığı gözlenmiştir. Bunun nedeninin ise kesinlikle boyar maddenin toksik etkisinden kaynaklanmadığı belirtilmiştir. Nedeni ise, organizmanın hem kontrol hem de test erlenlerinde iyi gelişme göstermiş olmasındandır [75].

2.5.2. Bakterilerle Yapılan Çalışmalar

Çok sayıda bakterinin renk-giderme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir [74]. Azo boyaları ayrıştırabilen bakterilerin izolasyonu ile ilgili çalışmalar önceleri *Bacillus subtilis*, *Aeromonas hydrophilia*, *Bacillus cereus* suşlarının, ardından da *Klepsiella sp.* ve *Streptomyces sp.* suşlarının izolasyonu ile devam etmiştir [76-78]. Karışık bakteri kültürleri ile diazo yapısındaki kromoforların 15 gün içinde parçalandığı belirtilmiştir [79]. Banat ve arkadaşları (1996) [74], anaerobik bakterilerle çeşitli destek materyalleri üzerinde biyofilmler ya da serbest halde büyüyen hücreleri kullanılarak, 24-30 saat içinde boya karışımının renk-gideriminin sağlandığını belirtmişlerdir. Aerobik koşullarda yapılan bir çalışmada ise Malaşit yeşili, Fast yeşili, Brilliant yeşili, Congo kırmızısı ve Metilen mavisi boyalarının pH 6-8, sıcaklığın ise 30-40 °C olduğu koşullarda %30-70 oranlarında renk-giderimine uğradıkları belirtilmiştir. [80]. *Pseudomonas sp.* ve *E. coli* ile yapılan çalışmalarda ise Congo kırmızısı ve Direct Black 38 boyalarının anaerobik, aerobik ve mikroaerofilik ortamda renk-giderim deneylerinde *E. coli* ile yalnızca anaerobik ortamda %98-72 oranlarında verim alınırken, aerofilik ortamda renk-giderimi gözlenmemiş; ancak mikroaerofilik ortamda %39-75 oranlarında renk-giderimi gözlenmiştir. *Pseudomonas sp.* ile mikroaerofilik ortamda %98-100 oranlarında boya ayrıştırması gözlenmiştir [81].

Işık ve Sponza (2003), Türkiye’de tekstil endüstrisinde kullanılan iki azo boya olan Congo kırmızısı (CR) ve Direkt Black 38’in (DB38) parçalanması için *E. coli* ve *Pseudomonas sp.*’in fakültatif suşlarını kullanarak anaerobik ve aerobik şartlarda çalışmışlardır. Mikroorganizmaları 5 gün boyunca 100 mg/L boya ve 1000 mg glikoz-KOİ/L içeren numunede inkübe etmişlerdir. CR ve DB38 boyalarından meydana gelen renklerin, *E-coli* kullanılan anaerobik şartlarda, sırasıyla %98 ve %72; *Pseudomonas sp.* kullanılan anaerobik şartlarda ise sırasıyla %100 ve %83 verimle giderildiğini tespit etmişlerdir. Ancak, aerobik inkübasyon sonucunda renk giderimi olmadığı gösterilmiştir [81].

Chen ve diğerleri (1999), *Proteus mirabilis* kullanarak 100 mg/L boya derişiminde 20 saat içinde (Red RBN) kırmızı azo boyanın %95 civarında indirgendiğini bulmuşlardır [82].

Sani ve Banerjee (1999), gram pozitif bir bakteri olan *Kurthia sp.* kullanarak, Magenta, Crystal Violet ve Malaşit yeşili boyalarında %92-96 arasında renk giderimi elde etmişlerdir. Ayrıca, çalışmada KOİ için yüksek oranlarda giderim verimi (%56-85) gözlenmiştir [83].

Çetin ve Dönmez (2005) yapmış oldukları bir çalışmada, tekstil boya atıksularından izole edilerek melasda büyütülmüş karışık kültürlerle (*Synechococcus* ve *Gloecapsa* cinslerine ait termofilik siyanobakteriler ile *Phormidium*, *Oscillatoria* ve *Lyngbya* cinslerine ait filamentli termofilik fotosentetik siyanobakteriler) kesikli bir anaerobik sistemde tekstil atıksularından yüksek renk giderimi için optimum şartları belirlemişlerdir. Burada bulunan mikrobiyal biyokütle, düşük kapasite ile boya maddelerini parçalamakta ya da hücrelerinde biriktirilerek atıksulardan uzaklaştırmaktadır. Renk giderimi için optimum pH değeri bütün boya numuneleri için 8 olarak tespit edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon süresi temel alınarak yapılan uygulamada, karışık kültürlerin en yüksek renk giderme oranı Reaktif Red RB için %94.9, Reaktif Black B için %91, Remazol Blue için %63.6 olarak bulunmuştur. 12 saat inkübasyon süresi ve 35°C’de Reaktif Red RB için renk giderimi %82-98 civarında elde edilmiştir. Çalışma ile anaerobik şartlar altında karışık kültürlerin atıksulardan reaktif boya gideriminde etkili olarak kullanılabileceği belirtilmiştir [84].

Karışık anaerobik bakteri topluluklarının kesikli denemelerde iki azo tekstil boyasının (mono azo boya ve diazo boya) renk giderimi üzerine etkileri laboratuvar ölçekli metanojenik havasız çamur yataklı reaktörde (HÇYR) araştırılmış ve başlangıç karbon kaynağı olarak asetat kullanıldığında 24 saat HBS’de her iki boya için de %88’den daha yüksek giderim verimi elde edildiği tespit edilmiştir [85]. Kapdan ve Öztekin (2003), fakültatif anaerobik bakterileri (*Alcaligenes faecalis* ve *Commomonas acidovarans*) kesikli beslemeli reaktörde 1-5 mg/L aşırı konsantrasyonuyla kullanarak, Reaktif Orange 16 boyasının rengini oda sıcaklığında (19 °C) ve nötr pH’da %90 verimle gidermişlerdir. 50-300 mL/saat aralığında farklı debilerin, 50-600 mg/L arasında boya konsantrasyonlarının test edildiği çalışmada, 350 mg/L boya konsantrasyonu ve 200 mL/saat besleme debisinde en yüksek verimi

belirlemişlerdir. Fakat KOİ'nin ortadan kaldırılma verimliliğinin düşük olduğu belirtilmiştir [86].

Işık ve Sponza (2004), pilot ölçekli HÇYR'de renk ve KOİ giderimi üzerine tuzluluk konsantrasyonunun etkisini araştırdıkları çalışmada, tuz konsantrasyonunun artmasının metan ve KOİ giderim verimini etkilediğini ancak, renk gideriminde olumsuz bir etki oluşturmadığını belirlemiştir. Çalışmada 20 saat HBS kullanılmış, tuzluluk konsantrasyonu artırıldığında KOİ giderim verimi %80'den %18'e düşerken renk giderimi %100 olarak gözlenmiştir [87].

Panswad ve Luangdilok (2000), tekstil atıksularından 4 farklı boyar maddenin (bisazo vinilsülfonil, anthraquinon vinilsülfonil, anthraquinon monoklorotriazenil ve oksazin) giderimi için anaerobik/aerobik AKR (ardışık kesikli reaktör) sistemini kullanmışlar ve 1000 mg KOİ/L karbon kaynağı ile 20 mg/L boyar madde konsantrasyonunu ilk üç boya için ortalama %64 civarında gidermişlerdir. Oksazin boyasının renginin güvenli bir şekilde tespit edilemediği çalışmada boya gideriminde anaerobik fazın etkili olduğu ifade edilmiştir [88].

Ertuğrul ve arkadaşlarının (2008) termofilik siyanobakteriyel bir suş olan *Phormidium* sp. ile yapmış oldukları çalışmada Remazol Blue ve Reactive Black B ayrıştırma oranları belirlenmiştir. Termofilik koşullar altında yapılan bu deneyde pH 8,5'de, farklı konsantrasyonlarda bulunan boyalar (9,1 mg/L'den 82,1 mg/L'ye kadar), *Phormidium* sp. suşunun sabitlendiği kalsiyum alginat 45 °C'de yüksek derecede dekolorizasyon göstermiştir. Tüm boya konsantrasyonlarındaki verimlilik %50 ile %88 arasındadır. Deneyde kalsiyum alginata sabitlenen *Phormidium* mikroorganizması serbest haldeki *Phormidium*'a göre daha verimli olduğu tespit edilmiştir [89].

Khehra ve arkadaşları (2004) ise yaptıkları bir çalışmada anaerobik-aerobik reaktör kullanılarak, Acid Red 88 (AR-88) azo boyasının ayrıştırılmasını çalışmışlardır. Kullanılan mikroorganizmalar tekstil atığı ile kirlenmiş bölgelerden izole edilmişlerdir. Bu suşların *Stenotrophomonas* sp., *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarına ait oldukları tespit edilmiştir. Bu deneyde AR-88 azo boyasının anaerobik ortamda oluşan aromatik metabolitleri ise aerobik ortamda aromatik

olmayan aminonaftaline transforme edilmiştir. KOİ ve renk ise sırayla %95 ve %98 oranlarında ortadan kaldırılmıştır. Makalede oksijenli arıtımda bakterilerin aktivitelerinin arttırılması ile ilgili daha fazla çalışmaların yapılması gerektiği belirtilmiştir [90].

Tekstil atığı ile kirlenmiş ortamdan alınan suşlardan boyayı en iyi ayrıştıran bakterinin seçilmiş olduğu çalışmada fakültatif olarak büyüeyebilen *Aeromonas hydrophila* bakterisi kullanılmıştır. Bu bakteri en iyi dekolorizasyonu anaerobik ortamda gerçekleştirmiştir. Red RBN boyasının %90'ı pH 5.5-10.0 ve 20-30°C'de dekolorize uğramıştır. Ayrıca bu bakterinin karışık boya içeren besi ortamında ise 2 günde dekolorizasyon gerçekleştirdiği belirtilmiştir. Makalede azot kaynaklarının dekolorizasyonu attırdığı, glikozun ise anaerobik ortamda organik asite dönüşerek pH'ı düşürdüğü belirtilmiştir. Böylece bu durum hücre büyümesini ve dekolorizasyonu arttırdığı belirtilmiştir.

2.5.2.1. Aktinomisetlerle boyar maddelerin ayrıştırılması

Aktinomisetler, çoğunlukla toprakta, kompostlarda ve su çevrelerinde bolca bulunan, lignoselülozik bitki atıklarını, tarımsal ve şehir atıklarını dekompoze eden geniş bir çeşitliliğe sahip mezofilik ve termofilik suşları olan mikroorganizmalardır. Aktinomisetlerin en önemli özellikleri antibiyotik üretme yeteneğine sahip olmalarıdır [91]. Aktinomisetler O, N ve S oksidasyonları ve O- ve N- dealkilasyon reaksiyonları gibi hidroksilasyonları katalizlerler [92]. Bakteriyel sitokrom P₄₅₀'nin bu reaksiyonların çoğunu katalizlediğine inanılmaktadır [93]. Volatilizasyon, kompostlama proseslerinde belirli pestisitlerin uzaklaştırılmasının belirlenmesinde önemli bir metot olarak görülmektedir [94]. Aktinomisetler, özellikle streptomisetler lignin degradasyonunda rol alan ekstraselüler peroksidaz üretirler. Bu prokaryotik peroksidaz, ligninin birincil oksidasyonunu sağlayarak suda çözünen çeşitli polimerik bileşenlerin üretimine katılır. Aktinomisetler ayrıca hidroksilasyon, oksidasyon ve dealkilasyon reaksiyonlarını katalizleme yeteneğine sahiptir [95].

Bir aktinomiset üyesi olan streptomisetler doğada geniş bir yayılma alanına sahiptir. Doğada, özellikle de karasal ortamlarda sayıca bol miktarda bulunurlar. Bu sayı saprofit organizmalar olmaları ile ilişkili olup, ortamdaki organik madde

içeriğine bağlıdır. Bunun yanında streptomisetler, tatlı su ve deniz suyu ortamlarında da dağılışı gösterirler. Araştırmacılar bu doğal ortamlardan sayısız streptomiset izole etmişlerdir [96].

Aktinomisetlerin tekstil boyalarının renklerini giderebilme yetenekleri ilk olarak 1989'da Ball ve arkadaşları tarafından çalışılmıştır. Aktinomisetlerin geniş bir tür aralığını kapsayan 20 suşunu araştırarak, onların Poly-R boyalarını renksizleştirebilme yeteneklerini saptamışlardır [97]. Bu çalışmada kullanılan 20 suştan sadece üçü; *Streptomyces badius* 252, *Streptomyces* sp. EC22 ve *Thermomonospora fusca* MT800 polimerik boyayı tam olarak parçalayabilmiştir. Daha sonraları 1993'te Zhou ve Zimmermann 159 aktinomiset üzerinde çalışmış ve belirli derişimlere sahip farklı boyaları parçalayıp parçalayamadıklarını araştırmışlardır. Bu araştırmacılar yaptıkları tarama çalışmalarında kullanılan aktinomisetlerin azo bileşikli Reactive Red 147'den fitalosiyanın Reactive Blue 116'ya kadar pek çok farklı boyayı çeşitli oranlarda renksizleştirebildiklerini gözlemlemişlerdir. Bu çalışma sonrasında 89 suşta pozitif sonuçlar elde etmişlerdir [98].

Pasti ve arkadaşlarının 1991'de yaptıkları renk-giderim çalışmalarında termofilik *Streptomyces* suşları kullanılmıştır. Kùltürler 37 °C'de 15 gün boyunca çalkalamalı olarak inkübe edilmişlerdir. *Streptomyces* suşlarının delignifikasyon yeteneği ile Remazol Brilliant Blue R (RBBR), Poly B-411 ve Poly R-478 boyalarının bu suşlar tarafından renk-giderim ile ilişkisi çalışılmıştır. Fermantasyon esnasında lignoselüloz ağırlığındaki düşüş ile RBBR ve Poly B-411 boyalarının renk-giderimi arasında güçlü bir korelasyon olduğu belirtilmiş olup, ancak Poly R-478 ile bu korelasyonun daha düşük olduğu belirtilmiştir. Besi ortamına ilave edilen mısır koçanının ise bir suş hariç, diğer suşların renk-giderim yeteneğini arttırdığı gözlenmiştir. Bu üç boyanın ticari olarak elde edilmiş bayır turpu (horseradis) peroksidaz enzimi (HRP) ile oksidasyonu *Streptomyces* suşlarının ürettiği peroksidazla analiz edilmesinin uygun olduğunu göstermiştir. Çalışmanın sonucunda ise RBBR ve Poly B-411 boyalarının *Streptomyces* suşları tarafından üretilen peroksidaz enzimi için uygun substratlar olduğunu göstermişlerdir [99].

Burke ve Crawford (1998) streptomiset türlerinin gerçekleştirdiği boya dekolorizasyonuna katılan peroksidaz sınıfını belirlemek amacıyla *S. viridosporus* T7A'nın ekstraselüler peroksidazını saflaştırmışlardır [100]. *S. viridosporus* T7A peroksidazının ise fungal Mn-peroksidaza benzer substrat spesifitesi gösterdiği, hem-peroksidazın inhibitörü olan KCN ile inhibe olmadığı bulunmuştur [101]. Buna ek olarak, *S. viridosporus* T7A peroksidazının N-terminal aminoasit sekansı fungal Mn-peroksidaz ve aktinomiset kaynaklı selülaz ile eş homoloji göstermektedir. Daha sonra yapılan çalışmalar saflaştırılan peroksidazın biyokimyasal yapısını doğrulamaktadır. Bu peroksidazın katıldığı moleküler mekanizma ayrıca çalışılmış ve oksijen stresini regüle eden proteini kodlayan *oxyR* geninin düzenleyici rolü olduğu bulunmuştur [102].

Aktinomisetlerin polimerik bir boya olan Poly R ile ilgili renk-giderim çalışmasında *Streptomyces viridosporus*, *Streptomyces badius* ve *Thermomonospora mesophila* türleri en iyi suşlar olarak belirlenmişlerdir. Çalışmada maksimum dekolorizasyon oranı 37°C'de, 0-48 saatte gerçekleşmiştir. Çeşitli lignoselülozik substratlı ortamda büyüyen mikroorganizmalardan alınan ekstraselüler fraksiyonların Poly R boyasını dekolorize ettiğini ve bu molekülün kütesinin ise 30 kDa olduğunu ve bu aktinomisetlerden ise en iyi dekolorizasyon yeteneğinin *S. viridosporus* olduğunu belirtmişlerdir [103].

2.5.3. Boyar Maddelerin Renk-Giderimini Gerçekleştiren Enzimler

Birçok araştırmacı boyar maddelerin oksidatif yıkımının bazı indüklenmiş enzimlerle mümkün olabileceğini belirtmişler ve sentetik boyaların renk-gideriminde pratik bir endüstriyel uygulama alanı olabileceğini göstermişlerdir [104-106]. Boyar maddelerin yapılarındaki aromatik ve fenollerin renk-giderimi, lignin peroksidaz, mangan peroksidaz ve lakkaz gibi enzimleri üreten ligninolitik aktiviteye sahip mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilmektedir. Bunların dışında azo redüktaz enziminin de renk-giderimi yeteneğine sahip olduğu belirtilmiştir.

Boyaların mineralizasyonunu gerçekleştiren enzimlerle ilgili olarak yapılan çalışmalar bu prosesin bazı mikroorganizmaların ligninolitik enzimleri ile ilişkili olduğunu kanıtlamıştır. İlk olarak *P. chrysosporium* fungusuna dayalı olarak

başlayan enzim çalışmaları, ilgili enzimlerin odaklama kromatografisi (chromatofocusing) yöntemi ile ayrıştırılması ve saflaştırılması ile renk-giderim mekanizması çalışılmıştır. Optimum pH değerlerinde çeşitli enzimler gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmaya göre ham enzim preparasyonlarının veya saflaştırılmış izoenzimlerin farklı boya yapılarına göre farklı verimliliklere sahip oldukları belirtilmiştir [107]. Bayır turpu peroksidazlarının, azo boyaların çökmesi ve dekompozisyonları için uygun pH'da iyi bir ayrıştırmaya sahip oldukları belirtilmiştir [105]. Biyoteknolojik uygulamalarda ise peroksidaz enzimlerinin, indirgeyici bir elektron vericisinin olduğu durumlarda ise oldukça geniş bir kullanım alanı bulabileceği vurgulanmaktadır. Lignin ayrıştırması ile ilgili olan mangan peroksidazın ve/veya lignin peroksidazın, sentetik boyaların oksidatif proseslerinde kullanılabilirliği ise birçok çalışmada gösterilmiştir. Bitkilerden elde edilen bayır turpu peroksidazı fenol gibi parçalanmaya dirençli bileşikleri ayrıştırabilmektedir. Bhunia ve arkadaşlarının (2002) yaptıkları bir çalışmada HRP'nin Remazol Blue, Cibacron Red gibi boyar maddeleri parçaladığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, HRP aktivitesinin pH \geq 6,0 değerinde düştüğü, fakat pH değerinin azalmasıyla boyanın ayrıştırılmasının arttığı belirlenmiştir. HRP'nin Remazol Blue ve Cibacron Red boyalarını ayrıştırma oranı ise substrat olarak fenolün kullanıldığı deneye göre daha yavaş olduğu belirlenmiştir. HRP aktivitesinin ise boyanın çeşidine, pH değerine ve ortamdaki H₂O₂ oranına bağlı olarak değiştiği gösterilmiştir. Bu durum endüstriyel kullanımda sınırlamalar getirmektedir [105]. Yapılan bir çalışmada *B. adusta* kaynaklı lignin peroksidazın azo boyalara ve fitalokyanin boyalara karşı düşük ayrıştırma sağladığı belirtilmiş olup, ortama veratril alkol eklendiğinde ise ayrıştırma verimliliğinin arttığı belirtilmiştir [108].

Benzer bir araştırmada ise, bir ligninolitik enzim olan lakkaz enziminin RBBR boyasını dekolorize edemediği, ancak ortama mediatör olarak violurik asit ilavesi ile ayrıştırmanın gerçekleştiği belirtilmiştir [109].

Young ve arkadaşları (1997) azo, indigo, antrakinan ve metal-kompleks yapılar içeren boyaların dekolorizasyonunda beyaz çürükçül funguslar kullanmışlar ve oksidasyon prosesinin peroksidaz enzimleri ile gerçekleştiğini göstermişlerdir [110].

İlk ligninolitik peroksidazlar *P. chrysosporium*'dan izole edilmiş ve lignin peroksidaz (LiP) ve mangan peroksidaz (MnP) olarak adlandırılmıştır [111, 112]. Lignin peroksidazlar, veratril alkol gibi fenolik olmayan aromatik aminleri katalizlerler. MnP ise Mn^{+2} 'yi Mn^{+3} 'e oksitler ve Mn^{+3} birçok fenolik bileşiğin oksidasyonunda görev alır [113, 114].

Birçok araştırmacı *P. chrysosporium*'dan elde edilen LiP ve MnP'nin çok çeşitli ksenobiyotik bileşiğin ve boyar maddelerin ayrıştırılmasında rol aldığını gözlemlemiştir. İki azo boyar maddenin LiP tarafından parçalanmasını, reaksiyon karışımındaki veratril alkolün stimüle ettiği saptanmıştır [115].

Diğer taraftan Ollikka ve arkadaşları (1993), *P. chrysosporium*'dan elde edilen LiP izoenzimlerinin değişik yapısal sınıflardaki boyar maddeler için özgüllükler gösterdiğini saptamışlardır. pI 3,85 olan bir izoenzim (izoenzim H6 olarak tanımlanır) diğer LiP izomerlerine göre daha fazla veratril alkole bağımsız aktivite göstererek Metilen mavisi, Metil muruncu, ve Toludin mavisini parçalamaktadır [107].

Mangan-bağımlı peroksidaz aynı zamanda lignin ve bir grup fenolik lignin model bileşiklerinin de hidrojen peroksit aracılığı ile oksidasyonunu ve depolimerizasyonunu katalizlemektedir. MnP, fenolik organo-kirletici substratlara ve azo-boyalara karşı da katalitik aktivite göstermektedir. MnP'nin aktivitesinin şekli, adından da anlaşılacağı üzere, mangan iyonlarının varlığına bağlıdır.

Tanım olarak lakkazlar, her ne kadar gerçek substrat özgüllükleri çoğu kez oldukça geniş ve enzim kaynağına göre değişiklik gösterse de (*p*-difenol:oksijen oksidoredüktaz; EC 1.10.3.2) *p*-difenollerin oksidasyonunu ve aynı zamanda meydana gelen dioksijenin suya indirgenmesini katalizlerler. Lakkazlar çok büyük bir çoğunlukla, 60 ile 80 kDa arasında değişen moleküler ağırlıkları ile bakır içeren ekstraselüler glikoproteinlerdir [116].

Lakkaz, bazı basidiomiset ve askomiset bireylerinde tesbit edilmiştir [116,117]. Çoğu beyaz çürükçül fungus, *P. chrysosporium* hariç olmakla birlikte, ekstraselüler lakkazlar üretirler. Bu enzimin lignin degradasyonuna [118, 119], fenolik bileşiklerin

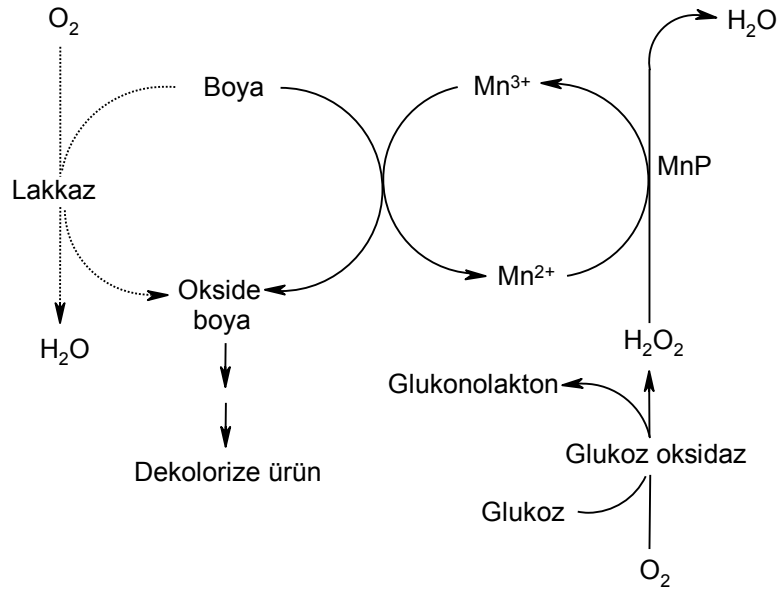
detoksifikasyonuna [120] ve bazı klorofenolik bileşiklerin deklorize edilmesine [121] katkılarına inanılmaktadır.

Bir çalışmada bitkilerden elde edilen ve lignin biyosentezini gerçekleştiren bayır turpu peroksidaz (HRP) enzimi, azo boyaların parçalanabilmesi için bir alternatif olarak gösterilmiştir. HRP, fenol içeren çeşitli aromatik bileşiklerin oluşturdukları serbest radikal bileşiklerini katalizleyebilmektedir. Remazol Blue ile ilgili çalışmada degradasyonun gerçekleşmesi için büyük miktarda H₂O₂ gerekli olduğu tespit edilmiş ve boyada çökme ve degradasyon oranları enzim varlığında oldukça yükselmiş olduğu belirtilmiştir. Boya oranının da endüstriyel uygulamalarda enzim için önemli bir sınırlayıcı etken olduğu gösterilmiştir [122].

Irpex lacteus fungusu tarafından üretilen MnP enzimi ile sentetik boyaların degradasyonu ile ilgili çalışmada, sentetik boyaların ve manganezin MnP üzerine etkisi araştırılmıştır. 2,9 mM Mn(II) içeren besi ortamında çeşitli MnP izoenzimlerinin üretildiği gözlenmiştir. Çeşitli yapıdaki sentetik boyaların eklenmesiyle ise [Reactive azo orange (RO16), Remazol Brilliant Blue (RBBR) ve Bromophenol Blue (BPB)] yüksek miktarda Mn(II) bulunan fungal besi ortamında düşük pH'daki MnP izoenzimlerinin üretimini etkilediği belirlenmiştir. Çalışmada BPB boyasının yeni MnP izoenzimlerinin üretimini indüklediği tespit edilmiş ve bunun sonucunda bu enzimlerin RBBR boyasının daha iyi dekolorize edildiği belirtilmiştir. Besi ortamındaki Mn derişimlerine bağlı olarak boyaların üretilen izoenzimler üzerine etkisi oldukça farklı olmuştur. Bu nedenle degradasyonu etkileyen faktörlerin sadece degradasyon enzimleri değil, aynı zamanda boyaların da olduğu belirtilmiştir [123].

Trametes versicolor ATCC 20869 fungusu ile yapılan bir degradasyonda ise MnP ve lakkaz enzimlerinin üretildiği; ancak lignin peroksidaz, sellobiyoz dehidrogenaz ve mangana bağımlı olmayan peroksidazların yer almadığı bu çalışmada; saflaştırılan MnP ile Amaranth, Reactive Black 5 (RB5) ve Cibacron Brilliant Yellow boyalarının dekolorizasyona uğradığı, Remazol Brilliant Blue R boyasının ise dekolorizasyona uğramadığı belirtilmiştir. Lakkaz enziminin ise RBBR boyasını en iyi degrade ettiği, eklenen bir redoks mediatörünün (2,2-azino-*bis*) ise dekolorizasyon oranını arttırmadığı belirtilmiştir. Amaranth ve RB5 boyaları

orto pozisyonunda hidroksil gruplar içerdiğinden ve azo bağıyla ilişkili *meta* pozisyonunda sülfonat grubu içerdiklerinden, MnP tarafından hızlı bir şekilde parçalanmışlardır. Aktivitedeki MnP/Lakkaz oranlarının ise 10/1 ve 20/1 arasında olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada, Amaranthın MnP tarafından parçalanmasının aynı boyanın lakkaz tarafından parçalanmasına göre 30-kat daha fazla gerçekleştiği belirtilmiş ve bu nedenle de dekolorizasyonda MnP'in daha etkili olduğu vurgulanmıştır (Şekil 2.8) [124].



Şekil 2.8. *Trametes versicolor* ATCC 20869 suşu tarafından Amaranth boyasının dekolorizasyonunun önerilen mekanizması. Sürekli (—) ve kesikli (...) hatlar ise sırasıyla, lakkaz:MnP aktivite oranının 30:1'den az ve çok olduğu reaksiyonları temsil etmektedir. Lakkaz:MnP aktivite oranının 30:1'den az olduğu durumda, Amaranth boyasının dekolorizasyonunu gerçekleştiren esas enzim MnP olmaktadır [124].

Delignifikasyon aktivitesinden sorumlu enzimlerden biri olan lakkaz enzimi ile ilgili bir çalışma da *Trametes hirsuta* fungusunun kırpılmış-kâğıt kültürlerinde ve arpa kepeği ile desteklenmiş katı besiyeri ortamında, lakkaz aktivitesi ve boya dekolorizasyon yeteneği çalışılmıştır. Bu çalışmada, iki farklı yapıdaki İndigo Carmine ve Lissamine Green B boyaalarının kırpılmış-kâğıt besiyeri ortamında daha

verimli bir şekilde parçalandığı belirtilmiş, farklı olarak lakkaz enziminin pH 7'den daha yüksek bir değerde de dekolorizasyon yeteneğine sahip olduğuna dikkat çekilmiştir [125]. Daha önceki çalışmalarda örneğin; Remazol Blue R sentetik boyasının *Plerotus ostreatus* fungusundan elde edilen lakkaz izoenzimleri ile asidik ortamda degrede olabildiği belirtilmiştir [126]. Daha başka bir çalışmada ise Remazol Blue R boyasının pH 4-6'da lakkaz ile verimli bir şekilde dekolorize edildiği, pH \geq 7'de ise hiçbir dekolorizasyon aktivitesinin gerçekleşmediği belirtilmektedir [127].

Boya dekolorizasyonu ve ekstrasellüler enzimlerin üretimine besi ortamındaki bileşenlerin etkisi ile ilgili bir çalışmada ise *Lentinus edodes* fungusu kullanılmıştır. Besi yerinde kullanılan farklı karbon kaynakları (amonyum klorid, pepton ve malt ekstrakt) Lakkaz ve MnP enzimlerinin üretimini arttırmakla kalmayıp, aynı zamanda dekolorizasyonu da etkilediği belirtilmiştir. Örneğin 8 mM N bulunan ortamda, MnP enziminin üretimi, ayrıca bu enzimin Poly R-478 ve Orange II boyaalarının dekolorizasyonunu inhibe ettiği de gösterilmiştir. Ortama eklenen meşe talaşı ve buğday samanı MnP üretimini arttırmış olduğu gözlenmiştir [128].

Streptomyces psammoticus MTCC 7334 suşundan elde edilen, ekstrasellüler bir enzim olan lakkaz ve enzimin üretiminde etkilendiği proseslerin çalışıldığı makalede kahve hamuru ve maya ekstraktı en iyi substratlar olarak belirtilmiştir. Çalışmada pirogallol ve *para*-anisidin bileşenlerinin bakteride lakkaz üretimini arttırdığı ve 10 günlük çalkalamalı inkübasyonda RBBR boyasının %80 oranında parçalandığı belirtilmiştir [129].

3. MATERYAL ve METOD

3.1. MATERYAL

3.1.1. Kimyasallar ve Proteinler

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar, aksi belirtilmediği sürece, Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) ve Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) firmalarından ve mevcut olan en yüksek saflık derecesinde temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan *Streptomyces* Suşları

Çalışmada kullanılan *Streptomyces* sp. suşları, laboratuvarımızda mevcut olan kültürler arasından amaca uygun olarak gerçekleştirilen tarama deneyleri sonucunda seçilmiş olup, bu suşların isimleri ve optimal büyüme sıcaklıkları Çizelge 3.1’de verilmektedir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan *Streptomyces* sp. suşları ve optimal gelişme sıcaklıkları.

Suş adı	Büyüme sıcaklığı (°C)
<i>Streptomyces</i> sp. F0812*	28
<i>Streptomyces</i> sp. F2621*	28
<i>Streptomyces</i> sp. F3118*	28
<i>Streptomyces</i> sp. F6616*	28
<i>Streptomyces</i> sp. Y1401**	28
<i>Actinomyces alboflavus</i> .WNIA194***	28
<i>Streptomyces</i> sp. IAUR8812***	28

* Doç. Dr. Nevzat Şahin (Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Samsun) tarafından bağışlanmıştır.

** Dr. Mustafa Yamaç (Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir) tarafından bağışlanmıştır.

*** Prof. Dr. Wieslaw Kurzatowski (Laboratories of Actinomycetes and Fungi Imperfecti, Warsaw, Poland) tarafından bağışlanmıştır.

3.1.3. Cam Malzemeler

Kullanılan bütün cam malzemeler deterjanla yıkandıktan sonra, önce şehir suyu ile birkaç kez durulanmış ve ardından son bir defa da distile su ile durulanarak kullanıma hazır hale getirilmiştir. Besiyeri içeren erlenler otoklavda 121°C'de 0,124 MPa basınç altında 15 dk süre ile steril edilerek kullanılmıştır. Katı besiyerleri için kullanılan petri kapları ise besiyeri dökülmeden önce Pasteur fırınında 200°C'de 2 saat süre ile steril edilmişlerdir.

3.1.4. İnkübatörler

Streptomyces sp. suşlarının kültürünün yapılması amacıyla kullanılan katı ortamların inkübasyonu ve Remazol Blue reaktif boyasının statik kültürlerle dekolorizasyonu, Nüve marka EN400 model (Nüve Sanayi Malzemeleri İmalat ve Ticaret A.Ş., Ankara, Türkiye) bir inkübatör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan *Streptomyces* sp. suşlarının ekstraselüler enzim üretimleri için kullanılan sıvı kültür ortamlarının inkübasyonunda ise J.P. Selecta marka Rotabit model (J.P. Selecta, Barcelona, Spain) orbital çalkalamalı inkübatör kullanılmıştır.

3.1.5. Santrifüjler

Streptomyces sp. suşlarının kültür sıvısından biyomasın ayrılarak süpernatant sıvısının elde edilmesinde ve enzim asseyleri sırasındaki santrifüjleme işlemlerinde Eppendorf marka 5804 model (Eppendorf, Hamburg, Germany) bir santrifüj kullanılmıştır.

3.1.6. UV/Visible Spektrofotometre

Remazol Blue reaktif boyasının statik *Streptomyces* sp. kültürleriyle inkübasyonu sonucunda gerçekleşen dekolorizasyon oranlarının ölçülmesinde ve enzimatik aktivitelerin belirlenmesi sırasında, dalga boyu taramaları ve absorbans değerlerinin elde edilmesi için Perkin Elmer marka Lambda EZ 210 serisi bir UV/Visible spektrofotometre (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, USA) kullanılmıştır.

3.1.7. Ultrafiltrasyon Sistemi

Ultrafiltrasyon üniteleri olarak 10 ve 200 mL'lik Amicon (Millipore Corporation Bedford, USA) (8010 ve 8200 modelleri) sistemleri kullanılmıştır. Büyük olan hücre (200 mL), rutin olarak fermentasyon sıvısının konsantre edilmesinde kullanılırken; küçük ünite (10 mL) daha çok konsantre edilmiş küçük hacimli örneğe ihtiyaç duyulduğunda kullanılmıştır. Ultrafiltrasyon üniteleri ile birlikte kullanılan 10 kDa moleküler kütle seçiciliğindeki membranları da (Diaflo®) Amicon'dan sağlanmıştır.

3.1.8. Elektroforez Sistemi

Remazol Blue reaktif boyasının dekolorizasyonunu gerçekleştiren *Streptomyces* sp. suşlarının eksrasellüler peroksidazları ile boya dekolorizasyonu arasında bir ilişkinin olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen elektroforetik işlemlerde Atto firması tarafından üretilen AE6220 ve AE6450 modeli (Atto, Japonya) jel tankları kullanılmıştır. Minyatür, dikey tabaka jel ünitesi olan AE6450 sistemi, küçük hacimli protein örneklerinin hızlı elektroforezi için kullanılmıştır. Güç kaynağı olarak ise Consort E312 kullanılmıştır.

3.2. METOD

3.2.1. *Streptomyces* Suşlarının Kültürü ve Muhafazası

Streptomyces sp. suşları, %20 gliserol içerisinde -50°C'de, sporlar ve hif fragmentlerinden oluşan bir süspansiyon halinde muhafaza edilmişlerdir. Suşların belirli aralıklarla, temel karbon ve enerji kaynağı olarak yulaf ksilanı (oat spelt xylan) içeren katı besiyerine [130] Bennet's Agar besiyerine [131] veya ISP4 [132] besiyerine ekimleri yapılmış ve en az 72 saat ve sporulasyon meydana gelinceye kadar 28°C'de inkübe edilmişlerdir.

A. Katı Besiyerleri

i. Yulaf ksilanı içeren katı besiyerinin bileşimi:

Maya ekstraktı	1 g.
Yulaf ksilanı (Sigma)	10 g.
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g.
MgCl ₂ 6H ₂ O	0,2 g.
CaCl ₂	11 mg.
Agar	20 g.
Fosfat tamponu (0,1 M; pH 7,6)	100 mL.
Distile su	900 mL.

Besiyeri otoklavlamadan önce, NaOH ve HCl (1M) kullanılarak pH 7,5'e ayarlanmıştır.

ii. Bennet's agar besiyerinin bileşimi:

Maya ekstraktı	1 g.
Et ekstraktı	0,8 g.
Gliserol	10 g.
Tripton	2 g.
Agar	15 g.
Distile su	1 L.

Besiyeri otoklavlamadan önce, NaOH ve HCl (1M) kullanılarak pH 7,0'ye ayarlanmıştır.

iii. ISP4 (Inorganic salts-starch agar) besiyerinin bileşimi:

K ₂ HPO ₄	1 g.
MgSO ₄ 7H ₂ O	1 g.
NaCl	1 g.
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g.
CaCO ₃	2 g.
İz element solüsyonu	1 mL.
Distile su	1 L.

Nişasta solüsyonu (%2 w/v).....	500 mL.
Agar	20 g.
Distile su	500 mL.

İz element solüsyonu:

FeSO ₄ 7H ₂ O	0,1 g.
MnCl ₂ 4H ₂ O	0,1 g.
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,1 g.
Distile su	100 mL.

Besiyeri otoklavlamadan önce, NaOH ve HCl (1M) kullanılarak pH 7,0'ye ayarlanmıştır.

B. Sıvı Besiyeri (MS-YEM)

Streptomyces sp. suşlarının sıvı besiyerlerinde üretimi ve Remazol Blue reaktif boyasının dekolorizasyonunu sırasında erlenler kullanılmıştır. 250 mL hacme sahip erlenler için 50 mL, 100 mL hacimli erlenler için ise 20 mL besiyeri kullanılmıştır. Her deney grubu için tek tip erlen kullanılmıştır. 10 günlük inkübasyonlar sırasında 250 mL'lik erlenler kullanılırken, 48-72 saatlik inkübasyonlar için 100 mL'lik erlenler tercih edilmiştir. Sıvı kültürler için kullanılan besiyerinin bileşimi:

Remazol Blue	150 mg.
Maya ekstraktı	6 g.
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 g.
NaCl	0,3 g.
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,1 g.
CaCO ₃	0,02 g.
İz element solüsyonu	1 mL.
Distile su	1 L.

Karbon ve enerji kaynağı olarak Remazol Blue reaktif boyasına ilaveten, ilave karbon ve enerji kaynağının dekolorizasyon üzerine olan etkisini belirlemek amacıyla kültür ortamına yulaf ksilanı [%0,4 (w/v)] veya öğütölmüş buğday samanı [%0,6 (w/v)] ilave edilmiştir.

İz element solüsyonu:

FeSO ₄ 7H ₂ O	1 g.
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,9 g.
MnSO ₄ 7H ₂ O	0,2 g.
Distile su	1 L.

Besiyeri otoklavlamadan önce, NaOH ve HCl (1M) kullanılarak pH 8,0'e ayarlanmıştır.

3.2.2. Buğday Samanının Hazırlanması

Buğday samanı, blender ile iyice parçalanarak toz haline getirildikten sonra 500 µm por çapına sahip laboratuvar eleğinden geçirilerek (Alfa Laboratuvar Malzemeleri, Ankara, Türkiye) mümkün olduğunca küçük partikül yapısına sahip olan saman partikülleri kullanılmıştır.

3.2.3. İnokulum Hazırlanışı

Spor meydana getiren *Streptomyces* sp. suşlarının spor ve/veya hif fragmentlerinin 10 mL steril fizyolojik tuzlu su (%0,9 NaCl) içerisinde, aseptik koşullar altında solüsyonları hazırlanmış ve bu solüsyon inokulum olarak kullanılmıştır. Hazırlanan bu inokulum solüsyonu her bir erlene, erlendeki besiyeri hacminin %2'sine denk gelen hacim kadar ilave edilmiştir. İnokulum sıvısından katı besiyerlerine de ekimler yapılarak, inokulumdaki k.o.b. hesaplanmıştır. Buna göre, kullanılan inokulumlar ortalama olarak $1,5 \times 10^5$ k.o.b./mL olarak hesaplanmıştır.

3.2.4. Remazol Blue Dekolorizasyonunun Büyüme Kinetiği İle Olan İlişkisi

Bu çalışmada kullanılan *Streptomyces* sp. F0812, *Streptomyces* sp. Y1401 ve *Streptomyces* sp. IAUR-8812 suşları tarafından sıvı besiyerinde bulunan Remazol Blue reaktif boyasının dekolorizasyonunun büyüme kinetiğine bağlı olarak nasıl değişim gösterdiğini belirlemek için, organizmalar karbon ve enerji kaynağı olarak yalnızca Remazol Blue reaktif boyası içeren MS-YEM sıvı besiyerinde; ya da Remazol Blue boyasının yanı sıra ilave karbon ve enerji kaynağı olarak yulaf ksilani (%0,4, w/v) veya buğday samanı (%0,6, w/v) ile desteklenen MS-YEM sıvı

besiyerinde, 30 °C’da, 10 gün boyunca, statik olarak inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresince, 24 saat aralıklarla sıvı kültürlerden alınan örnekler Remazol Blue dekolorizasyon oranının belirlenmesinde kullanılarak, organizmaların büyüme kinetiği boyunca dekolorizasyon verimlilikleri belirlenmiştir. Kontrol olarak ise tüm besiyeri bileşenlerini içeren, fakat mikrobiyal suşlarla inoküle edilmemiş olan kültürler kullanılmıştır. Tüm çalışmalar üçer tekrarlı olarak yapılmış ve tekrarlamalı sonuçların aritmetik ortalamaları alınmıştır.

3.2.5. Remazol Blue Dekolorizasyon Oranının Belirlenmesi

Remazol Blue reaktif boyası içeren veya ilave karbon ve enerji kaynağı olarak Remazol Blue boyasına ilaveten yulaf ksilani veya buğday samanı içeren kültür ortamlarından 24 saat aralıklarla 1’er mL kültür sıvısı alınmıştır. Biyomas içeren bu kültür sıvıları 12 000 g’de 10 dk. süreyle santrifüjlenerek katı partiküllerden ve hücre kalıntılarında arındırılmıştır. Elde edilen kültür sıvılarındaki Remazol Blue reaktif boyasının dekolorizasyon oranını belirlemek amacıyla, kültür sıvılarının 615 nm’deki absorbans değerleri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Remazol Blue reaktif boyası içermeyen kültür sıvılarındaki peroksidaz aktivitelerinin ve ekstrasellüler protein miktarlarının ölçülmesinde kullanılan kültür sıvıları da aynı yolla elde edilmiş ve ham enzim preparasyonları olarak kullanılmıştır.

3.2.6. Farklı Karbon Kaynaklarının Ekstrasellüler Peroksidaz Üretimi Üzerine Olan Etkisi

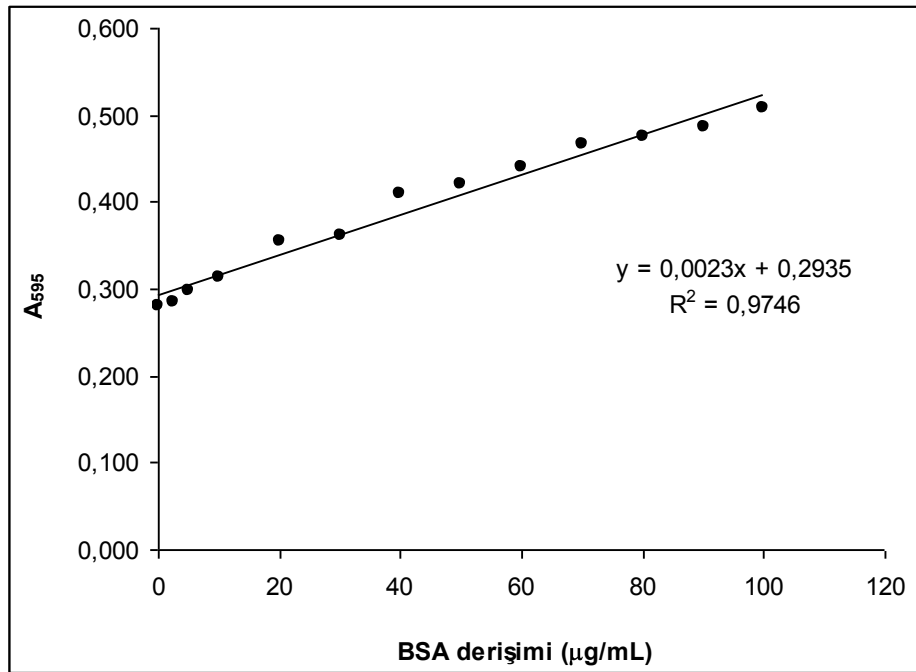
Bu çalışmada kullanılan *Streptomyces* sp. F0812, *Streptomyces* sp. Y1401 ve *Streptomyces* sp. IAUR-8812 suşları tarafından üretilen ekstrasellüler peroksidaz enziminin üretimi üzerine farklı karbon ve enerji kaynaklarının etkilerini belirlemek ve Remazol Blue reaktif boyasının dekolorizasyonu ile peroksidaz üretimi arasında bir ilişkinin olup olmadığını belirleyebilmek amacıyla organizmalar, % 0,4 (w/v) yulaf ksilani veya % 0,6 (w/v) öğütülmüş buğday samanı içeren sıvı MS-YEM besiyerlerinde 30 °C’de, 10 gün, 150 rpm’de inkübe edilmişlerdir. Bu çalışmalar ile organizmaların ekstrasellüler peroksidaz aktivitelerinin maksimuma ulaştığı inkübasyon süresinin belirlenmesi ve Remazol Blue reaktif boyasının dekolorizasyonu ile paralellik gösterip göstermediğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

İnkübasyon süresi boyunca 24 saat aralıklarla sıvı kültürlerden alınan örnekler ham enzim preparasyonları olarak kullanılarak peroksidaz aktiviteleri standart assey metodları ile tespit edilmiştir. Ayrıca, süpernatantaki protein derişimleri de belirlenerek her bir enzimin spesifik aktivitesinin hesaplanmasında kullanılmıştır. Tüm çalışmalar üçer tekrarlı olarak yapılmış ve tekrarlamalı sonuçların aritmetik ortalamaları alınmıştır.

3.2.7. Ekstraselüler Protein Miktarlarının Tayini

Sıvı kültürlerden elde edilen süpernatant sıvılarının protein derişimlerinin belirlenmesi, Bradford protein assey [133] yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sırasında 100 µL süpernatant sıvısı alınarak 1 mL Bradford solüsyonu ile vorteks yardımı ile karıştırılmış ve 10 dk sonra spektrofotometre ile A_{595} değeri kaydedilmiştir.

Protein derişimlerinin tayini sırasında kullanılan protein standart eğrisi (bkz. Şekil 3.1) ise bovin serum albuminin (BSA) 0-1000 µg mL⁻¹ arasında değişen farklı derişimleri ile elde edilmiştir.



Şekil 3.1. Protein standardı olarak kullanılan BSA'nın değişik derişimlerinin Bradford metodu ile analizi sonucu elde edilen standart eğri.

3.2.8. Peroksidaz Aktivitesinin Tayini

Peroksidaz aktivitesi, substrat olarak 2,4-DCP [134] kullanılarak ölçülmüştür. Toplam hacim 1 mL olacak şekilde, reaksiyon karışımı 200 µL, 16 mM 4-aminoantiprin (4-AAP); 200 µL, 25 mM 2,4-diklorofenol (2,4-DCP); 200 µL sodyum fosfat tamponu (100 mM, pH 7,2); 200 µL ham kültür süpernatantı içermektedir. Reaksiyon, 200 µL, 50 mM H₂O₂'in eklenmesiyle başlatılmaktadır. Hidrojen peroksidin eklenmesinin hemen ardından kontrollerle birlikte örnekler, su banyosu içerisinde 30 °C'da 1 dk inkübe edilmiştir. 4-AAP'nin oksidasyonu sonucu meydana gelen quinoneimine nedeni ile absorbansta meydana gelen artış, 510 nm'de spektrofotometre ile ölçülmüştür. Kontrol grubu reaksiyonlarda ise yukarıda belirtilen bileşenlerin hepsi bulunmasına rağmen, reaksiyonun başlatılması için kullanılan H₂O₂ yerine sodyum fosfat tamponu (200 µL) kullanılmıştır. Bir dakikalık inkübasyon sonrasında kontrollerin verdiği optik yoğunluk değerleri ise enzim preparatlarının verdiği optik yoğunluk değerlerinden çıkarılarak, enzim aktivitesi hesaplanmıştır.

Bir ünite (U) peroksidaz aktivitesi ise 1 dakika sonunda, enzim preparatının absorbanısında 1 birim artış meydana getirmek için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.2.9. *Streptomyces* sp. Enzimlerinin Elektroforetik Analizi

Streptomyces sp. F0812, *Streptomyces* sp. Y1401 ve *Streptomyces* sp. IAUR-8812 suşları tarafından üretilen ekstrasellüler peroksidaz enzimlerinin analizinde doğal (zymogram) kesikli poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) kullanılmıştır. Proteinlerin elektroforetik olarak seperasyonunda ve analizinde kullanılan jeller ise %10 akrilamid içerecek şekilde Laemmli [135] metodu temel alınarak hazırlanmıştır (Çizelge 3.2). Elektroforez ise 80 V'da, çift kuvvetli elektroforez tamponu (pH 8,8) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Çift kuvvetli elektroforez tamponunun içeriği ise %0,303 (w/v) Tris ve %1,44 (w/v) glisinden oluşmaktadır. PAGE için kullanılacak örnekler ise jelle yüklenmeden önce örnek yükleme tamponu (pH 6,8) içerisinde hazırlanmıştır. Örnek yükleme tamponunun içeriği ise 0,125 M Tris, %10 gliserol, ve %0,01 Bromophenol blue (w/v)'dan oluşmaktadır [136]. Jellere yüklenen

örneklerin elektroforezi Atto model AE-6450 düşey jel elektroforez tanklarında gerçekleştirilmiştir. Elektroforez prosesine ise işaret boyası olarak kullanılan Bromophenol blue'nun jelin altından çıkmasının hemen ardından son verilmiştir.

Protein örnekleri jelde yürütüldükten sonra jel tankından uzaklaştırılan jeller, L-DOPA ve Remazol Blue ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemi ise jellerin üzerine:

i. L-DOPA asseyi: 100 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7) içerisinde 50 mM H₂O₂, 50 mM L-DOPA (L-3,4-dihidroksfenilalanine) içeren solüsyonun jel üzerine dökülmesi ve 30 °C'lik su banyosunda, L-DOPA'dan dopakrom pigment formasyonu oluşuncaya kadar inkübe edilmiştir.

ii. Remazol Blue asseyi: 100 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7) içerisinde 50 mM H₂O₂ ve 200 µg/mL Remazol Blue içeren solüsyon, jel üzerine dökülüş ve 30 °C'lik su banyosunda inkübe edilmiştir. Alternatif bir metot olarak, 100 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7) içerisinde %1 (w/v) agarozü, 50 mM H₂O₂ ve 200 µg/mL Remazol Blue içeren agaroz jeli, Biely ve arkadaşları (1985) [137] tarafından tanımlanan jel-sandviçi (replika jel) tekniğine uygun olarak proteinlerin elektroforetik olarak ayrıştırılmış olduğu jel ile sandviç oluşturularak 30 °C'lik inkübatörde inkübe edilmiştir.

Jellerin L-DOPA veya Remazol Blue ile inkübasyonu sırasında gelişen bantlar ise fotoğraflanarak kaydedilmiştir.

Çizelge 3.2. PAGE'lerin hazırlanması için kullanılan tampon sistemleri. [135]'den adapte edilmiştir.

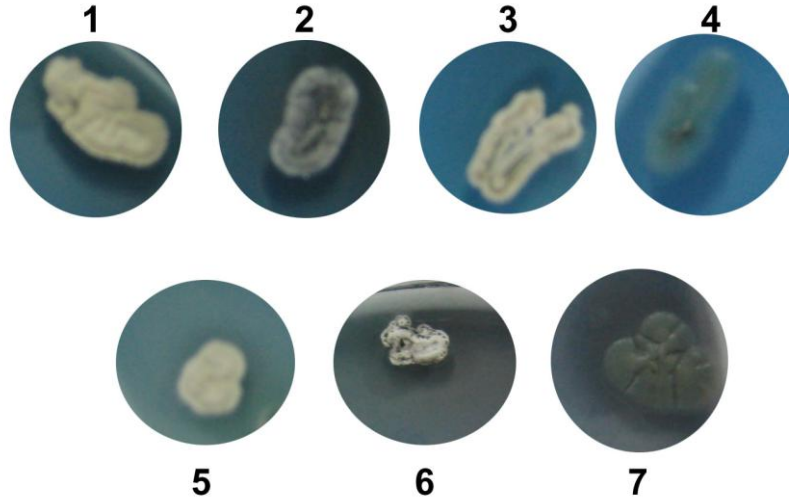
Stok solüsyonu	Yükleme jeli*	Ayırma jelindeki akrilamid oranı (%w/v)					
		5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	17.5
Akrilamid-bisakrilamid	1.22	1.66	2.50	3.33	4.16	5.00	5.83
Yükleme jeli stok tamponu	2.56	-	-	-	-	-	-
Ayırma jeli stok tamponu	-	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50
Su	6.22	5.83	5.00	4.16	3.33	2.50	1.66
Amonyum persülfat (%10, w/v)	0.12	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
TEMED	0.03	0.01	0.01	0.005	0.005	0.005	0.005

*Ölçüler mL olarak verilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Remazol Blue Renk Giderimini Gerçekleştiren *Streptomyces* Suşlarının Seçimi

Yapılan çalışmada öncelikle 24 adet Actinobacteria üyesi olan *Streptomyces* sp. ve *Actinomyces alboflavus* suşlarının 16 farklı tekstil boyasını içeren katı besi yeri üzerindeki büyüme, absorpsiyon ve renk giderim yetenekleri incelenmiştir (Çizelge 4.1). Actinobacteria üyesi olan 24 suştan, denemede kullanılan 16 farklı tekstil boyasını içeren besiyerinde sadece birkaçının büyüemedikleri, çoğunluğunun ise büyüme ve absorpsiyon gösterdikleri görülmüştür. Kullanılan tekstil boya renk giderimleri ise farklı boyalar ve farklı suşlar tarafından gerçekleştirilmiştir. Katı besiyerleri üzerindeki büyüme, absorpsiyon ve renk giderim aktivitelerine bağlı olarak seçilen suşlar (Şekil 4.1), aynı tekstil boya renk giderimini içeren sıvı kültürlerle alınmış ve buradaki renk giderim aktiviteleri belirlenmiştir.



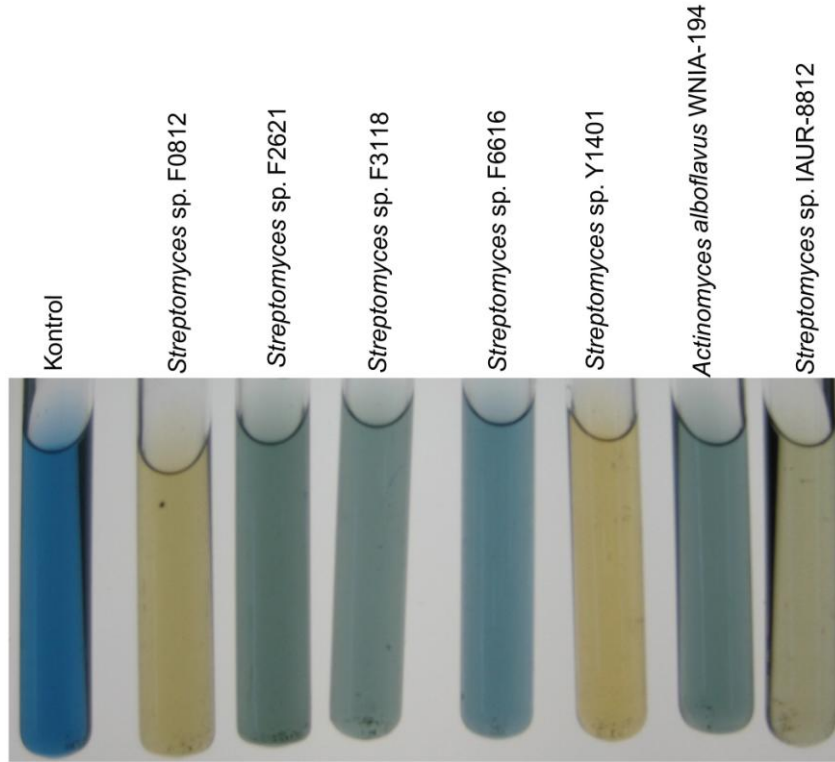
Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan *Streptomyces* sp. ve *Actinomyces alboflavus* suşlarının Remazol Blue içeren katı besiyerindeki büyümeleri ve koloni görüntüleri. Suş adları: **1**, *Streptomyces* sp. F0812; **2**, *Streptomyces* sp. F2621; **3**, *Streptomyces* sp. F3118; **4**, *Streptomyces* sp. F6616; **5**, *Streptomyces* sp. Y1401; **6**, *Actinomyces alboflavus* WNIA194 ve **7**, *Streptomyces* sp. IAUR8812.

Çizelge 4.1. Çeşitli tekstil boyalarını içeren katı besiyerlerindeki *Streptomyces* sp. suşlarının bu ortamlardaki büyüme, absorpsiyon ve renk giderim sonuçları.

Mikroorganizma	<i>Streptomyces</i> sp. A05	<i>Streptomyces</i> sp. F0812	<i>Streptomyces</i> sp. F2621	<i>Streptomyces</i> sp. F3118	<i>Streptomyces</i> sp. F3120	<i>Streptomyces</i> sp. F4880	<i>Streptomyces</i> sp. F6318	<i>Streptomyces</i> sp. F6616	<i>Streptomyces</i> sp. M1247	<i>Streptomyces</i> sp. M1345	<i>Streptomyces</i> sp. M1351	<i>Streptomyces</i> sp. M1444	<i>Streptomyces</i> sp. M1470	<i>Streptomyces</i> sp. M1491	<i>Streptomyces</i> sp. Y1302	<i>Streptomyces</i> sp. Y1401	<i>Streptomyces</i> sp. Y1614	<i>Streptomyces</i> sp. Y1823	<i>Streptomyces</i> sp. Y1923	<i>Streptomyces</i> sp. Y1931	<i>A. alboflavus</i> WNIA194	<i>Streptomyces</i> sp. IUR4886	<i>Streptomyces</i> sp. IAUR8812	<i>Streptomyces</i> sp. IAUR8997
Boya																								
Procion Dark Mavisi	+	+	+a	+	+a	+a	+	+a	+a	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+a	+a	+a	+a	+a
Bromfenol Mavisi	+	+	+a	+a	+a	+a	+	+a	+a	+a	+a	+a	+a	+a	+	+	+	+a	+a	+a	+	+	+	+
Poly R-478	+	+	+a	+	+a	+a	+	+a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+a	+	+a	+	+	+a	+
Metilen Mavisi	a	+d	-	+a	+a	+a	+a	a	-	-	-	-	-	-	+ad	+d	+d	-	+d	-	+a	+	+	+a
DRI Black	+a	+	+a	+	+a	+a	+	+a	+a	+a	+a	+a	+a	+a	+	+	+	+a	+	a	+a	+	+a	+
Remazol BB	+	+	+a	+	+a	+a	+	+a	+a	+	+	+a	+a	+a	+	+	+a	+a	+	+a	+	+	+	+a
Sumifix Supra Mavisi	+a	+	+a	+	+a	+a	+	+a	+a	+a	+	+a	+a	+	+	+	+	+a	+	+a	+a	+	+a	+
Dispersol Flavine	+	+ad	+a	+ad	+a	+a	+	+a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	a	+	+a	+a	+
Sumifix Supra ROT	+	+	+a	+a	+a	+a	+	+a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+a	+	+a	+a	+	+	+a
Procion	+	+	+a	+a	+a	+a	+	+a	+	+	+	+	+	+	+	+	+a	+a	+a	+a	+	+a	+	+
Levofix	+	+	+a	+a	+a	+a	+aa	+a	+a	+	+a	+	+	+a	+	+	+	+a	+a	+a	+	+a	+	+
Remazol Mavisi	+	+d	+ad	+a	+a	+	+	+ad	+	+	+	+	+a	+	+	+d	+	+a	+	+a	+d	+	+d	+
Drimaren Blau	+	+	+a	+	+a	+a	+	+a	+a	+	+	+	+	+a	-	+	+a	+	+	+a	+	+a	+	+a
Foron Marine	+	+	+a	+a	+a	+a	+	+a	+	+	+ad	+ad	+ad	+d	+d	+ad	+d	-	+d	+ad	+a	+	+a	+
Foron	+	+	+a	+a	+a	+	+	+a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+a	+	+a	+	+a	+a	+
Remazol Gold	+a	+	+a	+a	+a	+a	+	+a	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+a	+a	+a	+	+

+ Büyüme iyi; -, büyüme yok; a, absorpsiyon pozitif; d, renk giderimi pozitif.

Yapılan sıvı kültür çalışmalarında ise diğer tekstil boyalarına nazaran Remazol Blue reaktif azo boyasının renk giderimini yüksek oranda gerçekleştiren Actinobacteria suşları arasından *Streptomyces* sp. F0812, *Streptomyces* sp. F2621, *Streptomyces* sp. F3118, *Streptomyces* sp. F6616, *Streptomyces* sp. Y1401, *Streptomyces* sp. IAUR8812 ve *Actinomyces alboflavus* WNIA194 suşları çalışmada kullanılmak üzere seçilmişlerdir (Şekil 4.2). Çalışmada kullanılmak üzere seçilen 7 Actinobacteria suşunun Remazol Blue içeren sıvı kültürlerindeki renk giderim verimliliklerine bağlı olarak ise çalışmada daha detaylı olarak kullanılmak üzere *Streptomyces* F0812, *Streptomyces* Y1401 ve *Streptomyces* IAUR8812 suşları seçilmiştir. Bu suşların Remazol Blue içeren sıvı kültürlerindeki renk giderim verimlilikleri ise 10 günlük statik inkübasyon süresinin ilk 5 gününde hızla artmış, 10 günlük inkübasyon süresinin sonunda ise *Streptomyces* sp. F0812 ve *Streptomyces* sp. Y1401 için %86; *Streptomyces* sp. IAUR8812 için ise %74 olarak belirlenmiştir (bkz. Şekil 4.4b).



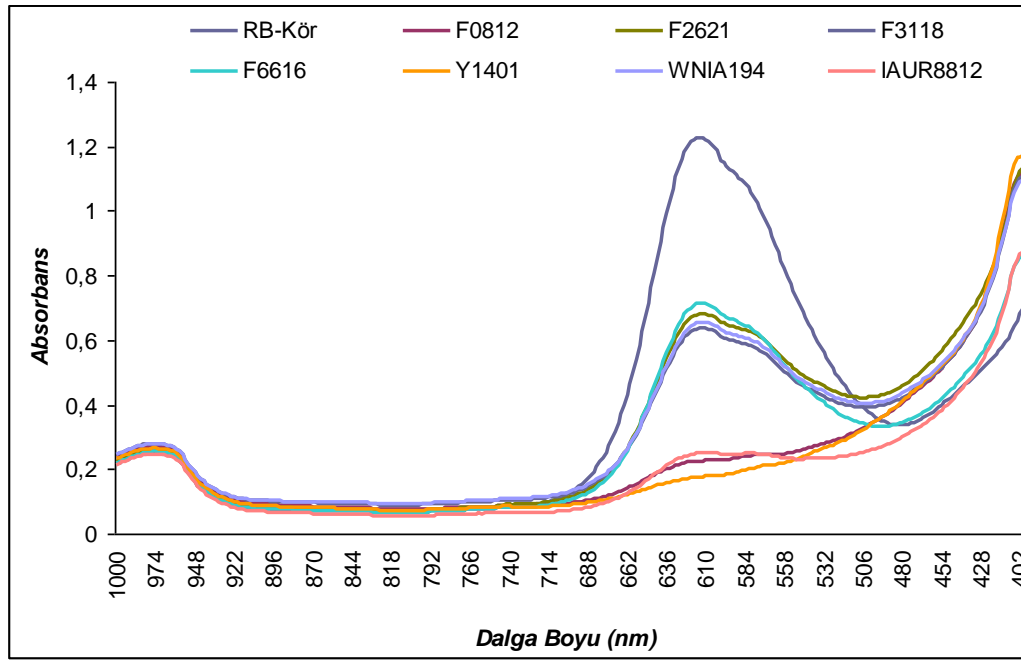
Şekil 4.2. Çalışmada kullanılan *Streptomyces* sp. ve *Actinomyces alboflavus* suşlarının Remazol Blue (150 µg/mL) içeren sıvı besiyerinde statik olarak, 30 °C'de, 5 günlük inkübasyonları sonucundaki dekolizasyon görüntüleri.

Çalışmada kullanılan *Streptomyces* sp. suşları ile Remazol Blue boyar maddesinin renk giderimi, sıvı kültür koşullarında hem statik hem de çalkalamalı olarak denenmiş, fakat çalkalamalı kültürlerde çok belirgin bir biyomas artışı gözlenmesine rağmen renk giderimi oldukça düşük olarak gözlenmiştir. Benzer bir sonuç ise *Pseudomonas* sp. SUK1 suş ile reaktif bir tekstil boyası olan Red BLI boyasının renk giderim çalışmasında gözlenmiş olup, bu suşun hem statik hem de çalkalamalı inkübasyon ortamındaki renk giderim aktiviteleri araştırılmış ve statik inkübasyonda renk giderimi sağlanırken, çalkalamalı inkübasyonda ise büyümenin olmasına rağmen renk gideriminin gerçekleşmediği belirtilmiştir [138].

Kullanılan Remazol Blue ise reaktif bir azo boyar maddesi olup, parçalanmaya karşı oldukça dirençlidir. Bu nedenle, Remazol Blue içeren hem katı hem de sıvı kültürlerde statik olarak büyüebilen ve aynı zamanda renk giderimi sağlayan *Streptomyces* sp. suşlarının bulunması dikkat çekicidir. Bununla birlikte tekstil sanayi atıklarındaki boyalarının renk giderim yetenekleri sadece funguslarla sınırlıymış gibi algılanmasına rağmen, *Pseudomonas luteola* bakterisi ile statik koşullarda yapılan bir çalışmada dört reaktif azo boyasının 42 saat sonundaki renk gideriminin %37-93 oranında azaldığı belirlenmiştir [139]. Aerobik koşullarda *Kurthia* sp. suşu ile ilgili yapılan renk giderim çalışmasında ise trifenilmetan boyalarının ve boya içeren atıksuyun ortamdan uzaklaştırıldığı belirlenmiştir. Trimetil boyasının %98'inin 30 dk'da, atıksudan boyanın giderilmesi ise %56 oranında 90 saatte gerçekleşmiştir [139].

4.2. Remazol Blue Renk Gideriminin Büyüme Kinetiğine Bağlı Değişimi

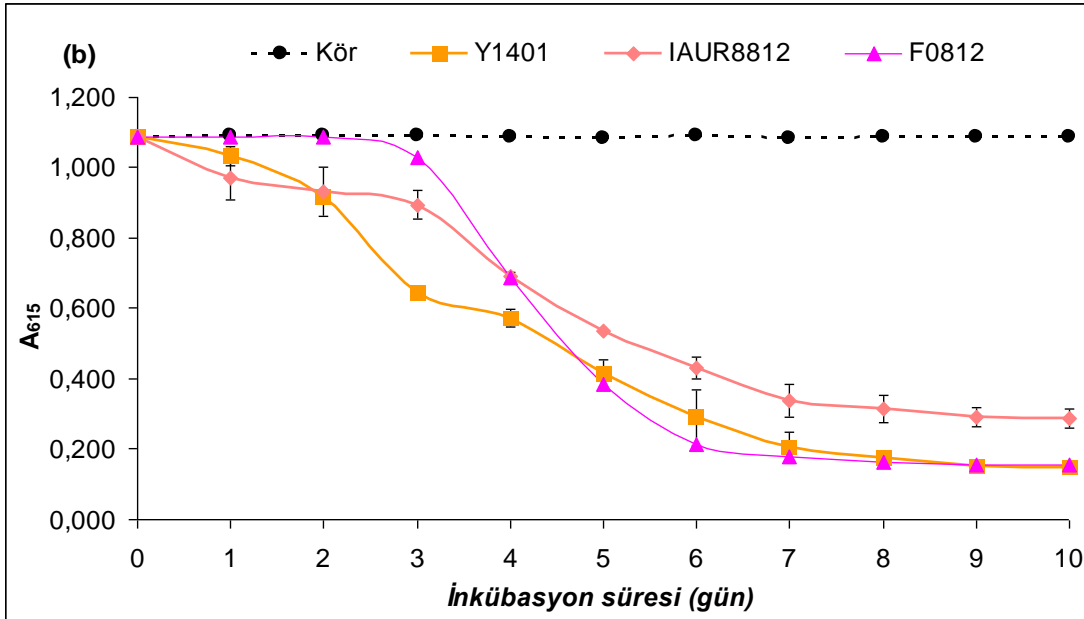
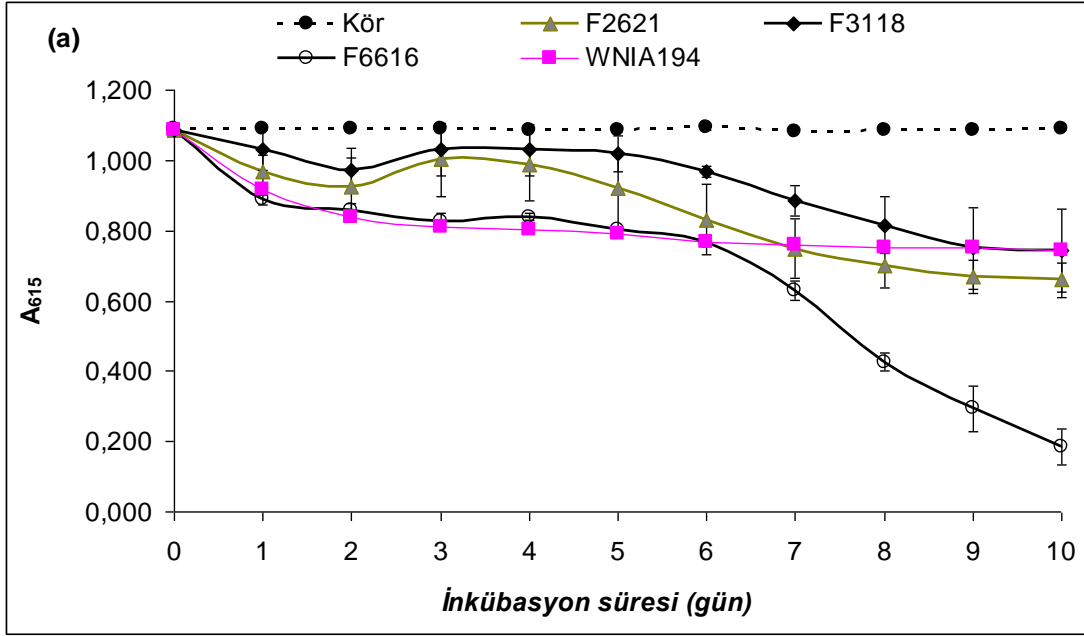
Bu çalışmada kullanılan Remazol Blue BB %133 reaktif boyasının *Streptomyces* sp. suşlarının büyüme kinetikleri ile olan ilişkisinin belirlenmesi amacıyla, 150 µg/mL boya içeren sıvı besiyerine inoküle edilen mikroorganizmaların inkübasyonuna 10 gün boyunca statik olarak devam edilmiştir. Bu süre boyunca, 24 saat aralıklarla alınan sıvı kültür örneği ise spektrofotometrik olarak incelenmiştir. Remazol Blue reaktif boyasının UV/Vis ışık spektrumundaki absorbans taraması ise boyanın 615 nm dalga boyunda maksimum absorbans gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Çalışmada kullanılan *Streptomyces* sp. ve *Actinomyces alboflavus* suşlarının Remazol Blue (150 µg/mL) içeren sıvı besiyerinde statik olarak, 30 °C’de, 5 günlük inkübasyonları sonucundaki dekolorizasyon aktiviteleri sonucunda kültür sıvılarının 1000-400 nm dalga boyundaki taramaları.

Bu çalışmada öncelikle toprak kaynaklı olan mezofilik *Streptomyces* sp. suşları tarafından aromatik bir yapıya sahip olan Remazol Blue BB %133 boyasının renginin giderilmesi ile ilgili 10 günlük inkübasyon çalışması yapılmıştır. Tarama çalışmalarında kullanılan 24 adet Actinobacteria üyesi arasından seçilen 7 suşun renk giderim verimlilikleri karşılaştırılarak (Şekil 4.4) en iyi suşlar olan *Streptomyces* sp. F0812, *Streptomyces* sp. Y1401 ve *Streptomyces* sp. IAUR8812 suşları ile çalışılmaya devam edilmiştir. Bu 3 *Streptomyces* sp. suşunun seçilme nedeni ise bu suşların Remazol Blue içeren sıvı kültürlerindeki renk giderim verimliliklerinin değerlendirildiği 10 günlük statik inkübasyon süresinin ilk 5 gününde renk giderim aktivitelerinin hızla artmış olması, 10 günlük inkübasyon süresinin sonunda ise renk giderim verimliliklerinin *Streptomyces* sp. F0812 ve *Streptomyces* sp. Y1401 için %86; *Streptomyces* sp. IAUR8812 için ise %74 olarak belirlenmesidir (bkz. Şekil 4.4b). Başlangıçta seçilen 7 *Streptomyces* sp. üyesinden geriye kalan *Streptomyces* sp. WNIA194, *Streptomyces* sp. F2621, *Streptomyces* sp. F3118 ve *Streptomyces* sp.

F6616 suşlarının 10 günlük inkübasyonları süresince sergiledikleri renk giderim verimlilikleri ise göreceli olarak daha düşük olduklarından çalışmada tercih edilmemişlerdir (Şekil 4.4a).



Şekil 4.4. Mikrobiyal suşların Remazol Blue (150 µg/mL) içeren sıvı besiyerinde statik olarak, 30 °C’de, 10 günlük inkübasyonları süresince renk giderim aktivitelerinin büyüme kinetiğine bağlı değişimi. (a) *Streptomyces* sp. F2621, F3118 F6616 ve *Actinomyces alboflavus* WNIA194 suşlarının; (b) *Streptomyces* sp. Y1401, IAUR8812 ve F0812 suşlarının göstermiş oldukları renk giderim aktiviteleri.

On günlük inkübasyon periyodu boyunca, 24 saat aralıklarla alınan sıvı kültür numuneleri ile renk yoğunluğunun kaybolup kaybolmadığı gözlenmiştir. Kültür sıvısından alınan numunelerin renk yoğunlukları Remazol Blue BB %133 boyasının maksimum absorbans gösterdiği 615 nm dalga boyundaki absorbansların belirlenmesi ile ölçülmüştür. Karbon ve enerji kaynağı olarak Remazol Blue boyasının varlığında *Streptomyces* sp. suşları normal gelişimlerini göstererek inkübasyon süresinin 3-4. günlerinde maksimum biyokütleyle ulaşmışlardır.

Biyokütle oluşumunu, kullanılan *Streptomyces* sp. suşlarının sağlamış oldukları renk giderim profilleri ile paralellik göstermektedir. Renk giderimi özellikle *Streptomyces* sp. suşlarının büyüme kinetiklerinin logaritmik büyüme fazına denk gelmesi (inkübasyon süresinin ilk 5 günü), büyüme fazının sona ermesi ile birlikte durgun ve ölüm fazları boyunca görülen renk giderimlerinin ise kararlı bir şekilde sabit kaldığı görülmektedir (Şekil 4.4; Şekil 4.5 ve Şekil 4.6). Renk gideriminin logaritmik büyüme fazında meydana gelmesi çalışmada kullanılan *Streptomyces* sp. suşlarının boyar maddenin renk gideriminden sorumlu olan metabolik sistemlerinin birincil metabolizmada rol aldığına işaret etmektedir. Organizmaların büyüme esnasında gerekli olan enerjinin ve karbonun temin edilebilmesi için gerekli olan metabolik yollar çalıştırılarak, yapısal enzimlerin üretilmesi ve boyar maddenin parçalanması gerçekleşiyor olabilmektedir.

Streptomisetler aerobik metabolizmaya sahip mikroorganizmalardır. Bu nedenle bakterinin büyüme koşulları aerobik olmaktadır. Ancak statik kültürde yapılan çalışmada yarı-aerobik ortam olmasına rağmen, bu ortamda bakteriler oldukça iyi bir şekilde büyüyebilmişler ve renk giderimini gerçekleştirebilmişlerdir (Şekil 4.4).

On günlük statik inkübasyon sonucunda elde edilen renk giderim verimlilikleri Şekil 4.4'den de görüldüğü üzere, seçilen yedi mezofilik *Streptomyces* sp. suşu Remazol Blue boyasını büyüme kinetiklerinin logaritmik fazında maksimum oranda parçalamaktadırlar. Bu suşlardan *Streptomyces* sp. F0812, 3. ve 6. günler arasında; *Streptomyces* sp. Y1401 suşu ise 2. ve 6. günler arasında en yüksek renk giderim aktivitesine sahip olduğu gözlenmiştir. Rengin başlangıçtaki absorbans oranı heriki suş için de hızla düşerek %86 oranında renk giderimi belirlenmiştir. Renk giderim

oranı yüksek olan diğeri bir suş ise *Streptomyces* sp. IAUR8812 suşudur. *Streptomyces* sp. F0812 ve *Streptomyces* sp. Y1401 suşlarından farklı olarak, *Streptomyces* sp. IAUR8812 suşu tarafından sergilenen renk giderim aktivitesi inkübasyonun 1. gününden başlayarak 3. günden itibaren hızlanmış ve 10. gün sonundaki renk giderim verimi %74 olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4.4b).

Eukaryotik olan fungusların aksine prokaryotik yapıya sahip olan *Streptomyces* sp. ve diğeri bakteri suşları ile yapılan çeşitli tekstil boyalarının renk giderimleri ile ilgili çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin, *Bacillus subtilis* ile yapılan renk giderim çalışmasında, aerobik ortamda *p*-aminoazobenzen renkli bileşiğinin redüksiyona uğradığı belirtilmiştir [140]. Aminoazobenzene bileşikler, Dimetil Yellow, *p*-hydroxyazobenzene ve azoresorcinol bileşiklerinin *Aeromonas hydrophilia* 24B suşu ile yapılan renk giderim çalışmalarında ise boyanın yapısına bağlı olarak, renk giderim oranlarının %54-90 arasında değiştiği belirtilmiştir. Bu çalışmada, çalkalamalı kültürlerdeki renk giderim verimliliklerinin statik kültürlere göre daha iyi olduğu gözlenmiştir [141]. Oysaki çalışmış olduğumuz *Streptomyces* suşlarının statik kültürdeki renk giderim verimleri oldukça yüksek olup, çalkalamalı sıvı kültürlerdeki büyüme ve biyokütle oranları yüksek olmasına rağmen renk giderim verimlilikleri oldukça düşük olarak belirlenmiştir. Yapılan başka bir aerobik renk giderim çalışmasında ise Gram-negatif bakteriler olan *Sphingomonas* sp. 1CX ve *Sphingomonas* sp. SAD4I suşları ile ilgili olarak tanımlanamamış aerobik biyofilm oluşumunun gözlemlendiği ve biyofilm içeren çalkalamalı reaktör içerisinde 1 saat içinde Acid Orange 7 boyasının renk gideriminin gerçekleştirildiği rapor edilmiştir. Her iki suşun da karışık kültür ortamında %90 oranında boyaların mineralizasyonunu gerçekleştirdikleri belirtilmiştir [139].

Remazol Black B ve tekstil atık suyunun renk giderimi *Shewanella putrefaciens* bakterisi ile sırayla 6,5 ve 24 saat sonunda gerçekleşmiştir. Bu çalışmada Remazol Black B boyası %85, atık sudan renk giderimi ise % 80 oranında gerçekleşmiştir [142]. Remazol Black B boyasının *Paenibacillus azoreducens* suşunun boya derişiminin 100 mg/mL olduğu durumda rengin %98'ini 1 gün içerisinde 37° de degradasyona uğrattığı gösterilmiştir.

Ksenobiyotik azo boyaların renk giderimleri genellikle karışık kültürlerle gerçekleştirilmektedir. Bu tip kültürlerde kullanılan mikroorganizmalar ise metabolik olarak birbirlerini tamamlamaktadırlar. Yapılan bir çalışmada iki bakteri suşunun bulunduğu kültür ortamında naftalin sülfonatın degradasyonu araştırılmıştır. *Sphingomonas* sp. BN6 suşu azo bağ yapısına sahip naftalin-2-sülfonat bileşimini ayırtmış, ancak oluşan salisilat iyonunun bu suş için toksik bir madde olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle, naftalin-2-sülfonat bileşiğinin tamamıyla ayrıştırılabilmesi için salisinat iyonunu parçalayabilecek başka bir suşa daha ihtiyaç vardır [139].

Boya içeren atık sudan tek bir suşun izole edilmesi zor olabileceğinden, karışık kültür degradasyon prosesleri avantajlı olabilmektedir. Biyodegradasyonun gerçekleşmesi için tek bir suşun başarılı olamayacağı durumlarda karışık kültürler etkili olabilirler ancak, karışık kültürler sistemdeki degradasyon prosesinin mekanizmasının anlaşılması için makroskobik bir gözlem sağlar. Oysa ki, tek bir bakterinin degradasyonunda prosesi gözlemek, mekanizmasını anlamak ve işlemin kontrolünü sağlamak daha kolay olabilmektedir [139].

4.3. Farklı Karbon Kaynaklarının Renk Giderimi Üzerine Olan Etkisi

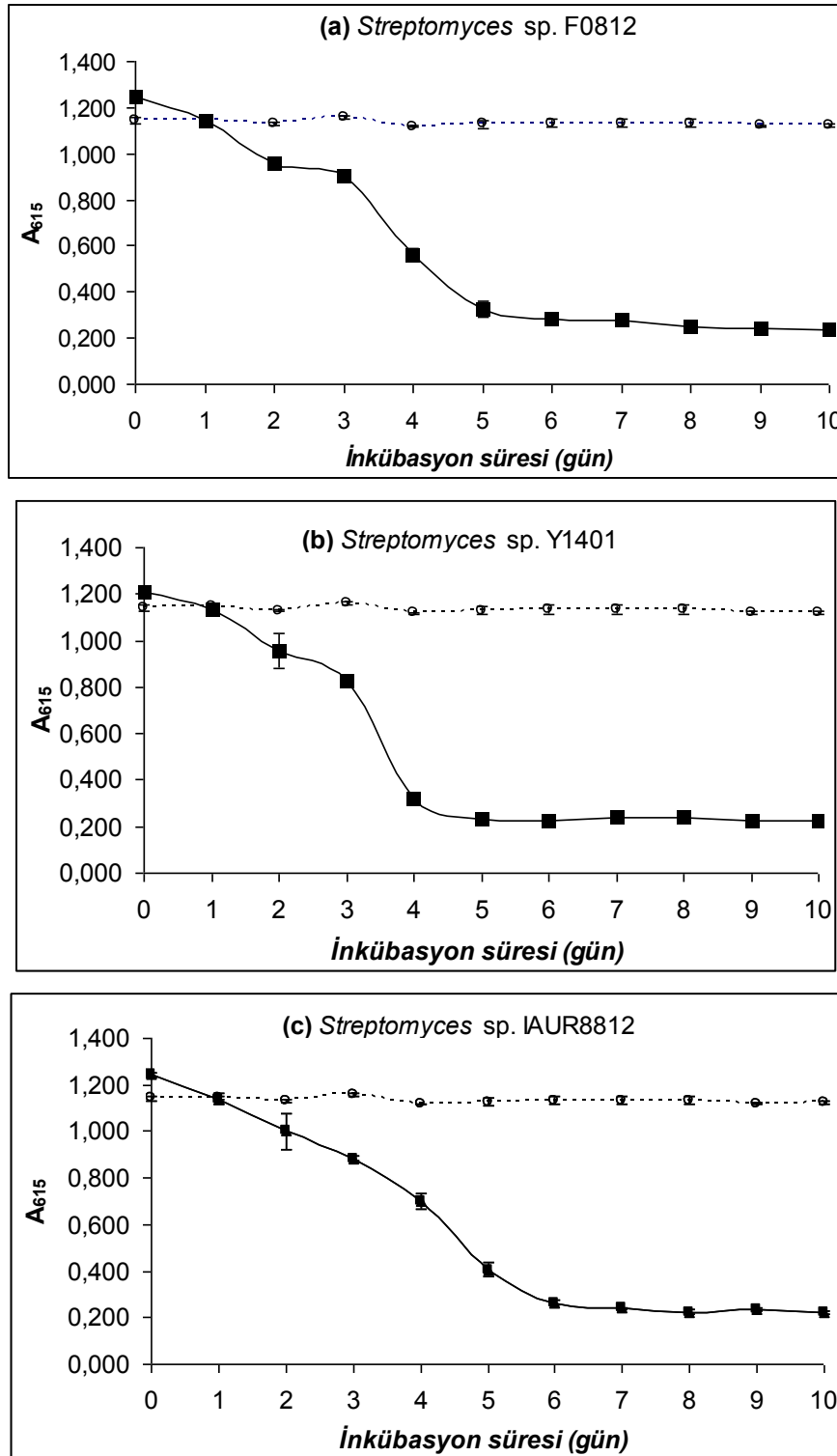
Farklı karbon kaynaklarının renk giderimi üzerine olan etkisini araştırmak için, karbon ve enerji kaynağı olarak Remazol Blue boyasına ilaveten öğütülmüş buğday samanı (% 0,6 w/v) ya da ksilan içeren (% 0,4 w/v) MS-YEM besiyeri kullanılmıştır. Karbon kaynaklarına ilaveten Remazol Blue boya maddesi içeren sıvı besiyerine organizmalar inoküle edilerek, 30 °C sıcaklıkta, statik koşullarda 10 gün boyunca inkübe edilmişlerdir. On günlük inkübasyon periyodu boyunca, 24 saat aralıklarla alınan sıvı kültür numuneleri ile renk yoğunluğunun kaybolup kaybolmadığı alınan numunelerin 615 nm dalga boyundaki absorbanların belirlenmesi ile ölçülmüştür.

Lignoselüloz olarak öğütülmüş buğday samanı kullanılarak yapılan indükleme çalışmaları sırasındaki büyüme kinetiğinin logaritmik fazının sonu olan 5. gündeki en yüksek renk giderim verimliliği *Streptomyces* sp. Y1401 suşu tarafından %81 olarak gerçekleştirilirken; aynı süre sonunda *Streptomyces* sp. F0812 suşunun renk giderim verimliliği %74, *Streptomyces* sp. IAUR8812 suşunun renk giderim verimliliği ise %67 olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4.5). İnkübasyon süresinin sonu

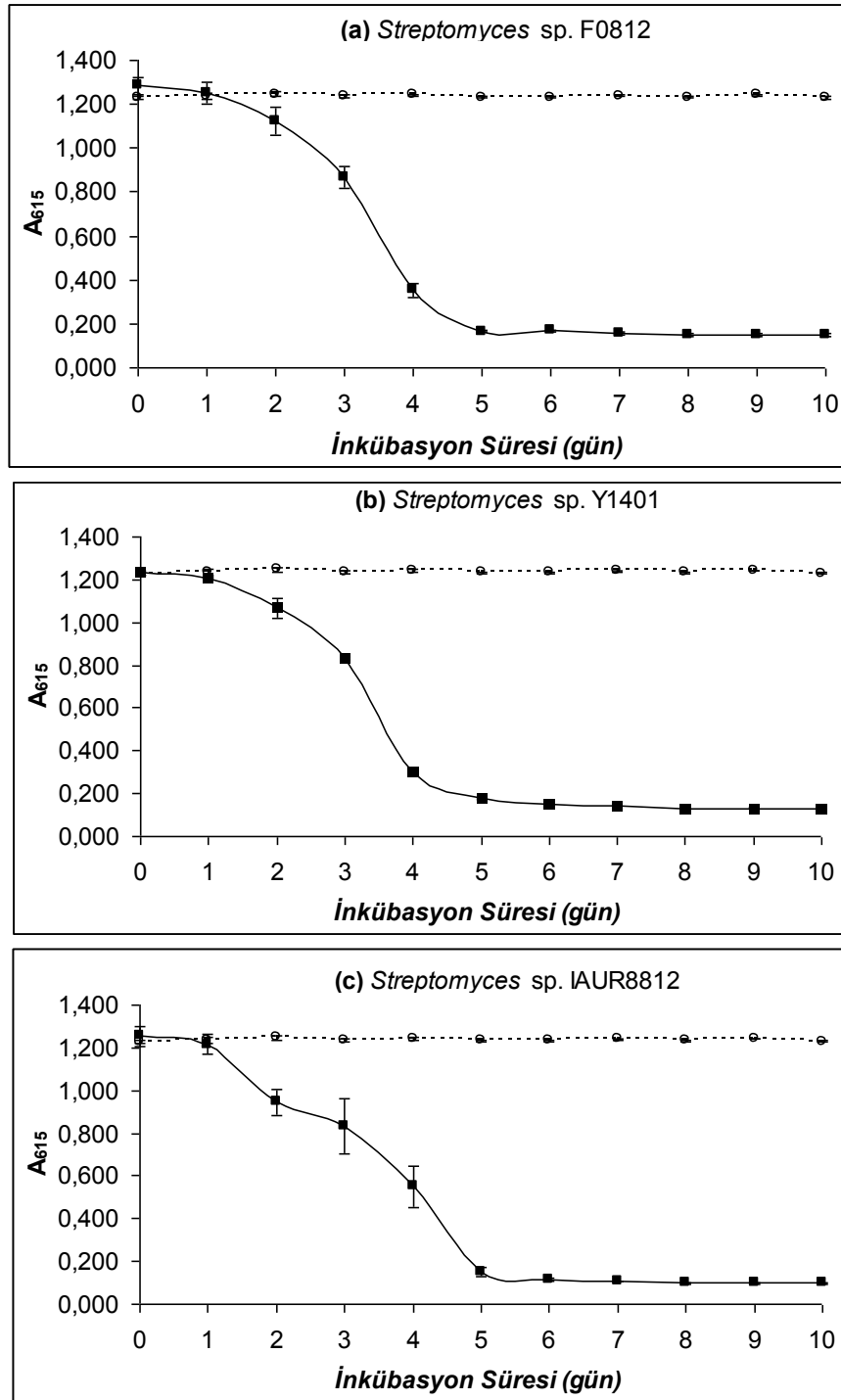
olan 10. gündeki renk giderim verimlilikleri ise *Streptomyces* sp. F0812 için %79; *Streptomyces* sp. Y1401 için %81 ve *Streptomyces* sp. IAUR8812 için ise %82 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.5). Bu sonuçlar da göstermektedir ki, her üç *Streptomyces* sp. suşunun da 10 günlük inkübasyon sonunda göstermiş oldukları renk giderim verimlilikleri birbirine oldukça yakındır.

Karbon kaynağı olarak yulaf ksilani (% 0,4 (w/v)) kullanılarak yapılan indüklenme çalışmaları sırasındaki büyüme kinetiğinin logaritmik fazının sonu olan 5. gündeki renk giderim verimlilikleri ise her üç suş için de birbirine oldukça yakın olup, *Streptomyces* sp. IAUR8812 suşu tarafından %88 olarak gerçekleştirilirken; aynı süre sonunda *Streptomyces* sp. F0812 suşunun renk giderim verimliliği %87, *Streptomyces* sp. Y1401 suşunun renk giderim verimliliği ise %86 olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4.6). İnkübasyon süresinin sonu olan 10. gündeki renk giderim verimlilikleri ise *Streptomyces* sp. F0812 için %88; *Streptomyces* sp. Y1401 için %90 ve *Streptomyces* sp. IAUR8812 için ise %92 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.5). Bu sonuçlar da göstermektedir ki, her üç *Streptomyces* sp. suşunun da 10 günlük inkübasyon sonunda göstermiş oldukları renk giderim verimlilikleri birbirine oldukça yakındır.

İlave karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılan yulaf ksilani ve öğütülmüş buğday samanının ise her üç *Streptomyces* sp. suşu için de oldukça kullanışlı kaynaklar olduğu görülmektedir. Buna rağmen, *Streptomyces* sp. F0812 suşunun 5. günündeki renk giderim verimliliği yulaf ksilani içeren ortamda %87 iken buğday samanı içeren ortamdaki renk giderim verimliliği ise aynı süre sonunda %74 olarak gerçekleşmiştir. *Streptomyces* sp. Y1401 suşunun 5. günündeki renk giderim verimliliği ise yulaf ksilani içeren ortamda %86 iken buğday samanı içeren ortamdaki renk giderim verimliliği ise aynı süre sonunda %81 olarak gerçekleşmiştir. Aynı şekilde *Streptomyces* sp. IAUR8812 suşunun 5. günündeki renk giderim verimliliği yulaf ksilani içeren ortamda %88 iken buğday samanı içeren ortamdaki renk giderim verimliliği ise aynı süre sonunda %67 olarak gerçekleşmiştir. Renk giderim aktivitesini indüklemek amacıyla ilave karbon ve enerji kaynağı olarak yulaf ksilani kullanılması, aynı amaçla buğday samanının kullanılmasına göre her üç *Streptomyces* sp. suşun da hem logaritmik büyüme fazının sonu olan 5. gündeki hem



Şekil 4.5. (a) *Streptomyces* sp. F0812, (b) *Streptomyces* sp. Y1401 ve (c) *Streptomyces* sp. IAUR8812 suşlarının Remazol Blue (150 µg/mL) içeren sıvı besiyerine ek karbon ve enerji kaynağı olarak öğütülmüş buğday samanının (% 0,6 w/v) ilave edilmiş olduğu statik koşullardaki, 30 °C’de, 10 günlük inkübasyonları süresince renk giderim aktivitelerinin büyüme kinetiğine bağlı değişimi. (---o--- Kontrol; —■— ise test grubu).



Şekil 4.6. (a) *Streptomyces* sp. F0812, (b) *Streptomyces* sp. Y1401 ve (c) *Streptomyces* sp. IAUR8812 suşlarının Remazol Blue (150 µg/mL) içeren sıvı besiyerine ek karbon ve enerji kaynağı olarak yulaf ksilanının (%0,4 w/v) ilave edilmiş olduğu statik koşullardaki, 30 °C’de, 10 günlük inkübasyonları süresince renk giderim aktivitelerinin büyüme kinetiğine bağlı değişimi. (---o--- Kontrol; —■— ise test grubu).

de inkübasyon süresinin sonu olan 10. gündeki renk giderim verimliliklerini yaklaşık olarak %10 artırmaktadır (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'yı karşılaştırınız). Bu sonuçlar ise çalışmada kullanılan *Streptomyces* sp. suşlarının her üçü için de yulaf ksilanının daha indükleyici olduğunu göstermektedir.

Tekstil atığı giderimi ile ilgili birçok çalışma, biyolojik arıtım muamelesinin birçok dış parametreden etkilendiğini kanıtlamaktadır. Ortamın oksijen seviyesi, sıcaklık, sistemin redoks potansiyeli ve pH, boya renginin indirgenmesinde önemli dış faktörlerdendir. Elektron donörü derişimi ve redoks madiatörü sistemdeki biyomas ve boya miktarı ile dengede olmalıdır. Saydığımız bu etkenlerin hepsi boya indirgenmesine hız veren ya da redüksiyonu inhibe eden faktörler olabilmektedir [139].

Penicillium sp. fungusları ile yapılan degradasyon çalışmasında dört farklı abiyotik ajan kullanılmıştır. Şekerkamışı melası, talaş, pirinç samanı ve kömürün kullanıldığı çalışmada *Penicillium commune*, *P. fregii*, ve *P. alli* funguslarının Direk Violet boyasını sırayla %96, %64 ve %65 oranında dekolorize ettiği abiyotik ajan olarak pirinç samanının varlığında, melas ve talaş atığına göre daha etkili bir renk giderimi olduğu sonucuna varılmıştır [143].

Al-Duri ve arkadaşlarının (1990) Basic Blue 69 ve Acid Blue 25 boyaalarının tekstil atığı içerisinde arıtılması için aktive edilmiş karbon kaynağı yerine şeker kamışı melası kullanılmasının daha avantajlı bir yöntem olduğu belirtilmiştir [144]. El-Geundi ve arkadaşlarının (1991) yapmış oldukları başka bir çalışmada ise renk gideriminde karbon ilavesi olarak zirai atıklardan mısır koçanı ve arpa atığının renk gideriminde kullanılabileceği belirtilmiştir [145].

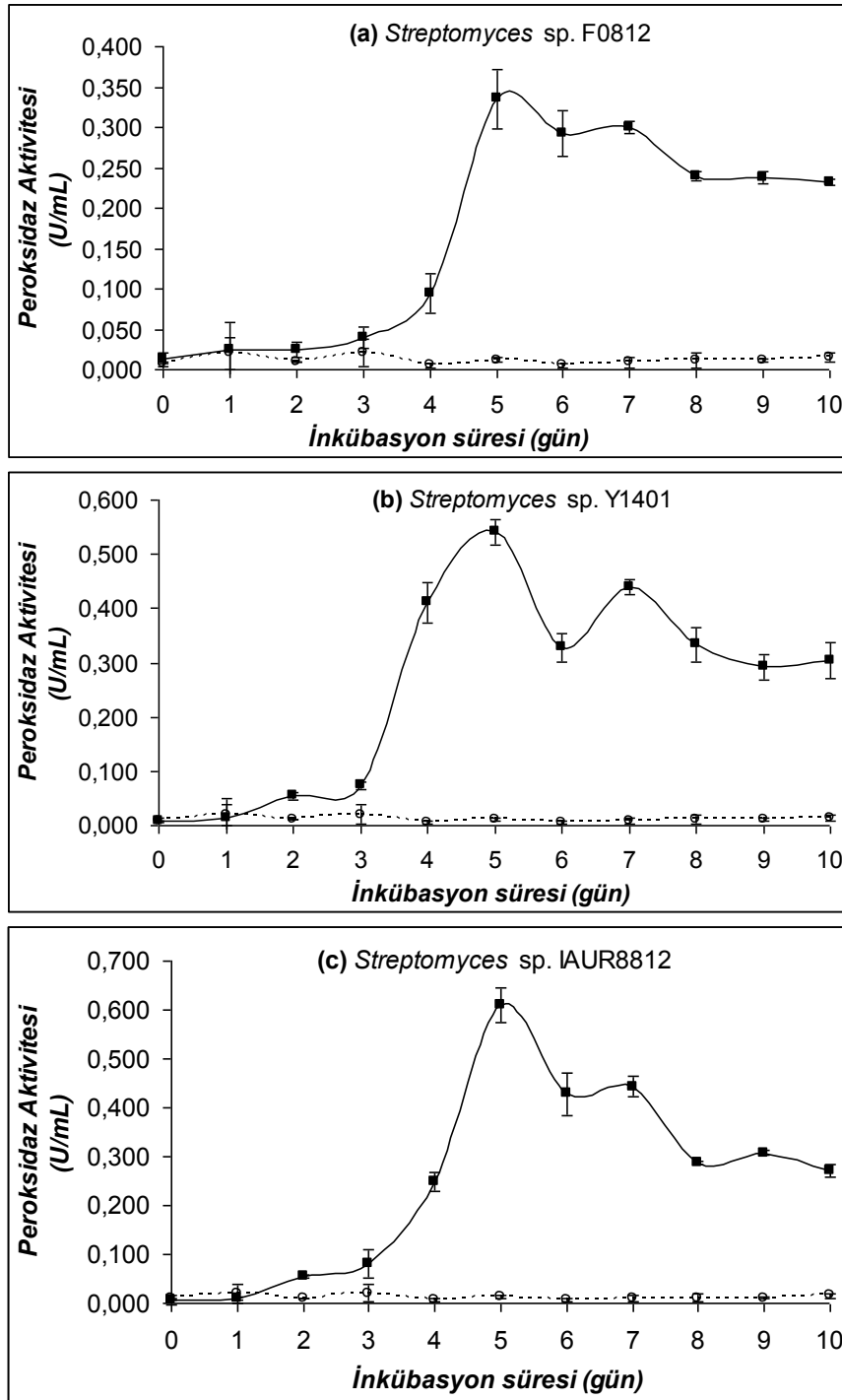
4.4. Renk Giderimi İle Ekstrasellüler Peroksidaz Üretimi Arasındaki İlişki

Karbon ve enerji kaynağı olarak % 0,6 (w/v) öğütülmüş buğday samanı içeren MS-YEM besiyerinde, lignoselülozu degrade eden *Streptomyces* sp. F0812, *Streptomyces* sp. Y1401 ve *Streptomyces* sp. AIUR8812 suşlarının büyümesi ve lignoselülozu ayrıştıran ekstrasellüler peroksidaz aktivitelerinin üretimi, 30 °C'da statik olarak 10 gün boyunca takip edilmiştir. Bu suşlar tarafından üretilen

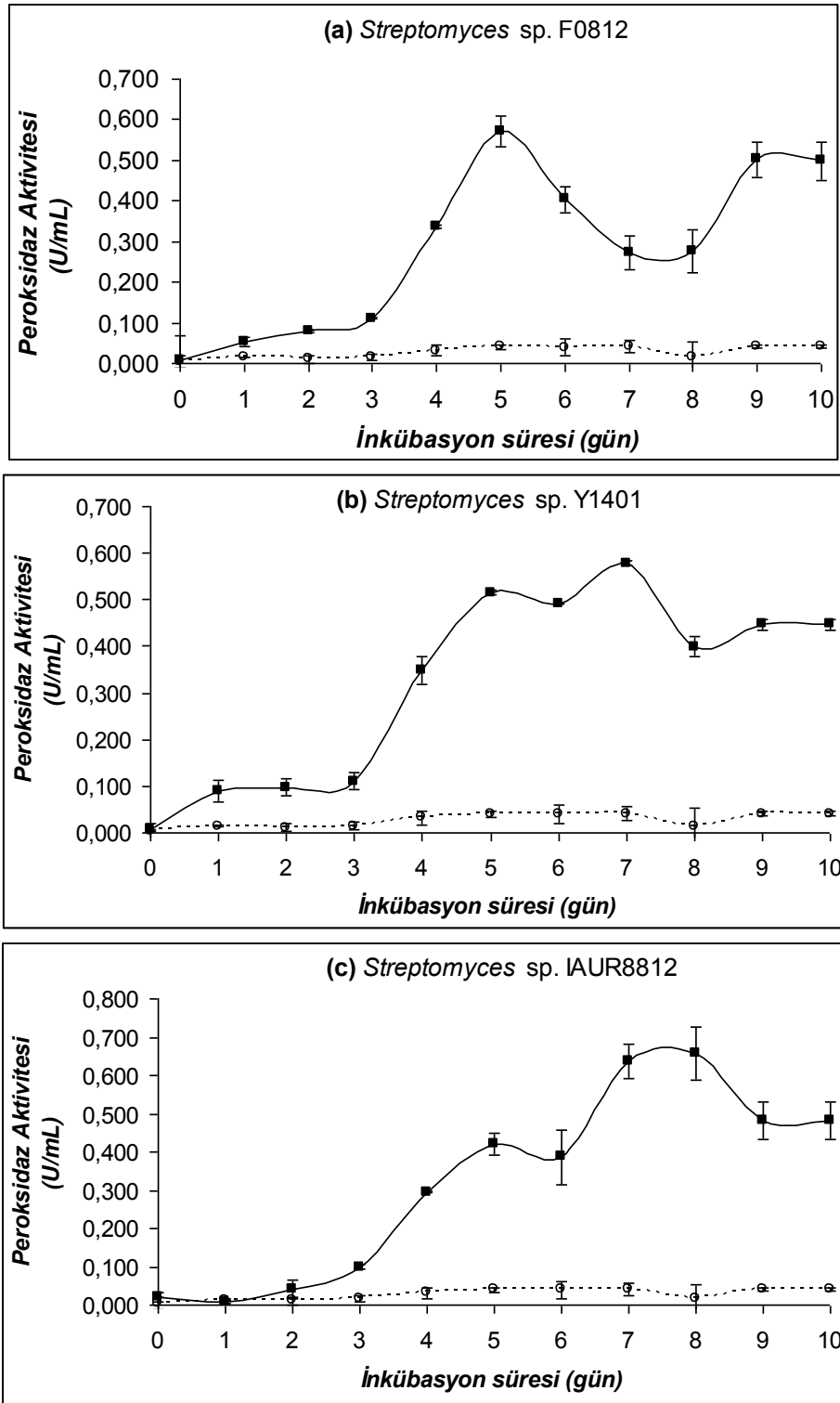
ekstrasellüler peroksidaz enzimi, organizmaların logaritmik büyüme fazı (yaklaşık 3.-5. günler arası) boyunca belirgin bir şekilde artış göstererek, maksimum düzeye ulaşmıştır (Şekil 4.7; Şekil 4.8 ve Şekil 4.9). Büyüme kinetiğinin ölüm fazı başında yani yaklaşık 5. günden itibaren ekstrasellüler peroksidaz enzimlerinin kültür sıvısındaki derişimlerinde ise önce belirgin bir düşüş başlamış ve daha sonra ölüm fazının başlangıcında lizize uğrayan hücrelerin intrasellüler peroksidaz enzimlerinin de kültür sıvısına geçmesinin bir sonucu olarak peroksidaz aktivitesinde tekrar bir yükselme meydana gelmiştir. İnasellüler peroksidaz enzimlerinin kültür sıvısına geçmesi ile yükselen peroksidaz aktivitesi, belki de hücre lizizi nedeniyle ortama salınan proteazların veya diğer inhibitörlerin de etkisiyle yeniden bir düşüş eğilimine girmişler ve inkübasyon süresinin son 2-3 gününde ise belirli bir düzeyde kalmışlardır.

Karbon kaynağı olarak hiçbir indükleyicinin bulunmadığı sıvı besiyerinde gerçekleştirilen inkübasyon çalışmasında, büyüme kinetiğinin logaritmik fazının sonu olan 5. gündeki ekstrasellüler proksidaz aktivitelerinin düzeyi ise her üç *Streptomyces* sp. suşu için de birbirinden oldukça farklı olmuştur. Bu süre sonunda en yüksek peroksidaz aktivitesi *Streptomyces* sp. IAUR8812 suşu tarafından 0,610 U/mL olarak üretilirken; aynı süre sonunda *Streptomyces* sp. Y1401 suşunun ürettiği peroksidaz aktivitesi 0,541 U/mL, *Streptomyces* sp. F0812 suşunun ürettiği peroksidaz aktivitesi ise 0,335 U/mL olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4.7).

Karbon ve enerji kaynağı olarak buğday samanı (% 0,6 (w/v)) kullanılarak yapılan indüklemeye çalışmaları sırasındaki büyüme kinetiğinin logaritmik fazının sonu olan 5. gündeki ekstrasellüler proksidaz aktivitesi ise her üç *Streptomyces* sp. suşu için de birbirine yakın olmasına rağmen, en yüksek peroksidaz aktivitesi *Streptomyces* sp. F0812 suşu tarafından 0,572 U/mL olarak üretilirken; aynı süre sonunda *Streptomyces* sp. Y1401 suşunun ürettiği peroksidaz aktivitesi 0,515 U/mL, *Streptomyces* sp. IAUR8812 suşunun ürettiği peroksidaz aktivitesi ise 0,420 U/mL olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4.8).



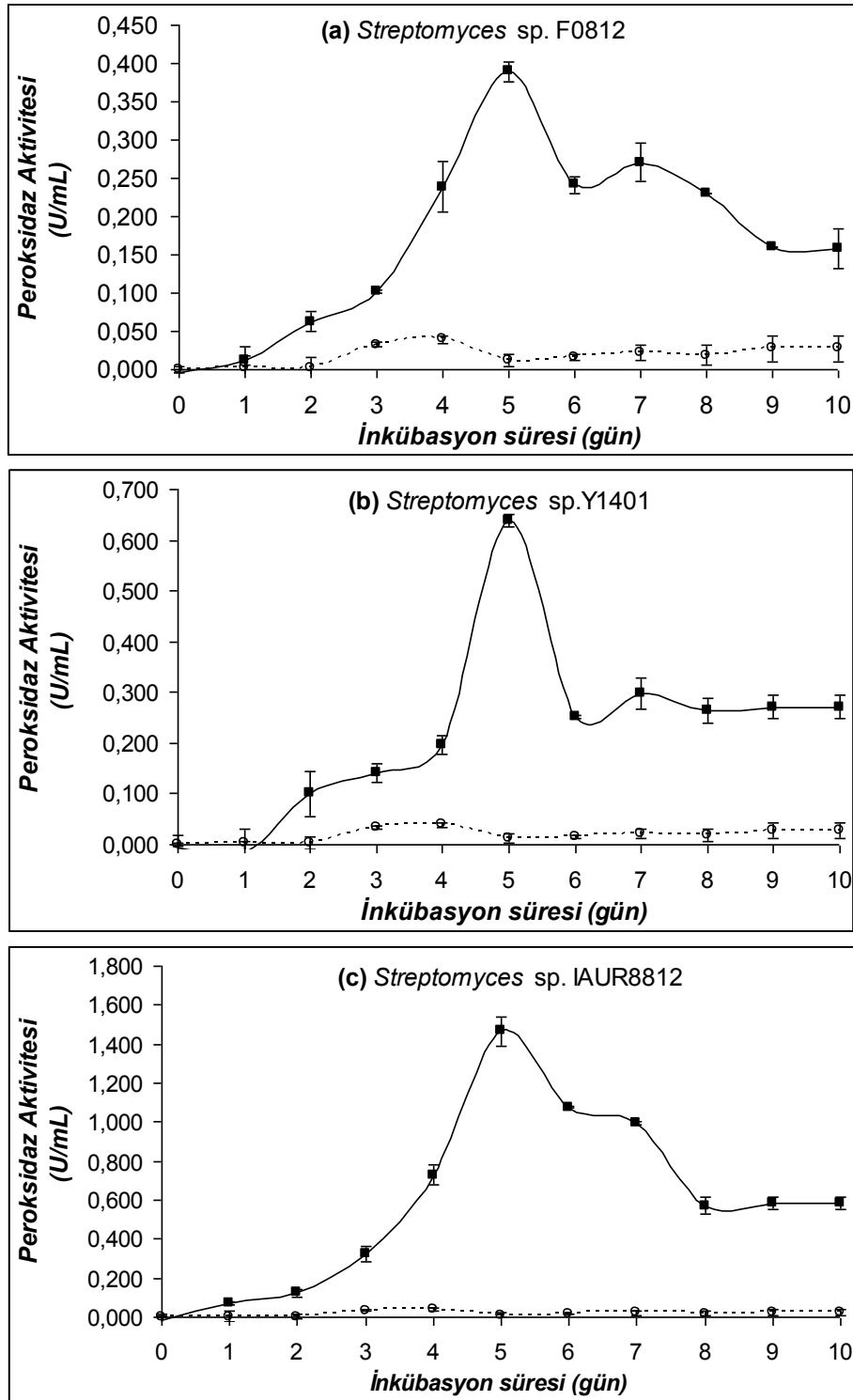
Şekil 4.7. (a) *Streptomyces* sp. F0812, (b) *Streptomyces* sp. Y1401 ve (c) *Streptomyces* sp. IAUR8812 suşlarının ilave karbon ve enerji kaynağı içermeyen sıvı besiyerinde (MS-YEM) statik koşullardaki, 30 °C’de, 10 günlük inkübasyonları süresince üretilen ekstrasellüler peroksidaz aktivitelerinin büyüme kinetiğine bağlı değişimi. (---o--- Kontrol; —■— ise test grubu).



Şekil 4.8. (a) *Streptomyces* sp. F0812, (b) *Streptomyces* sp. Y1401 ve (c) *Streptomyces* sp. IAUR8812 suşlarının sıvı besiyerine ek karbon ve enerji kaynağı olarak öğütülmüş buğday samanı (%0,6 w/v) ilave edildiği statik koşullardaki, 30 °C’de, 10 günlük inkübasyonları süresince üretilen ekstrasellüler peroksidaz aktivitesinin büyüme kinetiğine bağlı değişimi. (----o---- Kontrol; —■— ise test grubu).

Karbon ve enerji kaynağı olarak yulaf ksilanı (% 0,4 (w/v)) kullanılarak yapılan indükleme çalışmaları sırasındaki büyüme kinetiğinin logaritmik fazının sonu olan 5. gündeki ekstrasellüler peroksidaz aktivitesi ise her üç *Streptomyces* sp. suşu için de birbirinden oldukça farklı olmuştur. Bu süre sonunda en yüksek peroksidaz aktivitesi *Streptomyces* sp. IAUR8812 suşu tarafından 1,465 U/mL olarak üretilirken; aynı süre sonunda *Streptomyces* sp. Y1401 suşunun ürettiği peroksidaz aktivitesi 0,638 U/mL, *Streptomyces* sp. F0812 suşunun ürettiği peroksidaz aktivitesi ise 0,390 U/mL olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4.9).

İlave karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılan yulaf ksilanı ve öğütülmüş buğday samanının ise her üç *Streptomyces* sp. suşu içinde oldukça kullanışlı kaynaklar olduğu görülmektedir. Buna rağmen, *Streptomyces* sp. F0812 suşunun 5. günündeki peroksidaz aktivitesi, hiçbir ilave karbon kaynağı içermeyen sıvı kültürde 0,335 U/mL (Şekil 4.7a), yulaf ksilanı içeren ortamda 0,390 U/mL (Şekil 4.9a); buğday samanı içeren ortamda ise aynı süre sonunda 0,572 U/mL (Şekil 4.8a) olarak gerçekleşmiştir. Bu sonuçlar da göstermektedir ki *Streptomyces* sp. F0812 suşu için en iyi indükleyici buğday samanı olmuştur. *Streptomyces* sp. Y1401 suşunun 5. günündeki peroksidaz aktivitesi, hiçbir ilave karbon kaynağı içermeyen sıvı kültürde 0,541 U/mL (Şekil 4.7b), buğday samanı içeren ortamda 0,515 U/mL (Şekil 4.8b); yulaf ksilanı içeren ortamda ise aynı süre sonunda 0,638 U/mL (Şekil 4.9b) olarak gerçekleşmiştir. *Streptomyces* sp. IAUR8812 suşunun 5. günündeki peroksidaz aktivitesi, hiçbir ilave karbon kaynağı içermeyen sıvı kültürde 0,610 U/mL (Şekil 4.7c), buğday samanı içeren ortamda 0,420 U/mL (Şekil 4.8c); yulaf ksilanı içeren ortamda ise aynı süre sonunda 1,465 U/mL (Şekil 4.9c) olarak gerçekleşmiştir. Bu sonuçlar da göstermektedir ki, *Streptomyces* sp. Y1401 ve *Streptomyces* sp. IAUR8812 suşları için peroksidaz aktivitesi açısından en iyi indükleyici yulaf ksilanı olmuştur. Bu durum ise bu suşlar tarafından gerçekleştirilen renk giderim aktivitesi ile ligninolitik bir enzim olan peroksidaz enzimi arasında bir ilişkinin olabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.9. (a) *Streptomyces* sp. F0812, (b) *Streptomyces* sp. Y1401 ve (c) *Streptomyces* sp. IAUR-8812 suşlarının Remazol Blue (150 µg/mL) içeren sıvı besiyerine ek karbon ve enerji kaynağı olarak yulaf ksilani (%0,4 w/v) ilave edilmiş olduğu statik koşullardaki, 30 °C’de, 10 günlük inkübasyonları süresince üretilen ekstrasellüler peroksidaz aktivitelerinin büyüme kinetiğine bağlı değişimi. (---o--- Kontrol; —■— ise test grubu).

Doğada birçok farklı peroksidaz enzimi bulunmaktadır. Peroksidaz aktivitesi, bitkilerde, mikroorganizmalarda ve hayvanlarda mevcuttur. Bitkilerde bulunan peroksidaz enzimi lignin sentezinden ve bitkilerin savunma mekanizmasından sorumlu bir enzimdir [146, 147]. Gıda endüstrisinde kullanılan peroksidaz enzimi sebzelerin dayanıklılığını arttırıcı bir indikatör olarak kullanılmaktadır. Peroksidaz enzimlerinin çoğu hem proteinlerdir ve Fe(III) protoporfirin IX içerirler. Moleküler ağırlıkları 30 ile 150 kDa arasında değişmektedir. Bitki peroksidazları ailesi, maya sitokrom *c* peroksidazı, bitki askorbat peroksidazı, fungal peroksidazı gibi peroksidazları kapsarken, memeli peroksidazları ise miyeloperoksidazlar, laktoperoksidazlar, tiroidperoksidazları kapsamaktadır [148]. Peroksidaz enzimleri, çok sayıda substratı H₂O₂ kullanarak oksitlemektedirler.

Azo boyaların bakteriyel metabolizması, başlangıçta azo bağlarının aromatik aminlere ayrılmasını gerektirir. Bu durumun aerobik ortamda boyalarla büyüeyebilen bakterilerce meydana getirildiği gösterilmiştir. Bu durum azo-redüktazın varlığında O₂'nin kullanılarak azo bağlarının kırılması ile ilgilidir. Daha yaygın bir çalışma ise anaerobik ortamda azo boyaların yıkımıdır. Bu reaksiyon daha yavaş ve özgül olmamakla birlikte, düşük moleküler ağırlığa sahip redoks mediatörler (flavin, NAD(P)H) ile gerçekleşmektedir [149].

Bir odun çürükçül fungusu olan *Trichophyton rubrum* LSK-27 ile ilgili dekolorizasyon çalışmasında 28 °C'de çalkalamalı inkübasyonda Remazol Tiefschwarz, Remazol Blue RR and Supranol Turquoise GGL boyalarının dekolorizasyonları sırasıyla %83, %86 ve %80 oranlarında olduğu gözlenmiştir. Hem biyoadsorbsiyon hem de ayrışmanın gerçekleştiği deneyde, ayrıştırma enzimlerinin lakkaz ve mangan peroksidaz olduğu belirtilmiştir [150].

Bir beyaz çürükçül fungus olan *Trametes gallica* suşunun lignoselülotik enzimlerinin çalışıldığı bir makalede selülaz, ksilanaz, MnP, LiP ve Lakkaz üretiminin N kaynağına bağlı olarak üretim oranları tartışılmıştır. Sonuçlar düşük azot kaynağında (2,2 mM) ve durgun yüzey kültüründe MnP oranının yüksek olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte yüksek azot kaynağının (22 mM) bulunduğu besiyerinde ise lakkaz oranının yüksek olduğu belirlenmiştir [151].

Bitkilerden elde edilen HRP'nin serbest radikal polimerizasyon mekanizması yolu ile parçalanmaya dirençli fenol gibi bileşikleri degrade ettiği bilinmektedir [152]. Bhunia ve arkadaşları (2004) tarafından HRP enziminin Remazol ve Cibacron gibi önemli sentetik boyaların çöktürme ve degradasyon işleminde oldukça verimli olduğu tespit edilmiştir. Remazol boya yapılarında en az bir aromatik grup taşır. Bu çalışmada ortam pH'sının HRP aktivitesini inhibe ettiği belirtilmiş olup, aktivitenin ortamdaki boyanın derişimine ve H₂O₂ oranına göre değişiklik gösterdiği belirtilmiştir. Boya derişiminin HRP aktivitesini engellemesi ise bu enzimin potansiyel uygulamalar için bir dezavantaj oluşturmaktadır [153].

Peroksidaz aktivitesine sahip bakteriler arasında ise *Streptomyces* sp. ve *Sphingomonas chlorophenolicus* (*Flavobacterium* sp. ATCC 39723) de bulunmaktadır [149]. *Streptomyces chromofuscus* A11 tarafından azo boya ların degradasyonu ekstrasellüler peroksidazlar tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu peroksidazlar *Phanerochaete chrysosporium* ve bayır turpu peroksidazları gibi sınırlı substrat özgülüğüne sahiptirler. Ligninolitik funguslar ile karşılaştırıldığında, metabolizma sonucu bakterilerin ürettiği CO₂ miktarı fungusların ürettiği CO₂'ye göre oldukça az miktardadır [154]. Aerobik renk gideriminde bakterilerin çoğu, ilave olarak farklı karbon kaynaklarının varlığında renk giderimini gerçekleştirebildiğinden azo boya ların bazı bakterilerce karbon kaynağı olarak kullanılmadığı belirtilmektedir. Bu nedenle yapılan çalışmalarda *Bacillus subtilis* suşunun aerobik ortamda glikoz varlığında *p*-aminoazobenzeni aniline parçaladığı gösterilmiştir. Benzer şekilde *Pseudomonas stutzeri*, *Acetobacter liquefaciens* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarının nutrient broth ya da glukoz varlığında Acid Red 2 boyasını parçaladıkları belirtilmiştir. Acid Orange 10, Acid Orange 7 ve Acid Orange 5 boya larının ve Acid Red 88 boya larının farklı karbon kaynağı varlığında *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Sphingomonas* sp. ve *Xanthomonas* sp. üyelerince ayrıştırıldıkları belirtilmiştir [149].

Son zamanlarda yapılan bazı araştırmalar sentetik boya degradasyonunda gen manipilasyonu ile yüksek verimlilik alınabileceğine yöneliktir. *Pseudomonas luteola*, *Bacillus* sp. ve *Clostridium perfringens* mikroorganizmalarından alınan azo redüktaz genlerinin *E. coli* bakterisine klonlandığı çalışmalarda mevcuttur [155-157].

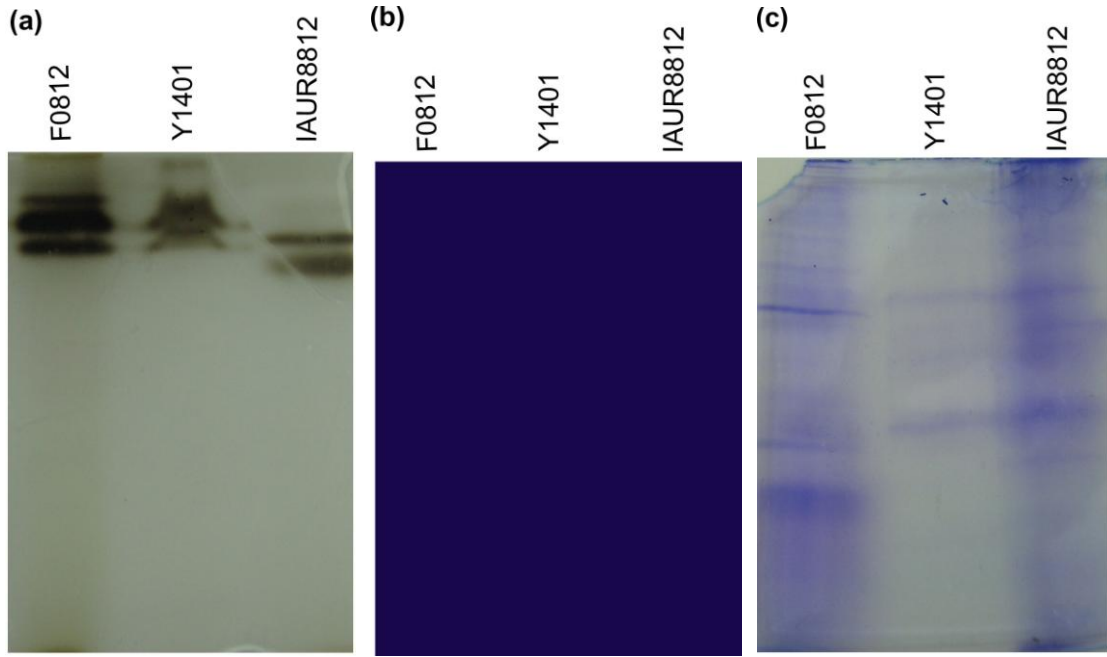
Çeşitli filamentli fungus kaynaklı lakkaz enziminin mayalara başarılı bir şekilde transfer edildiği bir çalışmada ise, gen transferinin yapıldığı mayalarla boyaların renk giderimindeki verimliliğin artırıldığı belirtilmiştir [158-159].

4.5. *Streptomyces* Suşlarının Ekstrasellüler Proteinlerinin Elektroforetik Analizi

Bu çalışmada kullanılmış olan *Streptomyces* sp. F0812, *Streptomyces* sp. Y1401 ve *Streptomyces* sp. IAUR8812 tarafından üretilen ekstrasellüler peroksidaz enzimlerinin izomer sayısının belirlenmesi ve bu peroksidaz enzimleri ile Remazol Blue renk giderimi arasında bir ilişkinin olup olmadığı, PAGE ile ayrılmış olan proteinlerin zymogram olarak geliştirilmesi ile belirlenmiştir. Bu amaçla kullanılan ham enzim preparatları ise çalışmada kullanılan *Streptomyces* suşlarının ideal ortamlarda kültürlerinin gerçekleştirilmesi sonucunda toplanan kültür sıvılarının ultrafiltrasyon yöntemi ile deriştirilmesi sonucunda hazırlanmıştır. Deriştirilen kültür sıvılarının PAGE yöntemi ile ayrıştırılması sağlandıktan sonra, substrat olarak L-DOPA'nın kullanıldığı zymogram analizinde ise *Streptomyces* sp. F0812 suşuna ait 3 ekstrasellüler peroksidaz izomeri belirlenirken, *Streptomyces* sp. Y1401 ve *Streptomyces* sp. IAUR8812 suşlarının ise 2'şer izoformu belirlenmiştir (Şekil 4.10a).

PAGE yöntemi ile ayrıştırılması sağlanan *Streptomyces* sp. suşlarına ait ekstrasellüler proteinleri içeren jelin substrat olarak Remazol Blue boyar maddesinin kullanıldığı zymogram analizinde ise *Streptomyces* sp. suşlarının hiç birisi de aktivite göstermemiş olup, bu suşların peroksidaz aktivitelerinin Remazol Blue boyar maddesinin dekolorizasyonundan sorumlu olmadıkları ortaya çıkmaktadır (Şekil 4.10b).

PAGE yöntemi ile ayrıştırılmış olan *Streptomyces* sp. suşlarına ait ekstrasellüler proteinleri içeren jelin RBB R-250 ile boyanması sonucunda ise bu suşlara ait peroksidaz izomerlerinin doğal moleküler kütlelerinin ise diğer ekstrasellüler proteinlere göre daha büyük olduğu görülmektedir (Şekil 4.10c).



Şekil 4.10. *Streptomyces* sp. F0812, *Streptomyces* sp. Y1401 ve *Streptomyces* sp. IAUR8812 suşları tarafından öğütülmüş buğday samanı (%0,6 w/v) içeren sıvı besiyerinde üretilen ekstrasellüler enzimlerinin elektroforetik (PAGE) olarak ayrıştırılması sonucunda (a) L-DOPA ve (b) Remazol Blue içeren solüsyonlarla zymogram olarak geliştirilmesi. (c) Doğal koşullarda (PAGE) ayrıştırılmış olan ekstrasellüler proteinleri içeren jelin RBB ile boyandıktan sonraki jel profili.

Funguslarda LiP enzimi fenolik olmayan aromatik bileşikleri degrades ederken, MnP enzimi birçok fenolik bileşiği degrades etmektedir. Lakkaz ise O₂ varlığında fenol ve anilinleri okside eden bakır içeren enzimlerdir. Hem LiP hem de MnP enzimleri azo bileşikleri degrades etmekte ve bu enzimler farklı azo boyalara karşı farklı substrat spesifiteleri göstermektedirler [99]. MnP ve lakkazların sınırlı spektrumdaki azo boyaları parçaladıkları zannedilmektedir. Tercihen bu enzimler *para*-pozisyona sahip fenolik birimleri ve hidroksil grupları ile ilişkili 2 ve 2,6 pozisyonundaki metil ya da metil alt birimlerini ayrıştırabilmektedirler [99,160].

Pleurotus sajor-caju PS2001 suşu tarafından üretilen enzimatik ekstraktın boyar madde degradesyonu ile ilgili çalışmada Remazol Blue 220 ve Asit Blue 280 boyaları kullanılmıştır. *Pinus* sp. talaşı içeren katı-hal fermentasyonunda suş tarafından lakkaz ve MnP aktivitesi belirlenmiştir. Petri kutusundaki kültürler

antrakinon tip Remazol Blue 220 boyasının dekolorizasyon prosesinde bir redox mediatör olarak görev aldığı belirtilmiştir. Reaktif Blue 220 ve Asit Blue 280 boya ları sırasıyla 30 ve 60 dk'da dekolorizasyona uğramışlardır. Ayrıca yarı batık kültürlerde veratril alkol oksidazları ve lignin peroksidaz aktiviteleri gözlenmiştir (RB 220 = 50 mg). Sıvı kültürlerde ise bu boyaya karşı lakkaz enzim aktivitesi gözlenmiştir [161] Aynı şekilde Vares ve arkadaşlarının (1995) Tra suşu ile yapmış oldukları çalışmada, katı kültürde MnP, sıvı kültürlerde ise yalnızca LiP izoformlarının gözlendiği belirtilmiştir [162].

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, tekstil fabrikalarında yaygın olarak kullanılan Remazol Blu boyar maddesinin üç *Streptomyces* sp. suşu tarafından sıvı kültür ortamında statik koşullarda, 10 günlük inkübasyonu boyunca renk giderim verimlilikleri ile bu suşlar tarafından üretilen ekstrasellüler peroksidaz enzimleri ile renk giderim aktiviteleri arasındaki ilişki belirlenmeye çalışılmıştır.

Gelişen teknoloji ile birlikte çevre kirliliği de önemli derecede artmıştır. Bunun sonucunda ekosistemde ozon tabakasının incilmesi, yeşil alanların azalması, hava ve su kirliliği gibi canlılığın devamını tehdit eden olumsuzluklar meydana gelmektedir. Son yıllarda ise özellikle gelişmiş ülkelerde hem sanayileşmek hem de çevreyi korumak adına tedbirler düşünölmeye başlanmıştır. Bu durum Türkiye'nin en büyük ve en önemli sektörü olan tekstil sanayisini de etkilemiştir. Çünkü tekstil sanayisinde kullanılan boyalar, yardımcı kimyasallar, ağır metaller, boya hızlandırıcılar ve dioksinler canlılar üzerinde toksik etkiler yaratabilmektedir. Özellikle tekstil liflerinin boyanmasında kullanılan bazı sentetik boyalar indirgenerek amin gibi karsinojenik bileşiklerin oluşmasına neden olmaktadır.

Tekstil endüstrisi atıklarının arıtılması için birçok fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntem önerilmektedir. Önerilen fiziksel ve kimyasal yöntemlerin yüksek maliyet gerektirmeleri ve her boya için kullanılamıyor olması uygulamayı zorlaştırmaktadır. Önerilen biyolojik arıtım ise endüstriyel proseslerde alıcı ortama geçen organikler için en dikkat çekici giderim prosesi olmuştur. Bu yöntemler anaerobik-aerobik yöntem ve biyosorpsiyondur.

Biyosorpsiyon, kimyasal maddelerin mikrobiyal kütle tarafında adsorpsiyonu veya kütlede birikimi olarak tanımlanmaktadır. Ölü bakteriler, maya ve mantarların kullanılabildiği bu yöntem çok geniş kimyasal çeşitliliğe sahip olan tekstil boyaların yapılarına ve mikrobiyal kütlelerin özgül kimyasına bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Biyosorpsiyon mekanizmasının en önemli avantajı atık sulardaki ağır metal derişimlerini en düşük seviyeye kadar indirgeyebilmesidir. Çalışmalarda çok seyreltik sularda bile metal iyonlarının giderildiği ve proseslerde ekonomik biyosorbentlerin kullanıldığı belirtilmiştir. Tekstil atık suyunda boya ile bağlanmış

ağır metaller (krom, çinko, bakır v.b) bulunabilmektedir. Yaptığımız çalışmada Streptomisetlerin farklı tekstil boyalarının bulunduğu katı besiyerinde suşların çoğunun tekstil boyalarını absorbe edebilmesi, Streptomisetlerin metal içerikli boyaların biyosorpsiyon çalışmalarında kullanılabileceğini göstermektedir (bkz. Çizelge 4.1). Ayrıca, biyosorpsiyon işleminin ortalama 25°C’de gerçekleşmesi en idealidir. Çünkü yüksek sıcaklıkta adsorpsiyonun tersinir bir reaksiyon olmasından dolayı hücre yüzeyi ile metaller arasındaki bağlar kopabilmektedir. Bu açıdan bakıldığında ise mezofilik Streptomisetler adsorpsiyon açısından ideal bakteriler olabilir.

Anaerobik biyolojik yöntemin uygulandığı proseste ilave karbon kaynağına ihtiyaç vardır. İlave karbon metan ve karbondioksit dönüştürülmekte ve elektronlar açığa çıkmaktadır. Bu elektronlar elektron taşıma zincirinden son elektron alıcısına yani azo-reaktif boyaya taşınmakta ve boyayla reaksiyona girmekte, böylece renkten sorumlu olan azo bağları kırılmaktadır. Azo bağlarının kırılmasını O₂ inhibe etmektedir. Bu nedenle boya degradasyonunun gerçekleşmesinde ilk adım azo köprüsünün kırıldığı anaerobik yöntem olmalıdır. Azo bağlarının kırılmasıyla ortaya çıkan aromatik aminler, aromatik bileşiğin halkasının açılması ve hidroksilasyonla aerobik ortamda mineralize edilebilmektedirler. Ayrıca yapılan aerobik mikrobiyal proseslerde azo bağlarının kırılmış olmamasından dolayı büyük moleküller halinde hücre içine giremeyeceği bu nedenle bu çalışmalarda daha çok adsorpsiyonun meydana geldiği gözlenmiştir. Bu nedenle tekstil atığının arıtım muamelesinde ilk olarak azo bağının kırılıp daha sonra da aerobik ortamda aminlerin parçalanabildiği anaerobik/aerobik reaktör sistemlerinin kullanılması önerilmiştir.

Yapılan çalışmalar ise aerobik ortamda bitkilerdeki yapısal polimer lignini ve ksenobiyotik maddelerin parçalanmasını sağlayan peroksidaz enzimlerine sahip mikroorganizmaların veya enzimlerinin kullanılabilmesi fikrini ortaya çıkarmıştır. Bu mikroorganizmalar funguslar ve aktinomisetlerdir. Son 30 yıldır lignoselüloz degradasyonu ile ilgili bilgiler yüksek lignoselülotik aktiviteye sahip fungusların çalışılması ile elde edilmiştir. Fungusların ligninin degradasyonu sonucunda lignin, kompleks yapısı ikincil metabolizma ürünü olarak CO₂’ye kadar parçalanabilmekte; streptomisetlerde ise lignin birincil metabolizma ürünü olarak APPL’ye (suda

çözünebilen lignin fragmentleri) kadar degrede olmakta ve fungus metabolizması sonucu ortaya çıkan CO₂'ye göre önemsiz miktarda CO₂ ortaya çıkmaktadır. Ligninin degradasyonundan sorumlu lakkaz ve peroksidaz enzimlerinin tekstil atığı boyalarının degradasyonlarını gerçekleştirdiğine dair funguslarla ilgili oldukça fazla çalışma mevcuttur. Ancak funguslar için atık reaktörünün uygun bir habitat olmayışı ve N gibi sınırlayıcı faktörlerden etkilenmesi gibi birçok nedenden ötürü fungusların boya degradasyonu için atık reaktöründe henüz çözülmemiş problemleri mevcuttur. Yaptığımız çalışmada peroksidaz enzim aktivitesine sahip *Streptomyces* sp. suşlarından boya degradasyonu ile ilişkisi gözlenmiştir. Oldukça kompleks yapıda ve aromatik bir özelliğe sahip Remazol Blue BB %133 boyasının *Streptomyces* sp. suşlarından konsantre edilmiş peroksidaz enzimi ile ilişkisi incelenmiştir. Katı ortamda birçok boyayı absorbe ve degrede eden *Streptomyces* sp. suşlarının, seçilen RB boyasının sıvı kültüründe oldukça yüksek renk giderimini sağladığı gözlenmiştir. Çalkalamalı ortamda ise suşlar büyüebildiği ve bunun sonucunda da oldukça yoğun bir biyokütle oluşturmaya rağmen, boya degradasyonu gerçekleşmemiştir. Aynı kültürlerin statik ortama alınması ile bu suşların Remazol Blue içeren sıvı besiyerinde çoğaldıkları ve degradasyon yapabildikleri gözlenmiştir. Bu durum ortamın yarı oksijenik olması veya bakterilerin karbon kaynaklarına ulaşabilme durumları ile ilgili olabilir.

Çalışmanın devamında, bu çalışmada kullanılmış olan *Streptomyces* sp. suşları tarafından üretilen ekstrasellüler peroksidaz enzimlerinin izomer sayısının belirlenmesi ve bu peroksidaz enzimleri ile Remazol Blue renk giderimi arasında bir ilişkinin olup olmadığı, PAGE ile ayrıştırılmış olan proteinlerin zymogram olarak geliştirilmesi ile belirlenmiştir. Deriştirilen kültür sıvılarının PAGE yöntemi ile ayrıştırılması sağlandıktan sonra, substrat olarak L-DOPA'nın kullanıldığı zymogram analizinde ise *Streptomyces* sp. F0812 suşuna ait 3 ekstrasellüler peroksidaz izomeri belirlenirken, *Streptomyces* sp. Y1401 ve *Streptomyces* sp. IAUR8812 suşlarının ise 2'şer izoformu belirlenmiştir (bkz. Şekil 4.10a).

PAGE yöntemi ile ayrıştırılması sağlanan *Streptomyces* sp. suşlarına ait ekstrasellüler proteinleri içeren jelin substrat olarak Remazol Blue boyar maddesinin kullanıldığı zymogram analizinde ise *Streptomyces* sp. suşlarının hiç birisi de

aktivite göstermemiş olup, bu durum boyanın renk açılımının direk olarak peroksidaz enzimi ile ilişkili olmadığını göstermektedir. Sıvı kültürde gözlenen renk giderimi ise peroksidazla birlikte farklı enzimlerin işbirliği ile meydana gelmiş olabileceğini düşündürmektedir. Dolayısıyla meydana gelen renk giderimi, intraselüler enzimlerle veya bu enzimlerin de rol aldığı bir mekanizma ile gerçekleşmiş olabilir. Çünkü bakterilerin aerobik ya da yarı-aerobik ortamda azo-redüktaz enzimi ile renk gideriminin olduğu çalışmalar mevcuttur. Statik sıvı kültürler içerisinde gelişen *Streptomyces* sp. suşlarının oluşturduğu biyokütlenin renginde ise 10 günlük inkübasyon periyodu boyunca herhangi bir değişimin meydana gelmemiş olması ve büyüme kinetiğinin ölüm fazını içeren süre boyunca hücre lizisi sonucunda ortamdaki renk yoğunluğunda bir artışın olmaması nedeniyle, renk gideriminin absorpsiyon ya da adsorpsiyon yoluyla olmadığını göstermektedir. Dolayısıyla *Streptomyces* sp. suşları tarafından gerçekleştirilmiş olan renk gideriminin mekanizmasının biyosorpsiyon olmadığı görülmektedir. Oysaki Remazol Blue içeren katı kültürlerde gelişen *Streptomyces* sp. suşlarının bu boyayı biyosorpsiyon yoluyla ortamdaki biyokütlelerinde biriktirdikleri görülmüştür.

Renk giderimi çalışmasında ksilan ve karbon kaynaklarının kullanılması renk giderimini arttırmıştır. Bu durum karbon kaynağının artması ile renk giderimini arttığını göstermektedir. Ülkemizde gelirlerin büyük bir kısmının tarım ürünlerinden sağlanması, tarımsal üretim sonucu toplanıp yakılan atıklar zehirli gazların atmosfere salınmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle tarımsal bitki atıkları yenilenebilir enerji kaynakları olarak kullanılması gerekmektedir. Çalışmamızda kullandığımız buğday samanı tekstil boyası renk giderimini arttırmış olduğu gözlenmiştir, bu nedenle lignoselülozik yapıya sahip bitki atıklarının bu şekilde değerlendirilmesi söz konusu olabilir.

Boyar maddelerin biyolojik parçalanmasında en çok çalışılan mikroorganizmalar; bakteriler, aktinomisetler ve funguslardır. Fungusların üremesi için gereken pH aralığı, üreme zamanı gibi etkenler bu organizmaların kullanılmasındaki dezavantajlardır. Bunun yanı sıra boyaların degradasyonunu gerçekleştiren enzim ve enzim sistemlerinin aktinomisetler tarafından birincil metabolizma sonucunda oluşturulması ve bu mikroorganizmaların genellikle alkali

ortamlarda optimal olarak büyüebilmeleri bir avantaj oluşturmaktadır. Dolayısıyla aktinomisetlerle tekstil sanayi atıklarından renk giderimi ve boyaların parçalanmasında rol alan enzimlerin optimum olarak üretilmesi için gerekli olan çevresel koşulların araştırılarak, daha verimli proseslerin geliştirilmesi için çalışmalar yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

- [1] APHA,. “Standart Methods for Examination of Water and Wastewater”, American Public Assoc. ,16th Ed., Washington D.C. (1985).
- [2] Fu, Y. and Viraraghavan, T. “Fungal Decolorization of Dye Wastewaters: a Review”, Bioresource Technol., **79**: 251-262, (2001).
- [3] Wong, P.K. and Yuen, P.Y. "Decolorization and Biodegradation of Methyl Red by *Klebsiella pneumoniae* RS-13", Water Res., **30**: 1736-1744, (1996).
- [4] Seventekin, N. “Boyar Madde Kimyasına Giriş”, Bornova-İzmir, (1988).
- [5] Anliker, R. “Ecotoxicology of dyestuff-a joint effort by industry.”, Ecotoxicol. Saf., **3**: 59-74, (1979).
- [6] Brown, D., Hitz, H.R. and Schafer, L. “The assessment of the possible inhibitory effect of dyestuff on aerobic wastewater Bacteria: experience with a screening test.”, Chemosphere, **10**: 215-261, (1981).
- [7] Meyer, U. “Biodegradation of synthetic organic colorants.”, FEMS Symp. **12**: 371-385, (1981)
- [8] Talarposhti A.M., Donnelly T.,Anderson G.K., "Colour removal from a simulated dye wastewater using a two-phase anaerobic packed bed reactor ", Wat. Res. **35**: 425-432, (2001).
- [9] Uzal N.,Yılmaz L.,Yetiş Ü., "İndigo boyama atıklarının ön arıtımı: Kimyasal çöktürme ve ön filtrasyon süreçlerinin karşılaştırması", 6. Ulusal Çevre Müh. Kongresi, Kasım, 429-437, (2005).
- [10] Sponza D., Işık M., Atalay H., "İndigo boyar maddelerinin anaerobik arıtılabilirliklerinin incelenmesi", DEÜ Mühendislik Fakültesi Fen Mühendislik Dergisi, **2**: (3), 23-34 Ekim (2000).
- [11] Şen S.,Demirer G.N., "Anaerobic treatment of real textile wastewater with a fluidized bedreactor", Water Research, **37**: 1868–1878, (2003).
- [12] Doğan EE, Yeşilada E, Özata L, Yologlu S “Genotoxicity testing of four textile dyes in two crosses of *Drosophila* using wing somatic mutation and recombination test” Drug and Chem Toxicol **28(3)**: 289-301, (2005)
- [13] Zollinger, H. “Color Chemistry”, VCH, Weinheim, Germany, 496 s., (1991).

- [14] Baser, İ. ve İnanıcı, Y. “Boyarmadde Kimyası”, Marmara Üniversitesi, Teknik Eğitim Fakültesi Yayın Yayın No: 482, 262 s, İstanbul. (1990).
- [15] Kurbanova, R., Mirzaoğlu, R., Ahmedova, G., Şeker, R. ve Özcan, E., “Boya ve Tekstil Kimyası ve Teknolojisi”, 1. Baskı, Konya. (1998).
- [16] Tatlı, A. “Çesitli tekstil boyarmaddelerinin adsorbdiyon/biyosorbisyonunun karşılaştırılmalı olarak incelenmesi” Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, (2003).
- [17] Başer, İ ve İnanıcı, Y. “Boyarmadde Kimyası”, Marmara Üniversitesi Yayınları, 1. Baskı, 217s, İstanbul, (1990).
- [18] <http://ansiklopedi.turkcebilgi.com/Boyarmaddeler>
- [19] Shore, J., “Blends Dyeing” Society Of Dyers And Colourists Publication. Manchester-UK, 236 p. (1998)
- [20] McCarthy, A.J. “Lignocellulose Degrading Actinomycetes”, FEMS Microbiol. Rev., **46**: 145-163, (1987).
- [21] Horne, C.M., “A Review Of Vat Dyeing On Cotton Yarns, Textile Chemist And Colorist”, **27**:12 27-32. (1995).
- [22] Özcan, Y. “Tekstil Elyaf ve Boyama Tekniği”, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 600 s. (1978).
- [23] Aspland, J.R., “Chapter 13: Dyeing Blends: Polyester/Cellulose”, American Dyestuff Reporter, **25**:8 21-26 (1993).
- [24] Hunger, K., “Industrial Dyes”, Wiley-VCH, Weinheim”, 660 p (2003),.
- [25] DENG KİMYA ve TEKSTİL, (2001). <http://www.dengekimya.com/>
- [26] Bozok, N “Vinilsülfon ve Flor Grubu İçeren Reaktif Boyar Madde Sentezi ve Metal Kompleksleri”, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üni. Fen Bil. Enst. Adana,(2005).
- [27] Kanık, M., “Pamuklu Mamüllerin Reaktif Boyarmaddeler İle Boyanmasında Kullanılan Yarı Kontinü Boyama yöntemlerinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üni. Fen Bil. Enst. Bursa, (1988).
- [28] Kurbus, T., Marechal, A.M.L., and Voncina, D.B., “Comparison of H₂O₂/UV, H₂O₂/O₃ and H₂O₂/Fe²⁺ processes for the decolorisation of vinylsulphone reactive dyes”, Dyes and Pigments **58**: 245–252, (2003).

- [29] Filipkowska, U., Klimiuk, E., Grabowski, S., and Siedlecka, E., “Adsorption of Reactive Dyes by Modified Chitin from Aqueous Solutions”, Polish Journal of Environmental Studies **11**: (4) 315-323, (2002).
- [30] Özcan Y. “Tekstil Elyaf ve Boyama Tekniği” İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, s.597, (1984).
- [31] Yakartepe, M., Yyakartepe Z., “T.K.A.M. Tekstil Ansiklopedisi, Tekstil ve Konfeksiyon Araştırma Merkezi Yayını”, İstanbul, 5-6: 2158s. (1998).
- [32] İçoğlu, H.İ., “Pamuklu Dokunmuş Kumaşların Reaktif Boyarmaddelerle ve Uygulama Yöntemlerinin İncelenmesi”, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalı, Adana, (2006).
- [33] Anonim,. www.hohenstein.de/for3htm. Eko-Tex 100 Grenzwerte, 2002b
- [34] Kurtoğlu, N., ve Şenol, D., “Tekstil ve Ekolojiye Genel Bakış, Karsinojen ve Alerjik Etki Yapabilen Tekstil Kimyasalları”, KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi **7**: 26-31 (2004).
- [35] Ames, B., F. Lee, and W. Durston. “An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens”. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **70**: 782-786, (1973).
- [36] Bayraktar, T., İTKİB, Genel Sekreterliği, İTKİB AR&GE ve Mevzuat Şubesi, (2005)
- [37] Tezer, S., “Tekstil endüstrisi atıksularında yer alan reaktif boyaların biyosorbsiyonunun incelenmesi”. , Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Ankara, (2002).
- [38] Correia, V.M., Stephonson, T. and Judd, S.J. “Characterisation of Textile Wastewaters-A Review, Environmental Technology”, **15**: 917-929, (1994).
- [39] Kocaer, F.O., ve Alkan, U., “Boyar Madde İçeren Tekstil atıksularının Arıtım Alternatifleri”, Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi, **7**: (1), 47-55, (2002).
- [40] Kang, S.F. and Chang, H.M “Coagulation of Textile Secondary Effluents With Fenton’s Reagent, Water Science and Technology”, **36**: (12) 215-222, (1997)
- [41] Sewekow, U. “Treatment of Reactive Dye Effluents with Hydrogen Peroxide/Iron(II) Sulphate, Mellian Textilberichte”, **74**: 153-156, (1993).

- [42] Robinson, T. McMullan, G. Marchant, R. and Nigam, P. "Remediation of Dyes in Textile Effluent: A Critical Review on Current Treatment Technologies With a Proposed Alternative, Bioresource Technology", **77:**, 247-255, (2001).
- [43] Xu, Y. and Lebrun, R.E. "Treatment of Textile Dye Plant Effluent by Nanofiltration Membrane", *Separ. Sci. Technol.* **34:** 2501-2519, (1999).
- [44] Peralto-Zamora, P., Kunz, A., Gomez de Morales, S., Pelegrini, R., Capos M.P., Reyes, J. and Duran, N. "Degradation of Reactive Dyes I. A Comparative Study of Ozonation, Enzymatic and Photochemical Processes", *Chemosphere*, **38:** 835-852, (1999).
- [45] Ince, N.H. and Gonenç, D.T. "Treatability of a Textile Azo Dye by UV/H₂O₂", *Environ. Technol.*, **18:** 179-185, (1997).
- [46] Ölmez, T., Kabdaslı, I. ve Tünay, O., "Tekstil Endüstrisi Reaktif Boya Banyolarında Ozon ile Renk Giderimine Etki Eden Faktörlerin Belirlenmesi". *SKKD*, **13:**(1), 19-24, (2003).
- [47] Slokar, Y.M. and Le Marechal, A.M. "Methods of Decoloration of Textil Wastewaters", *Dyes Pigments*, **37:** 335-356, (1997).
- [48] Yang, Y., Wyatt, D.T. and Bahorsky, M. "Decolorization of Dyes Using UV/H₂O₂ Photochemical Oxidation", *Text. Chem. Color.*, **30:** 27-35, (1998).
- [49] Tünay, O., Kabdaslı, I., Eremektar, G. and Orhon, D. "Color Removal From Textile Wastewaters", *Water Sci. Technol.*, **34:** (11) 9-16, (1996).
- [50] Misra, G. and Tripathy, M. "A Critical Review of the Treatments for Decolourization of Textile Effluent", *Colourage*, **40:** 35-38, (1993).
- [51] Machenbach, I, "Membrane Technology for Dyehouse Effluent Treatment, Membrane Technology", **96:** 7-11. (1998).
- [52] Lopez, C., Mielgo, I., Moreira, M.T., Feijoo, G. and Lema J.M. "Enzymatic Membrane Reactors for Biodegradation of Recalcitrant Compounds. Application to Dye Decolourisation", *J. Biotechnol.*, **99:** 249-257, (2002).
- [53] Ckhakraborty, S., Purkait, M.K., DasGupta, S., De, S. and Basu, J.K. "Nanofiltration of Textile Plant Effluent for Color Removal and Reduction in COD", *Separat. and Purific. Tech.*, **31:** 141-151, (2003).
- [54] Hosono, M., Arai, M., Yamamoto, I., Shimizu, K. and Sugiyama, M. "Decoloration and Degradation of Azo Dye in Aqueous Solution of Super

- Saturated with Oxygen by Irradiation of High-Energy Electron Beams”, *Appl. Radiat. Isotopes*, **44**: 1199-1203, (1993).
- [55] Willmott, N., Guthrie, J. and Nelson, G. “The Biotechnology Approach to Colour Removal from Textile Effluent, *Journal of the Society of Dyers and Colorists*”, **114**: 38-41, (1998).
- [56] Oneill, C., Hawkws, F. R., Hawkws, D. L., Esteves, S. and Wilcox, S. J., “Anaerobic-Aerobic Biotreatment of Simulated Textile Effluent Containing Varied Ratios of Starch and Azo Dye”, *Water Research*, **34**: (8) 2355-2361. (2000a).
- [57] Palma, C. Moreira, M.T. Mielgo, I. Feijoo, G. and Lema, J. M. “Use of Fungal Bioreactor As a Pretreatment or Post Treatment Step For Continuous Decolorisation of Dyes”, *Water Science and Technology*, **40**: (8), 131-136, (1999).
- [58] Oneill, C., Lopez, A., Esteves, S., Hawkes, F. R., Hawkes, D.L. and Wilcox, S. “Azo Dye Degredation in an Anaerobic-Aerobic Treatment System Operating on Simulated Textile Effluent”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **53**: 249-254, (2000b).
- [59] Işık, M., ve Sponza, D.T., “Simüle Tekstil Atıksuyunun Anaerobik/Aerobik Arıtımı”, *Ekoloji Dergisi*, **14**: 53, 1-8 (2004).
- [60] Anjaneyulu, Y., Chary, N.S., and Raj, D.S.S.,” Decolourization of industrial effluents – available methods and emerging technologies a review”, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* **4**: 245–273, (2005).
- [61] Michael FC Jr, Dass SB, Grulke EA and Reddy CA “Role of Mn Peroxidase and lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* in the decolourization of Kraft bleaching plant effluent”. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2368–2375, (1991).
- [62] Christov LP, Driessel VB and Plessis CAB “Fungal biomass from *Rhizomucor pusillus* as adsorbent of chromosphere from a bleach plant effluent”. *Proc. Biochem.* **35**: 91–95 (1999).
- [63] Aretxaga A, Romero S, Sarra M and Vincent T “Adsorption step in the biological degradation of textile dye”. *Biotech. Prog.* **17**: 664–668 (2001).
- [64] Yesilada O, Cing S and Asma D “Decolorization of the textile dye Astiazon Red FBL by *Funalia trogii* pellets”. *Biores. Technol.* **81**: 155–157, (2002).

- [65] Selvam K, Swaminathan K and Chae KS “Decolourization of azo dyes and a dye industry effluent by a white rot fungus *Thelephora* sp.”, *Biores. Technol.* **88**: 115–119, (2003).
- [66] Manu B., Chaudhari S., "Anaerobic decolorisation of simulated textile wastewater containing azo dyes", *Bioresource Technology*, **82**: 225-231, (2002).
- [67] Kapdan İ.K., ve Alparslan S. "Tekstil endüstrisi atıksularından anaerobik-aerobik ardışık reaktör sisteminde KOI ve renk giderimi", *ÇEVRE 2004 I. Ulusal Çevre Kongresi Cumhuriyet Üniversitesi, Ekim*, 217-223. (2004).
- [68] Kaykıoğlu, G., ve Debik, E., “Anaerobik Arıtım Prosesleri ile Tekstil atıksularından Renk Giderimi”, *Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, **4**:59-68, (2006).
- [69] El-Rahim, W.M.A “Assessment of textile dye remediation using biotic and abiotic agents”, *J. Basic Microbiol.* **46**: (4) 318–328, (2006).
- [70] Demir, G. Özcan, H.K., Elmaslar, E., ve Borat, M. “Bir Beyaz Çürükçül Mantar Türü Olan *Phanerochaete chrysosporium* ile azo boyar maddelerinde renk giderimi”, *Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, **3**: 74-85(2006).
- [71] Supaka, N., Juntongjin, K., Damronglerd, S., Delia, M.L., and Strehaiano, P., “Microbial decolorization of reactive azo dyes in a sequential anaerobic–aerobic system”, *Chemical Engineering Journal* **99**: 169–176. (2004).
- [72] Lec EGH, Muller JC and Walden CC “Decolorization of bleached Kraft mill effluent by algae”. *TAPPI* **61**: 7–59 (1978).
- [73] Jinqi L. and Houtian L., “Degradation of azo dyes by algae”. *Environ. Pollut.* **75**: 273–278 (1992)
- [74] Banat ME, Nigam P, Singh D ve Marchant R “Microbial decolorization of textile dye containing effluents, a review”. *Biores. Technol.* **58**: 217–227, (1996).
- [75] Wasniewska, K. “Biodegradation of Crystal Violet (hexamethyl-*p*-rosaniline chloride) by oxidative red yeast.”, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **34**: 323-330, (1985)
- [76] Horistsu H, Takada M, Idaka E, Tomoyda M and Ogewa T “Degradation of P-amino azo benzene by *Bacillus subtilis*”. *Eur. J. Appl. Microbiol.* **4**: 217–224, (1977)

- [77] Idaka E and Ogewa Y “Degradation of azo compounds by *Aeromonas hydrophilia* var. 2413”, J. Soc. Dye. Colorist. **94**: 91–94, (1978).
- [78] Wuhrmann K., Mechsner K. and Zkappeler T. “Investigation on rate determining factors in the microbial reduction of azo dyes”. Environ. J. Appl. Microbiol. **9**: 325–338, (1980).
- [79] Nagarathnamma R, Bajpai P and Bajpai KP “Studies on decolorization and detoxification of chlorinated lignin compounds in Kraft bleaching effluent by *Ceripriopsis Subvermisporre*”. Proc. Biochem. **334**: 939–948, (1999).
- [80] Mali PL, Mahajan MM, Patil DP and Kulkarni MV “Biodecolorists of members of Triphenyl methane and azo group of dyes”. J. Sci. Ind. Res. **59**: 221–224, (2000)
- [81] Isik M and Sponza DT “Effect of oxygen on decolorization of azo dyes by *E. coli* and *Pseudomonas* sp. and fate of aromatic amines”, Proc. Bioch. **38**: (8) 1183–1192, (2003).
- [82] Chen KC.,Huang WT.,Wu JY.,and Houng JY., "Microbial decolorization of azo dyes by *Proteus mirabilis*", J Ind Microbiol Biotechnol., **23**: (1), 686-690, (1999).
- [83] Sani RK.,and Banerjee UC., "Decolorization of triphenylmethane dyes and textile and dyestuff effluent by *Kurthia* sp. ", Enzyme Microb Technol., **24**: 433-437, (1999).
- [84] Çetin D. ve Donmez G., "Decolorization of reactive dyes by mixed cultures isolated from textile effluent under anaerobic conditions", Enzyme and Microbial Technology, **38**:(7), 926-930, (2006).
- [85] Br´as, R., Gomes, A., Ferra, M.I.A., Pinheirob, H.M., and Gonçalves, I.C., “Monoazo and diazo dye decolourisation studies in a methanogenic UASB reactor”, Journal of Biotechnology **115**: 57–66, (2005).
- [86] Kapdan İ.K. and Oztekin R., "Decolorization of textile dyestuff Reactive Orange 16 in fedbatch reactor under anaerobic condition", Enzyme and Microbial Technology, **33**: 231– 235, (2003).
- [87] Işık M., "Efficiency of simulated textile wastewater decolorization process based on the methanogenic activity of upflow anaerobic sludge blanket reactor in salt inhibition condition", Enzyme and Microbial Technology, **35**: 399–404, (2004).

- [88] Panswad T., Luangdilok W., "Decolorization of reactive dyes with different molecular structures under different environmental conditions", *Wat. Res.*, **34**: (17) 4177- 4184 (2000).
- [89] Ertugrul, S., Bakır, M., and Dönmez, G., "Treatment of dye-rich wastewater by an immobilized thermophilic cyanobacterial strain: *Phormidium* sp". *ecological engineering* **32**: 244–248. (2008).
- [90] Khehra, M.S., Saini, H.S., Sharma, D.K., Chadha, B.S., and Chimni, S.S., "Biodegradation of azo dye C.I. Acid Red 88 by an anaerobic sequential bioreactor" *Dyes and Pigments* **70**: 1-7. (2006).
- [91] Crawford, D.L. "Biodegradation of agricultural and urban wastes", p.433-459. In M. Goodfellow, S.T. Williams, and M. Mordanski (ed.), "Actinomycetes in biotechnology", Academic Press, Inc. , San Diego, (1988)
- [92] Sariaslami, F., Traver M.K. and Buchholz, S.E. "Xenobiotic transformations by *Streptomyces griseus*.", *Dev. Int. Microbiol.*, **30**: 161-171, (1989).
- [93] Black S.D. "P-450 cytochromes: structure and function", p.35-87. In P.R. Ortiz de Montellano (ed.), "Cytochrome P-450: structure, mechanism, and biochemistry", Plenum Press, New York, (1986).
- [94] Fogarty, A.M. and Tuovinen, O.H. "Microbial degradation of pesticides in yard waste composting.", *Microbiol. Rev.*, **55**: 225-233, (1991)
- [95] Goszcznski, S., Paszcznski, A., Pasti-Grigsby, M.B., Crawford, R.L., and Crawford, D.L. "New pathway for degradation of sulfonated azo dyes by microbial peroxidases of by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*." *J. Bacteriol.*, **176**:1339-1347, (1994).
- [96] McCarthy, A.J. and Williams, S.T. "Methods for studying the ecology of actinomycetes", *Methods in Microbiology*, **22**: 533-563, (1990).
- [97] Ball, A.S., Betts, W.B. and McCarthy, A.J. "Degradation of lignin-related compounds by actinomycetes", *Appl Environ Microbiol.*, **55**: 1642-1644, (1989).
- [98] Zhou, W., Zimmermann, W. "Decolorization of industrial effluents containing reactive dyes by actinomycetes." *FEMS Microbiol Lett.*, **107**: 157-162, (1993)
- [99] Pasti, M. B., and D. L. Crawford. "Relationships between the abilities of streptomycetes to decolorize three anthron-type dyes and to degrade lignocellulose", *Can. J. Microbiol.* **37**:902-907, (1991).

- [100] Burke, N.S., and Crawford, D.L. "Use of azo dye ligand chromatography for the partial purification of a novel extracellular peroxidase from *Streptomyces viridosporus* T7A." *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **49**: 523-530, (1998).
- [101] Manguson, T.S. "Biochemical and genetic studies on the ligninocellulose degradation system of *Streptomyces viridosporus* T7A" Ph.D. Thesis, University of Idaho, (1996).
- [102] Ramachandran, S., Manguson, T.S., and Crawford, D.L. "Isolation and analysis of three peroxidase sensor regulatory gene homologs *ahpC* and *oxyR* in *Streptomyces viridosporus* T7A- a lignocellulose degrading actinomycete." *DNA Sequence*, **11**: 51-60, (2000).
- [103] Ball, A.S. and Colton, J. "Decolorization of the polymeric dye Poly R by *Streptomyces viridosporus* T7A", *J.Basic Microbiol.* **36**: 13-18, (1996).
- [104] Shin KS. and Kim CJ., "Decolorization of artificial dyes by peroxidase from the white-rot fungus, *Pleurotus ostreatus*", *Biotechnol. Lett.* **20**: 569–572. (1998).
- [105] Bhunia A, Durani S and Wangikar P "Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes". *Biotechnol. Bioeng.* **72**: 562–567, (2002).
- [106] Yang Q, Yang M, Pritsch K, Yediler A, Hagn A, Achloter M and Kettrup A Decolorization of synthetic dyes and production of manganese-dependent peroxidase by new fungal isolates. *Biotechnol. Lett.* **25**: 709–713 (2003).
- [107] Ollikka P, Alhonmäki K, Leppänen VM, Glumoff T, Rajola and T, Suominen I. "Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*", *Appl Environ Microbiol* **59**: 4010–4016, (1993).
- [108] Heinfling A, Martinez MJ, Martinez AT, Bergbauer M, and Szewczyk U. "Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction", *Appl Environ Microbiol*; **64**:2788– 2793, (1998).
- [109] Soares GMB, de Amorim MTP. And Costa-Ferreira M., "Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue" *R. J Biotechnol*; **89**:123– 129. (2001).
- [110] Young H and Yu J "Ligninase catalyzed decolorization of synthetic dyes", *Water Res.* **31(5)**: 1187–1193, (1997).

- [111] Glenn, J.K., Morgan, M.A., Mayfield, M.B., Kuwahara, M. and Gold, M.H. "An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **114**: 1077-1083, (1983).
- [112] Tien, M. and Kirk, T.K. "Lignin-degrading enzyme from hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium*.", *Burds. Science*, **221**: 661-663, (1983).
- [113] Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A. and Gold, M.H. "Seperation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*.", *FEBS Lett.*, **169**: 247-250, (1984).
- [114] Glenn, J.K., Akileswaran, L. and Gold, M.H. "Mn(II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*", *Arch. Biochem. Biophys.*, **251**: 688-696, (1986).
- [115] Paszczyński, A. and Crawford, R.L. "Degradation of azo compounds by ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*.", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **178**: 1056-1063, (1991).
- [116] Yarapolov, A.I., Skorobogatko, O.V., Vartanov, S.S. and Varfolomeyev, S.D. "Laccase properties, catalytic mechanism and applicability.", *Appl. Biochem. and Biotechnol.*, **49**: 257-279, (1994).
- [117] Thurston, C. F. "The structure and function of fungal laccase.", *Microbiology*, **140**: 19-26, (1994)
- [118] Bourbonnais, R. and Paice, M.G. "Oxidative enzymes from the lignin-degrading fungus *Pleurotus sajorcaju*.", In Plant Cell IVall Polymers Biogenesis and Biodegradatwn (ed). Lewis, N.G. and Paice, M.G. pp. 473-481 Washington, DC: American Chemical Series, (1989).
- [119] Gold, M.H. and Alic, M. "Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*.", *Microbiology Reviews*, **57**: 605-622, (1993).
- [120] Bollag, J.M., Shuttlevorth, K.L. and Anderson, D.H. "Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds", *Applied and Environmental Microbiology*, **54**: 3086-3091, (1988).
- [121] Roy-Arcand, L. and Archibald, F.S. "Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccases from *Trametes (Coriolus) versicolor*", *Enzyme Microbiology and Technology*, **13**: 194-203, (1991).

- [122] Bhunia, A., Durani, S., Wangikar, P.P., “Horseradish Peroxidase Catalyzed Degradation of Industrially Important Dyes” *Biotechnology and Bioengineering*, **72**:(5), 562-567,(2001).
- [123] Martin Susla,M., and Svobodova, K., “Effect of various synthetic dyes on the production of manganese dependent peroxidase isoenzymes by immobilized *Irpex lacteus*”, *World J Microbiol Biotechnol* **24**: 225–230, (2008).
- [124] Champagne, P.P.,and Ramsay, J.A., “Contribution of manganese peroxidase and laccase to dye decoloration by *Trametes versicolor*”, *Appl Microbiol Biotechnol* **69**: 276–285, (2005).
- [125] Couto, S. R., “Laccase from *Trametes hirsuta* Grown on Paper Cuttings: Application to Synthetic Dye Decolorization at Different pH Values” *Eng. Life Sci.*, **7**:(3), 229–234, (2007).
- [126] Palmieri, G. Cennamo, and G. Sannia, “Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system”, *Enzyme Microb. Technol.*, **36**: 17–24. (2005).
- [127] Zouari-Mechichi, H., Mechichi, T.,Dhouib, A., Sayadi, S., and Martínez, A.T., Martínez, M. J., “Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme,” *Enzyme Microb. Technol.*, **39**: 141–148 (2006).
- [128] Hatvani, N., and Me’cs, I., “Effect of the nutrient composition on dye decolorisation and extracellular enzyme production by *Lentinus edodes* on solid medium” *Enzyme and Microbial Technology* **30**: 381–386, (2002).
- [129] Niladevi, K.N., Prema, P., “Effect of inducers and process parameters on laccase production by *Streptomyces psammoticus* and its application in dye decolourization” *Bioresource Technology*, **99**: (11), 4583-4589, (2008).
- [130] Penninckx, M. and Kurzatkowski, W. “Purification and characterization of exocellular xylanases from *Streptomyces*”, Commission of EU, Copernicus no: ERBCIPACT930093, (1996).
- [131] Jones, K.L. “Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic”, *Journal of Bacteriology*, **57**:141-146, (1949).
- [132] Küster, E. “Outline of a comparative study of criteria used in characterization of the actinomycetes”, *Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon*, **9**:97-104, (1959).

- [133] Bradford, M.M. “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding”, *Anal. Biochem.*, **72**:248-254. (1976).
- [134] Ramachandra, M., Crawford, D.L., and Pometto III., A.L. “Extracellular enzyme activities during lignocellulose degradation by *Streptomyces* spp.: A comparative study of wild-type and genetically manipulated strains”, *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**: 2754-2760, (1987).
- [135] Hames, B.D. “One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis”.. Hames, B.D. and Rickwood, D. (Eds). Gel electrophoresis of proteins. A practical approach. IRL Press. Oxford, New York, Tokyo. pp. 1-148. (1990).
- [136] Iqbal, M., Mercer, D. K., Miller, P.G.G. and McCarthy A.J. “Thermostable extracellular peroxidases from *Streptomyces thermoviolaceus*”, *Microbiology*, **140**: 1457-1465, (1994).
- [137] Biely, P. “Microbial xylanolytic systems”, *Trends in Biotechnol.*, **3**: (11) 286-290, (1985).
- [138] Kalyani, D.C. Patil, P.S. Jadhav, J.P. and Govindwar, S.P. “Biodegradation of reactive textile dye Red BLI by an isolated bacterium *Pseudomonas* sp. SUK1”, *Bioresource Technology* **99**: 4635–4641, (2008).
- [139] Pearce, C.I., Lloyd, J.R., and Guthrie, J.T., “The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review”, *Dyes and Pigments* **58**: 179–196, (2003).
- [140] Horitsu H, Takada M, Idaka E, Tomoyeda M, and Ogawa T. “Degradation of *p*-aminoazobenzene by *Bacillus subtilis*”.*European Journal of Applied Microbiology*; **4**:217–24, (1977).
- [141] Idaka E, Ogawa T, Horitsu H, and Tomoyeda M. “Degradation of azo compounds by *Aeromonas hydrophilia* var. 24B”, *Journal of the Society of Dyers and Colourists*: **9**: 1–4, (1978).
- [142] Kamilaki A., “The removal of reactive dyes from textile effluents -a bioreactor approach employing whole bacterial cells”. PhD thesis, UK: University of Leeds; (2000).
- [143] Abd El Rahim, W.M., “Assessment of textile dye remediation using biotic and abiotic agents”, *J. Basic Microbiol.* **46**: 4, 318–328, (2006).
- [144] Al-Duri, B., Mckay, G., El-Geundi, M.S. and Wahab, M.Z.A., Three-resistance transport model for dye adsorption onto bagasse pith. *J.*

- Environmental Engineering, **116**: 487–502, (1990).
- [145] El-Geundi, M.S., “Color removal from textile effluents by adsorption techniques”, *Water Res.*, **25**: 271–273, (1991).
- [146] Wakamatsu, K. and Takahama, U., “Changes in peroxidase activity and in peroxidase isozymes in carrot callus”. *Physiol. Plant.* **88**: 167–171, (1993).
- [147] Biles CL and Martin RD “Peroxidase, polyphenoloxidase, and shikimate dehydrogenase isozymes in relation to the tissue type, maturity and pathogen induction of watermelon seedlings”. *Plant Physiol. Biochem.* **31**: 499–506, (1993).
- [148] Welinder KG., “Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidase”. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**: 388–393, (1992).
- [149] Stolz, A. “Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes”, *Appl Microbiol Biotechnol* **56**: 69–80, (2001).
- [150] Yesiladali S., , Pekin, K. Bermek, G., Arslan-Alaton, H., Orhon, İ., and Tamerler, C., “Bioremediation of textile azo dyes by *Trichophyton rubrum* LSK-27”, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **22**:1027–1031, (2006).
- [151] Sun, X., Zhang, R., and Zhang, Y., “Production of lignocellulolytic enzymes by *Trametes gallica* and detection of polysaccharide hydrolase and laccase activities in polyacrylamide gels”, *J. Basic Microbiol.* **44**: (3), 220–231, (2004).
- [152] Tatsumi K, Wada S and Ichikawa H “Removal of chlorophenols from wastewater by immobilized horseradish peroxidase”, *Biotechnol. Bioeng.* **51**: 126–130, (1996).
- [153] Bhunia A, Durani S, and Wangikar PP. “Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes”, *Environment International* **30**: 953–971, (2004).
- [154] Paszczynski A, Pasti-Grigsby MB, Goszczynski S, Crawford RL. and Crawford DL., “Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*”. *Appl Environ Microbiol* **58**: 3598–3604,(1992).
- [155] Rafii F., and Coleman T., “Cloning and expression in *Escherichia coli* of an azoreductase gene from *Clostridium perfringens* and comparison with azoreductase genes from other bacteria”. *J Basic Microbiol*; **39**: 29–36,

(1999).

- [156] Suzuki Y, Yoda T, Ruhul A, Sugiura W. “Molecular cloning and characterization of the gene coding azoreductase from *Bacillus* sp. OY1-2 isolated from soil”., J Biol Chem; **276**: 9059– 9065, (2001).
- [157] Hu TL., “Decolourization of reactive azo dyes by transformation with *Pseudomonas luteola*”. Bioresour Technol **49**: 47 –51, (1994).
- [158] Haudenschild C, Schalk M, Karp F, and Croteau R. “Functional expression of regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from mint (*Mentha* spp.) in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*”, Arch Biochem Biophys **379**: 127–136, (2000).
- [159] Morawski B, Quan S, and Arnold FH.” Functional expression and stabilization of horseradish peroxidase by directed evolution in *Saccharomyces cerevisiae*”. Biotechnol Bioeng;**76**: 99– 107, (2001).
- [160] Chivukula M, Renganathan V., ”Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*”. Appl Environ Microbiol **61**: 4374–4377,(1995).
- [161] Fernanda, M. Munari, A. Tamara, A. Gaio A. Calloni R. and Dillon, A J. P. “Decolorization of textile dyes by enzymatic extract and submerged, cultures of *Pleurotus sajor-caju*”, World J Microbiol Biotechnol **28**: 1-10 (2007).
- [162] Vares T, Kalsi M, Hatakka A “Lignin peroxidases, manganese peroxidases, and other ligninolytic enzymes produced by *Phlebia radiata* during solid-state fermentation of wheat straw.” Appl Environ Microbiol **61**: 3515–3520, (1995).

ÖZGEÇMİŞ

27.09.1981 yılında Mersin’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Mersin’de tamamladı. 1999 yılında Dumlupınar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden, 2005 yılında mezun oldu. 2005 yılında Mersin Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde yüksek lisansa başladı.