

**BİR TEKSTİL BOYASI OLAN POLY R-478'İN
STREPTOMİSETLER İLE RENK GİDERİMİ**

İREM EKİNCİ

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MERSİN

ŞUBAT – 2007

**BİR TEKSTİL BOYASI OLAN POLY R-478'İN
STREPTOMİSETLER İLE RENK GİDERİMİ**

İREM EKİNCİ

**Mersin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü**

Biyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

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

**MERSİN
Şubat – 2007**

ÖZET

Bu çalışmada, lignoselülitik aktiviteleri bilinen, fakat tekstil boyalarının renklerinin giderilmesi konusundaki aktiviteleri henüz araştırılmamış olan; Türkiye'nin farklı bölgelerinden izole edilmiş ve tanımlaması yapılmış üç mezofilik *Streptomyces* 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 kültür pH'sının 7 ve 8 olduğu çevresel koşullarda gerçekleştirmiştir. En yüksek renk giderim aktivitesi ise *Streptomyces* sp. F2621 (%38) tarafından %0,6 (w/v) öğütülmüş buğday samanı içeren kültür ortamlarında belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan diğer iki suş olan *Streptomyces* sp. F3118 ve *Streptomyces* sp. F4880'in renk giderim aktiviteleri ise aynı kültür ortamında sırasıyla, %13 ve %15 olarak gerçekleşmiştir. *Streptomyces* suşları tarafından gerçekleştirilen renk giderim aktiviteleri ile paralel olarak üretmiş oldukları ekstrasellüler peroksidaz aktiviteleri ise bu suşların renk gideriminde rol alan enzimlerin, lignoselüloz degradasyonunda rol alan enzimlerle ilişkili olduğuna işaret etmektedir.

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

ABSTRACT

In this study, decolorisation activities of three mesophilic *Streptomyces* strains, which were isolated and identified from different regions in Turkey and lignocelulolytic activities has been studied previously, were investigated. All of these strains exhibited the greatest decoloriastion activities at the 4th-5th day of the incubation period. All of strains used in this study also exhibited the greatest decoloriastion activities at the pH of 7.0 and 8.0. The highest decolorisation activities (30%) were observed by *Streptomyces* sp. F2621, which were grown in the presence of %0.6 (w/v) ball-milled wheat straw as a supplementary carbon and energy source. The highest decoloriasation activities by *Streptomyces* sp. F3118 and *Streptomyces* sp. F4880 which were the other strains used in this study, were observed as 13% and 15%, respectively, in the same culture medium. Extracellular peroxidases which were produced by the strains used, were determined in the same profile with decolorisation activities of corresponding strains. These finding indicate that there may be a relationship between dye decolorisation activities and activities of these strains.

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

TEŐEKKÖR

Her anlamda desteğini her zaman yanımda hissettiğim aileme, 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 No:

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. RENK VE RENK TEORİLERİ	3
2.2. BOYA VE BOYAR MADDELER	6
2.2.1. Boyar Maddelerin Sınıflandırılması	6
2.2.1.1. Bazik boyar maddeler	7
2.2.1.2. Asit boyar maddeler	7
2.2.1.3. Direkt boyar maddeler	7
2.2.1.4. Mordan boyar maddeler	8
2.2.1.5. Reaktif boyar maddeler	8
2.2.1.6. Küp boyar maddeler	8
2.2.1.7. İnkişaf boyar maddeleri	10
2.2.1.8. Metal-kompleks boyar maddeleri	10
2.2.1.9. Dispersiyon boyar maddeler	10
2.2.1.10. Pigment boyar maddeler	10
2.3. TEKSTİL VE KONFEKSİYON SEKTÖRÜNDE EKOLOJİ	11
2.3.1. Üretim Ekolojisi	11
2.3.2. Atık Ekolojisi	11
2.3.3. İnsan Ekolojisi	12
2.3.3.1. Tekstil boyar maddelerinin ortaya çıkardığı problemler	12
2.3.3.2. Ağır metal iyonlarının insan sağlığına etkisi	15
2.3.4. AB'nin ve Türkiye'nin Ekolojik Tekstil Konusundaki Mevzuatı ...	16
2.3.4.1 . AB mevzuatı	16
2.3.4.2. Türkiye'deki mevzuat	17
2.4. BOYAR MADDELERİN MİKROBİYOLOJİK DEGRADASYONU ...	17

2.4.1. Boyar Maddelerin Bakterilerle Degredasyonu	18
2.4.2. Boyar Maddelerin Aktinomisetlerle Degredasyonu	20
2.4.3. Boyar Maddelerin Mayalarla Degredasyonu	23
2.4.4. Boyar Maddelerin Funguslarla Degredasyonu	24
2.5. BOYAR MADDELERİN DEKOLORİZASYONUNU GERÇEKLEŞTİREN ENZİMLER	25
2.6. BOYAR MADDELERİN DEKOLORİZASYONU İLE İLGİLİ YAPILAN ÇALIŞMALAR	27
3. MATERYAL ve METOT	32
3.1. MATERYAL	32
3.1.1. Kimyasallar	32
3.1.2. Çalışılan Mikrobiyal Suşlar	32
3.1.3. Cam Malzemeler	32
3.1.4. İnkübatörler	32
3.1.5. Santrifüjler	33
3.1.6. UV/Visible Spektrofotometre	33
3.2. METODLAR	33
3.2.1. <i>Streptomyces</i> Suşlarının Kültürü ve Muhafaza Edilmesi	33
3.2.2. Substratların Hazırlanması	35
3.2.3. İnokulumun Hazırlanması	35
3.2.4. Kültür Sıvısının Toplanması	35
3.2.5. Enzim Preparasyonları ve Ekstrasellüler Protein Miktar Tayini	36
3.2.6. Peroksidaz Aktivitesinin Tayini	37
3.2.7. İnkübasyon Süresinin Renk Giderimi Üzerine Etkisi	37
3.2.8. Kültür pH'sının Renk Giderimi Üzerine Olan Etkisi	38
3.2.9. Farklı Karbon Kaynaklarının Renk Giderimi Üzerine Olan Etkisi .	39
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	40
4.1. İnkübasyon Süresinin Renk Giderimi Üzerine Etkisi	40
4.2. Kültür pH'sının Renk Giderimi Üzerine Olan Etkisi	43
4.3. Farklı Karbon Kaynaklarının Renk Giderimi Üzerine Olan Etkisi.....	46
4.4. Renk Giderimi İle Ekstrasellüler Peroksidaz Üretimi Arasındaki İlişki ..	48
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	52
6. KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Kromofor ve oksokrom gruplar	5
Şekil 2.2. Kromojen, oksokrom boyarmaddeler	5
Şekil 2.3. Reaktif boyar maddeler	9
Şekil 2.4. Sülfoazo boyaların peroksidaz ile degreasyonunun önerilen mekanizması	23
Şekil 3.1. Protein standardı olarak kullanılan BSA'nın değişik konsantrasyonlarının Bradford metodu ile analizi sonucu elde edilen standart eğri.	36
Şekil 3.2. Polimerik bir boya olan Poly R-478'in (%0,004 w/v) görünür ışık bölgesindeki absorpsiyon taraması. İçte ise boyanın kimyasal yapısı verilmektedir	38
Şekil 4.1. <i>Streptomyces</i> sp. F2621, <i>Streptomyces</i> sp. F3118 ve <i>Streptomyces</i> sp. F4880 suşlarının 10 günlük inkübasyon süresince göstermiş oldukları renk giderim aktiviteleri	41
Şekil 4.2. Farklı pH koşulları altında 96 saatlik inkübasyon sonrası <i>Streptomyces</i> suşlarının sergiledikleri göreceli renk giderim aktiviteleri	45
Şekil 4.3. Farklı karbon kaynaklarının varlığında <i>Streptomyces</i> suşlarının göstermiş oldukları renk giderim aktiviteleri.	47
Şekil 4.4. Büyüme kinetiğine bağlı olarak 10 günlük inkübasyon süresince <i>Streptomyces</i> suşları tarafından üretilen peroksidaz aktivitelerinin zamana bağlı değişimi	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 2.1. <i>N. corallina</i> IAM 12121 tarafından trifenilmetan boyar maddelerin dekolorizasyonu	21
Çizelge 2.2. Çeşitli organizmalar tarafından kristal violetin dekolorizasyonu ...	31

1. GİRİŞ

Boyar maddelerinin özellikle tekstil sanayisinde kullanıldığı bilinmektedir. Tekstil ürünlerinin boyama banyolarından çıkan sular, tekstil fabrikası çıkış sularına verilmektedir. Renkli çıkış suyunun, boyama, baskı ve yıkama işlemlerinden kaynaklandığı, renk derecesinin ise boyar madde derişimine ve kullanılan boyar maddenin yapısına bağılı olduğu belirtilmiştir [1].

İlk sentetik boyar madde olan Muavine'nin 1856'da W.H. Perkin tarafından bulunmasından bu güne, özellikle İngiltere, Fransa, Almanya ve İsviçre başta olmak üzere bu sektör bir endüstri halini almıştır. Günümüzde üretilen boyar maddelerin 100 000 den fazla farklı yapıda olduğu, yıllık üretiminin yaklaşık 7×10^5 ton olduğu ve bu boyar maddelerin %10-15'i atık-su ile alıcı ortama deşarj edildiğı [2] göz önüne alındığında boyar madde içeren atık-suların arıtımının gerekliliğı ortaya çıkmaktadır.

Tekstil sanayinde kullanılan boyar maddelerin fabrika atıkları ile dış çevreye verilmesi, çeşitli sağlıksız koşulların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Özellikle boyalı fabrika suyunun direkt olarak verildiğı atık sular, renk, koku, görüntü yönünden doğal ortamı bozmakta, böylece ortamda bulunan doğal flora ve faunayı yok etmektedir. Çeşitli araştırmalar göstermiştir ki, boyar maddelerin en etkili ve sağlıklı arıtımı mikroorganizmalarla olmaktadır. Mikroorganizmalarla aerobik ve anaerobik koşullar altında boyar maddeler, renksiz aromatik amin formuna indirgenmektedir. Ancak bu indirgenme ürünleri bile insanlar ve hayvanlar üzerinde toksik, mutajenik ya da kanserojenik etki gösterebilmektedirler [3].

Tekstil ve boyama endüstrilerinde sentetik boyaların kullanımı, bu boyaların sentezinin kolay ve ucuz olmasının yanı sıra, oldukça dayanıklı ve doğal boyalarla karşılaştırıldığında renklerinin oldukça çeşitli olmaları nedeniyle giderek artmaktadır [4]. Boyar maddelerin kullanılabilirliğinin en önemli kriterleri, ışııkta ve yıkama esnasında kararlılığını yüksek oranda koruması ve mikrobiyal saldırıya karşı dirençli olmasıdır. Bu nedenle, boyar maddeler çoğunlukla tam olarak parçalanamazlar ve arıtma tesislerinde atık sudan tam olarak uzaklaştırılmazlar [5]. Bütün boyar maddeler toksik olmasa da [6, 7] çevre kirleticisi olarak tanımlanır.

Yaygın olarak kullanılan atık su arıtım sistemlerinin çıkış suyundaki renk şiddetinin yeterli düzeyde arıtılmadığı ve bununda alıcı su ortamında renk kirliliği ile sonuçlandığı kabul edilmektedir. Rengin atık sularda özellikle fark edilen kirletici olduğu ve alıcı ortamlara deşarj edilmeden önce giderilmesi gerektiği rapor edilmiştir [8].

Boyar maddelerin sudaki çok düşük derişimlerinde (1 ppm'den az) bile gözle görülebilir olduğu, alıcı ortamlarda görüntüyü bozdukları, suyun ışık geçirgenliği ve gazların çözünürlüklerini etkiledikleri rapor edilmiştir [9].

Çevreye verilen ve çevre kirleticileri olan boyar madde moleküllerinin yapılarına bağılı olarak, uygun mikroorganizma ve uygun ortam koşullarının belirlenmesi gerekmektedir. Uygun maliyet açısından, laboratuvar koşullarında, temel bilim düzeyinde araştırmaların yapılması ve uygun koşulların uygulamaya geçirilmesi gerekmektedir. Geniş miktarda yapısal olarak farklı birçok boyar madde, tekstil sanayinde olduğu kadar diğere sanayi alanlarında da kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, çevreye zararlı etkileri olan ve tekstil fabrikalarında yaygın olarak kullanılan fenolik yapıdaki Poly R-478 boyar maddesinin *Streptomyces* sp. F2621, *Streptomyces* sp. F3118 ve *Streptomyces* sp. F4880 suşları ile sıvı fazda renk giderimi karşılaştırmalı olarak araştırılmış, renk gideriminin optimal olduğu çevresel koşullar belirlenerek, renk giderimi ile lignin deşredasyonunda rol alan peroksidaz enzimlerinin üretimi arasında bir korelasyonun olup olmadığı incelenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. RENK VE RENK TEORİLERİ

Renk, ışığa bağlı bir kavramdır. Işığın olmadığı karanlık bir yerde cisimlerin renklerini fark etmek mümkün değildir. Gözümüz sadece ışığa karşı duyarlı olduğundan, ancak ışığın varlığında renkler fark edilebilir. Renk kelimesi ise subjektif bir kavram olup birçok anlamda kullanılabilir [10].

Psikolojik renk, insan beyninde uyandırılan bir duygu olarak ifade edilebilir. **Fizyolojik renk**, farklı ışık türlerinin (örn. Güneş ışığı, elektrik lambası vs.) gözümüzün retinasında ve görme sinirlerinde oluşturduğu fizyolojik olaylar topluluğudur. **Fiziksel renk** ise belirli bir ışığın hangi dalga boylarını hangi oranda içerdiğinin ölçü ve rakamlarla kesin olarak belirtilmesidir. Fiziksel renk, spektroskopik yöntemlerle ölçülmektedir [11].

Cisimlerin renkli görülebilmesi için, görünen ışık spektrumu içerisinde, üzerine düşen ışığın bir kısmını absorbe etmesi ve bir kısmını ise geçirmesi veya yansıtması gerekmektedir. Cisimler, kimyasal yapılarına ve kısmen de fiziksel özelliklerine bağımlı olarak belirli dalga boyundaki ışığı absorbe ederken geri kalan dalga boyunu yansıtırlar. Gözümüz, o cisimi yansıtılan ışığın dalga boyuna eş değer renkte görür [10].

Maddelerin kimyasal yapısı ile renkliliği arasındaki ilişki ise sentetik boyar maddelerin bulunması ile birlikte araştırılmaya başlanmıştır [10]. 1868 yılında Graebe ve Lieberman, organik bileşiklerin renkli olmasının nedeninin, bu bileşiklerin doymamış karakterde olmaları ile ilişkili olduğunu fark etmişlerdir. Yapılan denemelerde, renkli organik bileşiklere hidrojen katıldığında rengin kaybolduğu, aynı bileşiklerden hidrojen çıkartıldığında ise rengin tekrar ortaya çıktığı görülmüştür. Bu denemenin sonucu olarak ileri sürülen: “rengin moleküldeki doymamışlıktan ileri geldiği” tezi, bugün de diğer nedenlerle birlikte renkliliğin temel şartları arasında yer almaktadır.

Graebe ve Lieberman’ın çalışmalarını izleyen bir diğer renk çalışması ise 1896’da Witt tarafından ortaya atılan “kromofor gruplar” teorisidir. Witt’e göre bir

bileşiğın renkliliği, molekülde doymamış karakterde nitrozo veya nitro, karbonil ve azo gibi gruplar ile zayıf asidik veya zayıf bazik karakterde hidroksil ve amino gibi grupların bulunması ve bunların karşılıklı etkileşiminden ileri gelmektedir. Bu araştırmacı, bütün hidrokarbonların renksiz olduğunu ancak bunlara kromofor adı verilen doymamış grupların bağlanması ile renkli göründüklerini belirtmiştir. Kromofor grup bağlanmış hidrokarbonlara **kromojen** adı verilmektedir. Ancak kromojenler, boyar madde özelliği göstermektedirler. Witt kromojenlerin, boyar madde özelliği kazanabilmesi için **oksokrom** adını verdiği, ikinci seri grup moleküllerin bileşiğe bağlanması gerektiğini ileri sürmüştür. Birçok durumda oksokrom gruplar, renk oluşmasında kromoforu tamamlamakla kalmayıp, molekülün suda çözünmelerini ve life karşı belirli bir affiniteye sahip olmasını sağlar. Oksokrom grupların kromojene bağlanması ile hem renk şiddeti hem de renk derinliği artmaktadır [11, 12].

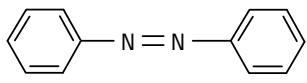
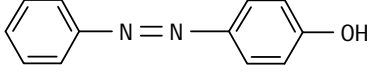
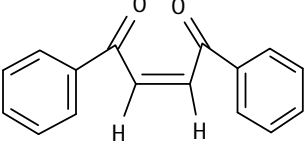
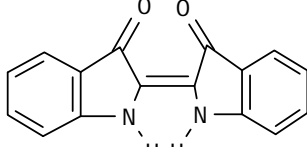
Witt'in bu teorisi, bütün renk olaylarını tam olarak açıklayamaz. Çünkü, bu grubun kromofor özellik gösterebilmesi için gereken koşullar ile kromofor ve oksokrom gruplar arasındaki ilişkiyi açıklayamamaktadır. Bundan sonraki gelişmeler birbirinden tamamen farklı iki yolda yürümüştür. Birincisi, Willstatler'in **merikonoid teorisi**'dir. İkincisi ise Dilthey ve Winzinger'in **koordinatif doymamışlık teorisi**'dir. Seçimli ışık absorpsiyonunu açıklamaya yeterli olmadıklarından, merikonoid ve koordinatif doymamışlık teorilerinin doğru yönleri birleştirilerek, 1931 yılında F. Arnt tarafından bugün de en geçerli renk teorisi olan "**ara hal teorisi**" ortaya atılmıştır [11].

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 yapısındaki ortaklaşmamış elektron çifti içeren gruplar olduklarından elektron veren gruplardır. Boyar maddenin yapısında kromofor ve oksokrom gruplar bulunduğundan, yani mesomer sistemler olduklarından, elektronları sabit olmayıp sınır formüller arasında ara kademeler üzerinde yer değiştirirler. Ancak böyle bir mesomer polarize olabilen gruplar (çift bağlar) sayesinde mümkündür. Buna göre, organik bir bileşiğın renkli olması ve boyar madde olarak kullanılabilmesi için kromofor ve oksokrom grupların yanında

polarize olabilen gruplar da içermesi gerekmektedir [10]. Kromofor, oksokrom gruplar ve kromojen yapılar Şekil 2.1 ve Şekil 2.2’de gösterilmektedir [11, 12].

Kromofor Gruplar		Oksokrom Gruplar	
$\bar{N} = \bar{N}$	Azo	$-HN_2$	Amino
$\begin{array}{c} \diagup \\ C = O \\ \diagdown \end{array}$	Karbonil	$-NHR$ $-NR_2$ }	Substitue amino
$\begin{array}{c} \bar{O} \\ \\ -N \\ \\ \bar{O} \end{array}$	Nitro	$-OH$	Hidroksil
$\begin{array}{c} \diagup \\ C = C \\ \diagdown \end{array}$	Etilen	$-SH$	Tiyoalkol
$\begin{array}{c} \diagup \\ C = NH \\ \diagdown \end{array}$	Karbamino	$-OCH_3$	Metoksi
$\begin{array}{c} \diagup \\ C = S \\ \diagdown \end{array}$	Tiyokarbonil	$-SO_3H$	Sulfonik asid
$-N = O$	Nitrozo	$-O - C_6H_5$	Fenolik

Şekil 2.1. Kromofor ve oksokrom gruplar [11].

Kromojen	Oksokrom	Boyarmadde
 <p>Azobenzen</p>	$- OH$	 <p><i>p</i>-hidroksi-azobenzen</p>
 <p>Dibenzoyl-etilen</p>	$\begin{array}{c} H \\ \\ - N - \\ \\ H \end{array}$	 <p>Indigo</p>

Şekil 2.2. Kromojen, oksokrom boyarmaddeler [12].

2.2. BOYA VE BOYAR MADDELER

Cisimlerin yüzeyinin ya dış tesirlerinden korunması ya da güzel bir görünüm sağlanması için renkli hale getirilmesinde kullanılan maddelere **boya** denir. Konuşma dilinde çoğu kez boya ve boyar madde kelimeleri birbirinin yerine kullanılmaktadır. Oysa ki bu iki kelime eş anlamlı değildir. Boyalar uygulandıkları alanlara hiçbir değişiklik yapmazlar. Kazımakla yüzeyden büyük parçalar halinde uzaklaştırılabilirler. Cisimlerin (kumaş, elyaf, vb.) kendilerini renkli hale getirmede uygulanan maddelere ise **boyar madde** denir [10].

Genellikle boyar madde olarak isimlendirilen maddeler anorganik, tekstilde kullanılan maddeler ise organik yapıdadır. Anorganik doğal boyar maddelere örnek olarak Fe_2O_3 , Cr_2O_3 , Pb_3O_4 , HgS , grafit, vb. maddeler gösterilebilir. Boyalar, doğal kökenli olanların yanında büyük çoğunlukla sentetiktir. Doğal boyar maddeler genellikle hayvanların deri ve salgı bezlerinden, bitkilerin kök, kabuk, tohum, meyve gibi kısımlarından ya da maya ve bakteriler gibi mikroorganizmalardan basit kimyasal işlemler sonucu elde edilmektedir [11].

Kullanım alanları çok geniş olan sentetik boyaların %80'i tekstil sanayisinde, yün, pamuk, ipek, deri vb. maddelerin boyanması için kullanılmaktadır. Tekstil sanayinden sonra sentetik boyaların kullanıldığı alanlar plastik materyaller, sentetik lifler, lastik sanayi, ağaç-selüloz sanayi vb. gibi sanayi alanlarıdır [10].

2.2.1. Boyar Maddelerin Sınıflandırılması

Boyar maddeler birçok şekilde sınıflandırılabilir. Sınıflandırma, boyar maddelerin çözünürlüklerine, kimyasal yapılarına, boyama özelliklerine ve kullanış yerlerine göre yapılmaktadır [11, 12]. Boya uygulayıcıları (boyacılar) ise genellikle boyar maddenin kimyasal yapısına değil de onun hangi yöntemle elyafı boyayabildiğine bakarlar. Bu nedenle, burada boyaların sınıflandırılması, boyama özelliklerine göre ele alınmaktadır.

2.2.1.1. Bazik boyar maddeler

Katyonic boyar maddeler olup, renkli bir katyon ile renksiz bir anyondan ibarettir [10]. Pozitif yük taşıyıcısı olarak N ve S atomu içerirler. Yapılarından dolayı bazik olarak etki ettiklerinden, anyonik grup içeren liflere bağlanırlar. Başlıca, poliakrilnitril kısmen de yün ve pamuk elyafının boyanmasında kullanılır. Elyaf-boyar madde ilişkisi iyoniktir. Boyar madde katyonu, elyafın anyonik grupları ile tuz oluşturur. Bazik boyar maddeler ile selülozik elyafın boyanmasında tanen, K-antimonil tartarat gibi maddelerle mordanlama gerekir [11, 12]. Bazik boyar maddeler, parlak ve canlı renk vermelerine karşın yaş haslıkları (suya karşı dayanıklılığı) ve ışık haslıkları (ışığa karşı dayanıklılığı) düşüktür [10].

2.2.1.2. 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 ($-SO_3H$) veya karboksilik asit grubu ($-COOH$) içerirler. Bu boyar maddeler, öncelikle yün, ipek, poliamid, katyonik modifiye akrilonitril elyafı ile kağıt, deri ve besin maddelerinin boyanmasında kullanılır. Bu boyar maddelere asit boyar maddeler isminin verilmesinin nedeni, uygulamanın asidik banyolarda yapılması ve hemen hemen hepsinin organik asit tuzlarını oluşturmalarıdır. Asit boyar maddeleri, kimyasal bakış açısından anyonik boyar maddeler grubuna girer. Sülfonik asit grubu içeren direkt, metal-kompleks ve reaktif boyar maddeler de anyonik yapıdadır. Fakat, farklı yöntemlerle boyama yaptıklarından asit boyar maddeler sınıfına girmez. Asit boyar maddelerle elyaf ilişkisi iyonik bağ şeklindedir [10].

2.2.1.3. Direkt boyar maddeler

Bunlar genellikle sülfonik, bazen de karboksilik asitlerin sodyum tuzlarıdır. Yapı bakımından direkt ve asit boyar maddeler arasında kesin bir sınır yoktur. Boyama yöntemi bakımından farklıdır. Direkt boyar maddeler, önceden bir işlem yapılmaksızın (mordanlama) boyar madde çözeltisinden selüloz veya yüne doğrudan doğruya çekilirler. Elyafın iç misellerinde hiçbir kimyasal bağ meydana getirmeksizin depo edilirler. Renkli kısımda bazik grup içeren direkt boyar

maddeler, sulu çözeltilerde zwitter iyon şeklide bulunurlar. Suyu karşı dayanıklılığı (yaş haslıkları) sınırlıdır. Fakat boyama sonrası yapılan ek işlemlerle yaş haslıkları düzeltilebilir [10].

2.2.1.4. Mordan boyar maddeler

Mordan sözcüğü, boyar maddeyi elyafa tespit eden madde veya bileşim anlamını taşır. Birçok doğal ve sentetik boyar madde bu gruba girer. Bunlar asidik veya bazik fonksiyonel grup içerirler ve bitkisel ve hayvansal elyaf ile kararsız bileşikler oluştururlar. Bu nedenle hem elyafa, hem de boyar maddeye karşı aynı kimyasal ilgiyi gösteren mordan, önce elyafa yerleştirilir; daha sonra elyaf ile boyar madde suda çözünmeyen bir bileşik vermek üzere reaksiyona sokulur. Böylece boyar maddenin elyaf üzerinde tutunması sağlanır. Mordan olarak, suda çözünmeyen hidroksitler oluşturan Al, Sn, Fe, Cr tuzları kullanılır. Bu tuzların kationları ile boyar madde molekülleri, elyaf üzerinde suda çözünmeyen kompleksler oluşturur. Günümüzde yalnız krom tuzları yün boyamada önem taşımaktadır [10].

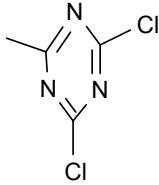
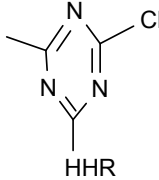
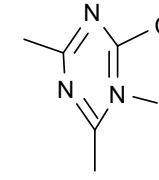
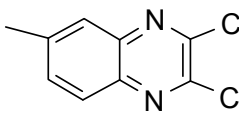
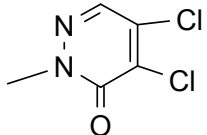
2.2.1.5. Reaktif boyar maddeler

Elyaf yapısındaki fonksiyonel gruplar ile gerçek kovalent bağ oluşturabilen reaktif gruplar içeren boyar maddelerdir (Şekil 2.3). Selülozik elyafın boyanmasında ve baskısında kullanılan ve son yıllarda geliştirilen bu boyar maddeler ayrıca yün, ipek ve poliamid boyanmasında kullanılırlar. Gerçek kovalent bağ nedeni ile elyaf üzerine kuvvetle uygulanırlar [10].

2.2.1.6. Küp boyar maddeler

Karbonil grubu içeren ve suda çözünmeyen boyar maddelerdir. Bunlar indirgeme ile suda çözünür hale getirilir ve bu halde iken elyafa çektirilirler. Daha sonra oksidasyonla yeniden çözünmez hale getirilirler. İndirgeme aracı olarak sodyum ditiyonit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), oksidasyon için hava oksijeni kullanılır. İndirgeme sonucu boyar madde molekülündeki keto grubu enol grubuna dönüşür. Meydana

gelen sodyum leyko bileşğinin direkt boyar maddeler gibi elyaf affinitesi yüksektir. Daha çok selülozik, kısmen de protein elyafın boyanmasında kullanılırlar. Doğal kökenli olanları (indigo) eskiden beri bilinmektedir. Küp boyar maddesindeki karbonil grubu, oksijeni indirgediğinde enolat oksijenine dönüşür. Bunlardan ilkinde kromofor, ikincisinde oksokrom özellik gösterir. Bu nedenle küpleme (indirgeme) işlemi az veya çok renk değışimi gösterir [10].

Boya Grupları	Reaktif Grupların Yapısı	Satış adı
Diklortriazin		Sinakron
Monoklortriazin		Subakron
Halojenprimidin		Reakton
Diklorxinaksazin		Levafiks E
Diklonitridazon		Primazin R

Şekil 2.3. Reaktif boyar maddeler [10].

2.2.1.7. İnkişaf boyar maddeleri

Elyaf üzerinde oluşturularak son şekline dönüştürülebilen bütün boyar maddeler bu sınıfa girer. Azoik boyar maddeler de denilen Naftol-AS boyar maddeleri bu sınıftandır. Bunlardan elyaf affinitesi olan bileşik önce elyafa emdirilir. Daha sonra ikinci bileşenle reaksiyona sokularak suda çözünmeyen boyar maddeye dönüştürülür. Bu işlemle hemen hemen tüm renk çeşitlenmeleri elde edilir [10].

2.2.1.8. Metal-kompleks boyar maddeleri

Belirli gruplara sahip bazı azo boyar maddeleri ile metal iyonlarının kompleks teşkili ile oluşturdukları boyar maddelerdir. Kompleks oluşumunda azo grubu rol oynar. Metal katyonu olarak Co, Cr, Cu, ve Ni iyonları kullanılır. 1:1 ve 1:2'lik metal kompleks boyar maddeler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Krom kompleksleri daha çok yün ve poliamid; bakır kompleksleri ise pamuk ve deri boyacılığında kullanılır. Işık ve yağ haslıkları yüksektir [10].

2.2.1.9. Dispersiyon boyar maddeler

Suda eser miktarda çözünebilen, bu nedenle sudaki dispersiyonları halinde uygulanabilen boyar maddelerdir. Boyar madde, boyama işlemi sırasında dispersiyon ortamında hidrofob elyaf üzerine difüzyon yolu ile çekilir. Boyama, boyar maddenin elyaf içinde çözünmesi şeklinde gerçekleşir. Dispersiyon boyar maddeleri başlıca poliester elyafını boyanmasında kullanılır. Ayrıca poliamid ve akrilik elyafı da boyarlar [10].

2.2.1.10. Pigment boyar maddeler

Tekstil elyafı, organik ve anorganik pigmentlerle de boyanabilir. Daha çok organik olanları tercih edilir. Pigmentlerin elyaf affinitesi yoktur. Kimyasal bağ ve absorpsiyon yapmazlar. Bağlayıcı madde denilen sentetik reçineler ile elyaf üzerinde bağlanırlar. Pigment boyar maddeleri suda çözünmediklerinden, sudaki yağ ve yağdaki su emülsiyonları şeklinde ince dağılmış olarak kullanılırlar. Emülsiyon,

elyaf veya kumaşa emdirildikten sonra bozular. Pigment, kumaş yüzeyinde ince dağılmış halde kalır. Sıkılarak kurutulduktan sonra 140-170 °C’da fiske (termofiks) edilir. Özellikle açık renklerde yıkama ve ışık haslıkları iyidir. Sürtünme haslığının yüksek olmayışı, koyu renklerin elde edilmemesi, bağlayıcı filmin hava etkisi ile parçalanması, bağlayıcının kumaşa sertlik vermesi sakıncalı özelliklerdir. Bu kusurları gidermek için son zamanlarda araştırmalar yapılmış ve ilerlemeler kaydedilmiştir [11, 12].

2.3. TEKSTİL VE KONFEKSİYON SEKTÖRÜNDE EKOLOJİ

“Ekolojik tekstil” veya “ekotekstil” terimi, elyaf halinden bitmiş haldeki ürünün oluşumuna kadar olan tüm işlem basamaklarında çevre gözetilerek üretilmiş, kullanım aşamasında ise kullanıcıya zarar vermeyen, kullanıldıktan sonra atılacak olan ürünün ise geri-dönüşümünün olduğunu veya çevreye zararsız ürünlere dönüşebildiğini ifade etmektedir [13].

2.3.1. Üretim Ekolojisi

Tekstil sektörü en fazla su, hava, kimyasal madde ve enerji tüketen endüstri dallarından birisidir. Hammaddeden başlayarak bitmiş ürün haline gelinceye kadar tekstil mamüllerine çeşitli işlemler uygulanmaktadır. Özellikle terbiye işletmelerinde müşteriler tarafından istenilen özelliklerin (renk, tutum, v.b.) kazandırılması amacıyla tekstil malzemeleri üzerine çeşitli şartlarda muhtelif kimyasal maddeler ve boyar maddeler uygulanmaktadır. Ekotekstiller kavramı içinde kalan üretim ekolojisi; bu işlem aşamalarında ortaya çıkan, insana ve çevreye zararlı atıklarla ilgilenmektedir. Üretim ekolojisinde lif cinsinin önemi büyüktür. Doğal lifler özellikle de pamuk ekolojik tekstil üretiminde tercih edilmektedir [14].

2.3.2. Atık Ekolojisi

İşlevini yerine getiren her malzeme atık olur. Atık ekolojisi kavramı ise kullanımı sona eren tekstil ürünlerinin zararlı maddeler yaymaksızın geri-dönüşüm, ayrıştırma yoluyla veya havanın saflığına zarar vermeksizin ısıyla yok edilmesi

(termal eliminasyon) esaslarına dayandırılmıştır. Eskiyip çöpe atılan tekstil ürünlerinin, yakılarak, çürümeye bırakılarak, depolanarak veya başka bir şekilde yok edilirken çevreye ve insanlara zarar vermemesi gerekir. Bu alanda en önemli çözüm ise geri-dönüşümdür. Yani eskiyen tekstil ürünlerinin liflerinin tekrar kullanılmasıdır [15].

2.3.3. İnsan Ekolojisi

İnsan ekolojisi hazır giyimin, kullanıcılara ve yakın çevresine olan etkilerini kapsar. Normal kullanım koşullarında insanlara zararlı etkileri olduğunu bildiğimiz maddelerin tekstillerde yoğunlaşması önlenmelidir. Bu maddelerin insana verdiği zararlar deri ile temas, solunum ve sindirim yoluyla olabilir [16].

2.3.3.1. Tekstil boyar maddelerinin ortaya çıkardığı problemler

Doğal boyar madde uygulamalarının ve araştırmalarının başlangıcı Çin ve Orta Asya'ya dayanmaktadır. 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 mevcut boyar maddeler olarak tanımlanabilir. Doğal boyar maddeler hayvansal ve bitkisel kökenli olmak üzere kendi içerisinde iki ana grupta incelenir. Bitkisel kökenli doğal boyar maddeler doğada sayıları pek çok olan bitkilerin meyve, kök, yaprak, kabuk, çekirdek gibi kısımlarından elde edilir. Hayvansal kökenli boyar maddeler ise doğada bulunan koşnil, kermes, mureks gibi böceklerden elde edilmektedir.

Son yıllarda artan çevre bilinciyle doğal boyar maddelere doğru bir yönelim vardır. Kimyasal maddelere karşı güvensizlik sonucu doğal boyar maddelerle boyanmış, kısmen daha düşük renk haslıklarına sahip ve yüksek fiyatlı giysileri kabul eden alıcı kesimi mevcuttur. Doğal olarak boyanmış tekstil mamullerine artan bir talep bulunmaktadır.

Sentetik boyar maddeler, 19. yüzyıl ortalarında doğal boyar maddelerin kimyasal esaslarının araştırılması sonucunda geliştirilmişlerdir. Sentetik boyar maddelerin ard arda geliştirilmesi sonucunda doğal boyar maddeler anlamlarını

yitirmişlerdir. Sentetik boyar maddeler, doğal boyar maddeye karşın hazır petro kimyasal hammaddelere dayanarak uygun maliyetlerde boyar madde üretimi sağlamıştır. Yüksek haslıklarda boyamalar, doğal boyar maddelerle yapılan pahalı ve ayrıntılı boyama yöntemlerinin sadeleştirilmesini sağlamıştır.

Şu an kullanımda olan boyar maddelerin %70'i azo boyar maddeler sınıfına aittir. Azo boyar maddeler nispeten kolay ve bütün boyar madde nüanslarında ve farklı kullanım amaçları için farklı haslıklarda üretilebilmektedir. Enzimlerin etkisiyle organizmada aromatik aminlere indirgenebilmektedir. Bunlardan bazıları kanserojen özelliğe sahiptir. Yaklaşık olarak piyasada bulunan 3200 adet azo boyar maddesinden 130 tanesinin belirli koşullar altında redüktif parçalanması sonucunda kanserojen arilamin bileşiklerinin oluşturduğu saptanmıştır.

Çok parlak ve yaş haslığı yüksek boyamalar veren krom boyar maddeleri de kanserojen olmaları nedeni ile sağlık açısından zararlıdır. Tekstil endüstrisinde sık sık kullanılan reaktif boyar maddeler de tehlikelidir. Yüksek haslıklara ve parlak renklere sahip olan reaktif boyar maddeler proteinlerle de reaksiyona girebilmekte ve alerjiye neden olmaktadır.

Sentetik boyar maddelerin insan sağlığına ve çevreye olumsuz yönde etkisi doğal boyar maddelere ilginin artmasına sebep olmuştur. Ancak bitkisel boyar maddeler, şartlı olarak sentetik boyar maddelere alternatif sayılabilmektedir. Öyle ki boyama bitkisinin üretimi için son derece büyük ekim alanlarına ihtiyaç duyulmaktadır ki, bu durum ekolojiye uygun değildir.

Yalnızca bitkilerden değil aynı zamanda bazı böceklerden de doğal boyar madde elde edilebilir; ancak yine burada gerekli boyar madde için çok fazla böceğe ihtiyaç vardır. Bu durum da çevre dostu bir işlem değildir.

Bitki boyar maddeleri ile boyamada, fiksaj için ağır metal içeren tuzlara gereksinim duyulmaktadır. Ancak, çevre ve insan için ağır metallerin kullanılmaması gerekmektedir. Bunların yerine çevreye daha az yük veren demir sülfat ve şap kullanmak gerekmektedir. Hemen hemen bütün doğal boyar maddelerle boyamada boyar maddenin life fikse olabilmesi için mordan kullanılması zorunludur. Mordan maddeleri, lif ile boyar madde arasında bağlayıcı köprü görevi

üstlenir. Böylece suda çözünürlüğü olan boyar madde, boya molekülleri ile mordan ve lif arasında kurulan bağlar sayesinde suda çözülmez bir halde, liflerin üzerine sabitlenmiş olur.

Sentetik boyar maddeler de doğal boyar maddelere göre toksikolojik olarak incelenmektedir. Kimyasal maddelerin kalıtsal olarak değişen özelliklerini "Ames Testi" vermektedir. Bakteri ırkının gen değişikliğine dayanan bu test, bu gün yeni bir boyar maddenin geliştirilmesinin hazırlık döneminde rutin olarak yapılmaktadır.

Sentetik boyar madde üretim koşullarına bağlı olarak son-ürün, toksik ağır metal kalıntılarını da içermektedir. Bu nedenle, elde edilen sentetik boyar maddelerdeki düşük metal içeriği, metalin ek bir yöntemle uzaklaştırılması zorunlu olduğu için kalite belirtisidir. Haslıklardan dolayı birkaç kullanım için metal kompleks boyar madde kullanma zorunluluğu vardır. Metal, kimyasal olarak boyar madde molekülüne bağlıdır ve boyar madde parçalanmadan ayrılamamaktır.

Doğal boyar maddeler, genellikle metal içermemektedir; ancak genellikle mordan boyar maddeleri olarak kullanılmaktadırlar. Bu boyamada, ağır metal tuzları büyük miktarda kullanılmakta olduğundan, boyama sonrası metal iyonlarının uzaklaştırılmasının gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Yani fazladan bir çevre yükü getirmektedir.

Boyalı tekstil malzemelerinde iyi veya çok iyi yaş haslıklar istenmektedir. Haslıklar; su, ter, tükürük, sürtme haslıkları gibi tekstil mamulünün belli şartlar altında ne kadar boyar madde vereceğini görmek için yapılan testlerdir. Yaş haslıklar ne kadar yüksekse bu boyar madde molekülünün, tekstil mamulünün lifine o kadar iyi bağlandığını gösterir. Tekstil malzemesine sıkı bağlarla bağlanmış bir madde, insana deri yolu ile geçmemektedir. Bu nedenle de boyalı tekstil malzemelerinde iyi veya çok iyi yaş haslıklar istenmektedir. Bunun da yanı sıra yüksek haslık aynı zamanda mamulün renk bakımından uzun süre rengini muhafaza edeceğini ve kullanım süresinin uzun olacağını ifade eder.

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 [16].

Doğal boyar maddeler ile sentetik boyar maddeleri karşılaştırıldığında ise her iki tip boyar maddelerin de bazı avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır:

i. Doğal boyar maddeleri elde etmek için çok fazla miktarda bitki ve hayvan yetiştirilmesine ve endüstriyel olarak ürün toplama ve ekstraksiyon teknolojisine gereksinim vardır. Yüksek boyar madde verimini yakalayabilmek için boyama bitkisinin yetiştirilmesinin iyileştirilmesi düşünülmelidir.

ii. Endüstriyel arıtma yapılmıyorsa, sentetik boyar maddelerle karşılaştırıldığında atık su yükünü çok fazla arttıran döküntü yığınları ortaya çıkmaktadır. Buna ilave olarak doğal boyar maddelerin fiksajında ekolojik düşünen terbiyeciyi ürküten mordan kullanılmaktadır.

iii. Doğal boyar maddeler zor standardize edilmektedir. Az sayıda renk tonları kullanılabilir. Sentetik lifler için bu zamana kadar hiçbir doğal boyar madde bilinmediğinden yalnızca yün ve pamuk için kullanılabilir.

iv. Doğal boyar maddeler sentetik boyar maddelerden 5-10 kat daha pahalıdır.

v. Şu anda kullanılan doğal boyar maddelerin tekstil maddelerini boyama talebini karşılamasının mümkün olmadığı da göz önüne alınarak, çevreye ve insan sağlığına zararlı olmayan boyar maddelerin üretiminin ve kullanımının her geçen gün artması beklenmektedir [16].

2.3.3.2. Ağır metal iyonlarının insan sağlığına etkisi

Ağır metal iyonlarının bazıları çeşitli boyar maddeler yoluyla tekstil mamulüne geçebilir. Nikel, kobalt, bakır ve krom iyonları ter yoluyla deriden insan vücuduna geçebilmektedir [17].

i. Kromun etkisi: Krom, yünlü mamullerin boyanmasında mordan olarak kullanılan bir ağır metaldir. Kromun vücuda etkisinde en çok deri belirtileri önemlidir. Krom ülseri, krom iyonlarının direkt etkisi ile oluşmaktadır ve deride deliklerin oluşmasına neden olur.

ii. Civanın etkisi: Kürklerin kırmızı renge boyanmasında civa tuzları kullanılmaktadır. Civanın tipik kontakt dermatit oluşturuıcı özelliği, deri proteinleri ile reaksiyona girmesinden ileri gelmektedir. Akut ve kronik zehirlenmeler sonucu bulantı, ruhi bozukluklar, titreme ve konuşma bozuklukları görülebilmektedir.

iii. Kobaltın etkisi: Kobalt B₁₂ vitamini merkez atomu olarak yaşamsal öneme sahiptir, nikel ve öncelikle demir gibi kan dolaşımına katılmaktadır. Eksikliği durumunda lethargie, ağırlık kaybı ve anemi görülmektedir.

iv. Nikelin etkisi: Nikel yüksek derecede alerjik maddedir. Terleme sonucu derinin her cm²'sinde bulunabilecek 10-40 ppm nikel, alerjik reaksiyonlara neden olabilmektedir.

v. Bakırın etkisi: Hemoglobin ve pigmentlerde, karbonhidrat değişiminde ve kollagen, elastin ve keratinin çapraz bağlanması için gereklidir. İçme suyundaki yüksek bakır miktarı nedeniyle süt bebeklerinde akciğer hastalıkları görülmektedir [17].

2.3.4. AB'nin ve Türkiye'nin Ekolojik Tekstil Konusundaki Mevzuatı

2.3.4.1 . 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 [18].

19 Temmuz 2002 tarihli, söz konusu direktifin 19. kez değiştirilmiş şekli olan 2002/61/EC Direktifi ile kanserojen olduğu belirlenmiş 22 adet aromatik arilamine parçalanmış 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, triklorabenzon maddelerinin çeşitli üye ülkelerce 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 tolueni içine alacak şekilde genişletilmesinin göz önüne alınması gerektiği bildirilmektedir. 1,2,4-Triklorabenzon için su ve kara ekosistemler için limit değerler olması gerektiği belirtilmiştir [18].

2.3.4.2. Türkiye'deki mevzuat

İnsan sağlığına zararlı etkilerinin olması sebebiyle, Sağlık Bakanlığınının 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 [18].

2.4. BOYAR MADDELERİN MİKROBİYOLOJİK DEĞREDASYONU

Mikrobiyal dekolorizasyonun etkisi, seçilen mikroorganizmanın adaptasyonuna ve aktivitesine bağlıdır. Geçtiğimiz onbeş-yirmi yıl içerisinde birçok mikroorganizmanın; bakterilerin [19, 20, 21], fungusların [22-24], mayaların [25], aktinomiset [26] ve alglerin [27] azo boyar maddeleri biyolojik olarak parçalama

yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. Birçok azo boyar madde bakteriyel azo redüktazla, azo bağlarının anaerobik olarak parçalanmasıyla indirgenir. Ancak bu boyar maddelerin aerobik olarak parçalanması zordur [8, 19]. Bununla beraber fungal ligninolitik enzim sistemi (lignin peroksidaz, mangan peroksidaz ve lakkaz) boyar maddelerin biyo-oksidasyonuna katılmaktadır [22]. Buna rağmen optimum enzim aktivitesi için düşük pH gereksinimi [28] ve dekolorizasyonun tamamlanabilmesi için gereken hidrolik alıkoyma zamanı [8, 28] boyaların degradesyonunda fungusların kullanılmasındaki dezavantajları oluşturmaktadır. Buna ek olarak funguslar, karışık kültürlerde diğer yararlı organizmaların gelişmesini engelleyebilmektedirler. Böylece fungal dekolorizasyon geniş skaladaki uygulamaları kısıtlamaktadır.

Azo boyar maddeler, aromatik halkalarında genellikle bir yada daha fazla sulfonik asit grubu içerirler. Bu da deterjan etkisi göstererek mikroorganizmaların gelişimini olumsuz olarak etkilerler [29]. Diğer taraftan boyar maddelerin, nükleik asit sentezinin inhibitörleri oldukları bildirilmiştir [30].

2.4.1. Boyar Maddelerin Bakterilerle Degredasyonu

Trifenilmetan boyar maddelerin bakterilerle parçalanmasıyla ilgili çok az rapor bulunmaktadır. 1981'de Yatome ve ark. trifenilmetan boyar maddelerin *Pseudomonas pseudomallei* 13NA ile biyodegradesyonunu araştırmışlardır [31]. Bu araştırmacılar Bazik Fuksin, Metil Violet, Kristal Violet ve Viktorya Mavisini olmak üzere dört tip boyar madde ile çalışmışlardır. Çalışmaları sonucunda, çalışma koşulları altında Metil Violet ve Kristal Violet parçalanırken, aynı şartlar altında Bazik Fuksin ve Viktorya Mavisini'nin parçalanmadığı gözlenmiştir.

1991 yılında Yatome ve ark. [32] Kristal Violet'in *Bacillus subtilis* IFO 13719 tarafından degradesyonunu araştırmışlardır. Bu araştırma sonucunda Kristal Violet'in yanı sıra iki trifenilmetan boyar maddenin (Prarosanilin ve Viktorya Mavisini) *B. subtilis*'in büyümekte olan hücreleri tarafından parçalandığını da gözlemişlerdir. Düşük hücre gelişmesine rağmen *B. subtilis*, Kristal Violet'i ilk sekiz saat içinde parçalama yeteneği göstermiştir. 24 saat sonra, hücreler tamamen geliştiğinde ise bileşiğin dekompose edildiği saptanmıştır. Bazik Auromine O, Bazik

Fuksin, Viktorya Mavisi *B. subtilis* tarafından parçalanmaktadır. Bunun yanı sıra *E. coli*'nin Kristal Violet'i parçalayamadığı saptanmıştır. *Pseudomonas cepacia* ve *P. cruciviae*'de de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Roth ve ark. [33] 21 hidrofobik oleofilik bakteri ırkı izole ederek bunların dekolorizasyon aktivitesi gösterdiklerini belirlemişlerdir. Bu çalışma sonucunda elde edilen izolatlar arasında en aktif olan ırkların çoğunun *Mycobacterium*'a ait olduğu görülmüştür. Aktif olan bütün bu ırkların Kristal Violet'i ve Malaşit Yeşilini parçalayabildiği saptanmıştır. Cam boncuklara immobilize edilen hücreler de benzer aktivite göstermektedirler.

Almanya'da bulunan bir patent firması [34] trifenilmetan serisinin ksenobiyotik boyar maddelerini degrede edebilen *Corynebacterium* ve *Mycobacterium* ırklarının kullanıldığı bir proses geliştirmiştir.

Rafii ve ark. [35] azo boyar maddeleri indirgeyebilen anaerobik bakterilerin insan dışkısından izolasyonu ve çalışılması için proses geliştirmişlerdir. Bu organizmaların enzimatik aktivite gösterebilmeleri için ortama kofaktör olarak flavin eklenmesi gerektiği belirlenmiştir.

Başka bir çalışmada, azo boyar maddeleri asimile ettiği bilinen bakteriler boya fabrikası drenaj suyundan izole edilmiş ve dekolorizasyon metabolik yollarını açıklanmıştır [36]. Bu araştırmacıların elde ettiği sonuçlara göre, boyar madde dekolorizasyon aktivitesinin uzun bir süre stabil kaldığı belirlenmiştir.

Sugiara ve ark. [37] topraktan ve atık sulardan izole ettiği bakteri ırklarının azo boyar maddeleri degrede edebildiğini göstermişlerdir. Bu ırklar; *Bacillus sp.* OY1-2, *Xanthomonas sp.* NR25-2 ve *Pseudomonas sp.* PR 41-1'dir. Bu bakterilerin gıda boyar maddelerini parçalayabilen enzimler ürettikleri rapor edilmiştir. Bu enzimler Metil Kırmızısı'nın parçalanmasını katalizlemektedirler ve dimetil *p*- fenildiamin ve *o*-amino benzoik asit üretmişlerdir.

Chen ve ark. [38] bataklık göllerinden ve atık örneklerinden izole ettiği altı bakteri ırkının tekstil boyar maddelerini parçalayabildiğini gözlemlemişlerdir. Bu izolatlardan *Aeromonas hydrophila*'nın, çeşitli boyar maddelerini en iyi şekilde parçalayabildiği tespit edilmiştir. *A. hydrophila* aerobik koşullarda ürese de en iyi renk giderimi anaerobik kültürlerde gözlenmektedir.

2.4.2. Boyar Maddelerin Aktinomisetlerle Degredasyonu

Streptomyces chromofuscus, toprakta bulunan bir aktinomiset olup, lignoselülolitik aktiviteye sahiptir. Çoğunlukla toprakta, kompostlarda, suda ve diğer çevrelerde bulunan aktinomisetlerin en önemli özelliği, antibiyotik üretme yeteneğinde olmalarıdır [39]. Aktinomisetlerin, lignoselülolitik bitki artıklarını, tarımsal ve şehir atıklarını dekompose eden geniş bir aralığa sahip mezofilik ve termofilik ırkları bulunmaktadır [40]. Bu kalıntılar genellikle ksenobiyotik moleküllerle kirlenmiş durumdadırlar [41]. Aktinomisetler O, N ve S oksidasyonları ve O- ve N- dealkilasyon reaksiyonları gibi hidroksilasyonları katalizlerler [42]. Bakteriyel sitokrom P₄₅₀'nin bu reaksiyonların çoğunu katalizlediğine inanılmaktadır [43]. Volatilizasyon, kompostlama proseslerinde belirli pestisitlerin uzaklaştırılmasının belirlenmesinde önemli bir metot olarak görülmektedir [41].

Trifenilmetan boyar maddelerin aktinomisetlerle degredasyonu ilk kez 1991'de Yatome ve ark. [32] tarafından açıklanmıştır. Bu araştırmacılar, *Nocardia corallina* ve *N. globerula*'nın Kristal Violet'i parçalayabildiklerini gözlemlemişlerdir. Dekolorizasyon aktivitesinin intraselüler olduğu ve kültür filtratında dekolozasyon aktivitesinin olmadığı da saptanmıştır. Boyar maddeler 24 saat içinde tamamen dekolozize edilmiştir. Ayrıca *N. globerula* tarafından gerçekleştirilen ve Kristal Violet'in parçalanma ürünü olan Michler's Ketone (KM) olarak adlandırılan bir degredasyon ürünü de saptanmıştır.

1993'te Yatome ve ark. yaptıkları bir başka çalışmada aktinomisetleri kullanarak trifenilmetan boyar maddelerin parçalanma mekanizmasını açıklanmışlardır [44]. *N. corallina* tarafından Kristal Violet'in KM'ye parçalandığını; buna rağmen tipik trifenilmetan boyar maddesi olan Aururomine O'nun parçalanmadığını bildirmişlerdir. *N. corallina*; Metil Violet, Etil Violet, Bazik Fuksin ve Viktorya Mavisini dekolozize etmektedir (Çizelge.2.1). Biyodegradasyonun son ürünü ise KM'dir.

Çizelge 2.1. *N. corallina* IAM 12121 tarafından trifenilmetan boyar maddelerin dekolorizasyonu [44].

Boyur maddeler	λ_{\max} ^a	Dekolorizasyon yarılanma zamanı (dk)	Max. Dekolorizasyon (%)
Kristal Violet (BV3)	590	50	98,3
Metil Violet (BV1)	590	60	71,8
Etil Violet (BV4)	600	480	59,8
Bazik Fuksin (BR9)	555	30	70,0
Viktorya Mavisi (BB26)	620	20	33,0

a: λ_{\max} determinasyonu için kullanılan solvent n-bütanoldür.

Aktinomisetler; özellikle streptomisetler lignin degradesyonunda rol alan ekstraselüler peroksidaz üretirler. Bu prokaryotik peroksidaz, ligninin birincil oksidasyonunu sağlayarak suda çözünen çeşitli polimerik bileşenlerin üretimine katılır. Aktinomisetler ayrıca hidrosilasyon, oksidasyon ve de alkilasyon reaksiyonlarını katalizleme yeteneğine sahiptir [45].

Aktinomisetlerin tekstil boyalarını dekolorize ve mineralize edebilmeleri ilk olarak üç grup tarafından araştırılmıştır. 1989'da Ball ve ark. aktinomisetlerin geniş bir tür aralığını kapsayan 20 ırkı araştırarak onların Poly-R boyalarını dekolorize etme yeteneklerini saptamışlardır [46]. Bu çalışmada kullanılan 20 ırktan 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 konsantrasyona sahip farklı boyaları parçalayıp parçalayamadıklarını çalışmışlardır. 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 dekolorize edebildiklerini gözlemlemişlerdir. Bu çalışma sonrasında 89 suşta pozitif sonuçlar elde etmişlerdir [47].

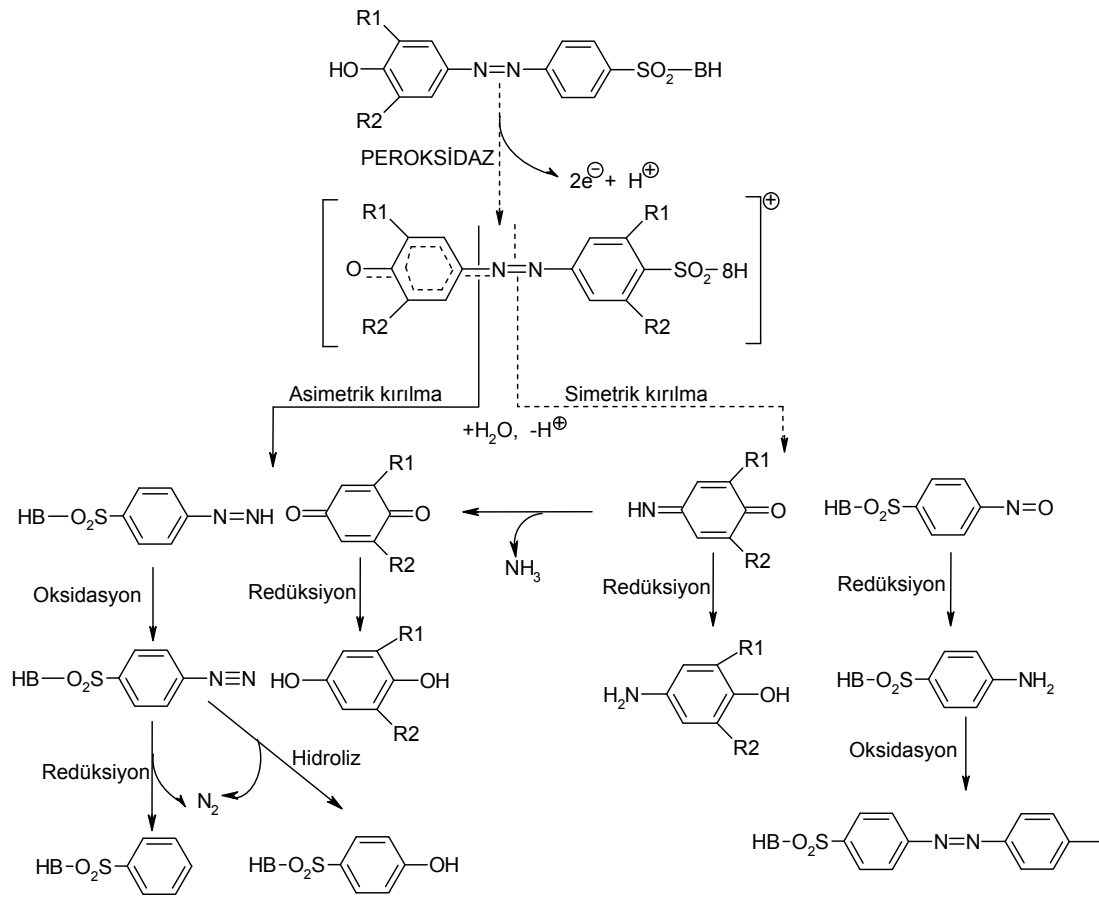
Son olarak Idaho üniversitesine bağlı bir grup bilim adamı beyaz-çürükçül fungusları ve streptomisetleri kapsayan ligninolitik organizmaların tekstil boyalarını dekolorize ve mineralize etme yeteneklerini araştırmışlardır. İlk olarak 14

streptomiset, polimerik boyalar olan Poly-B 411, Poly-R 478'i ve Remazol Brilliant Blue R (RBBR)'ı parçalayıp parçalayamadıklarını incelemişlerdir [48]. Bu çalışmada ise iki boya; Poly-B 411 ve RBBR ile belirgin sonuçlar elde edilmiş, izolatların boya dekolore edebilmeleri ile ligninolitik aktiviteleri arasında bir korelasyonun olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada kullanılan suşların glukoz içeren ortamlarda yetiştirildikleri zaman ekstraselüler H₂O₂ üretmeleri ile renk gideriminin daha da arttığı gözlenmesinin bir sonucu olarak, peroksidaz enzimlerinin renk gideriminde rol aldığı düşünülmektedir. Daha önce streptomisetler tarafından ekstraselüler peroksidazların üretildiği ve enzimlerin substrat spesifitesinin *P. chrysosporium* tarafından üretilen Mn (II) peroksidazla benzer olduğu kanıtlanmıştır [48]. İlginç bir şekilde 3. boya Poly-R 478'in parçalanma aktivitesi ile ligninolitik aktivite (veriatril alkol ile oksidasyon, kumarik asit veya syringic asit ile kullanımı, ve asitle tortulaşabilen polimerik ligninler, APPL) arasında hiçbir korelasyon bulunmamıştır. Bu boyanın dekoloreasyonunu gerçekleştiren enzimatik proses açıklanmamış olarak kalmıştır.

Crawford ve ark.'nın bir sonraki çalışması ise *Streptomyces chromofuscus* A11 ile azo boyalarının parçalanma ve mineralizasyon mekanizmasını araştırmak olmuştur. Bu amaçla yapılan ilk çalışma, dekoloreasyonun, izolatın ligninolitik yeteneği ile bağlantılı olduğunu, fakat azo boyaların degradasyonundan sorumlu bakteriyel enzimatik sistemin beyaz-çürükçül bir fungus olan *P. chrysosporium*'unkinden farklı olduğunu kanıtlamıştır [49]. Daha sonraları 2 azo boyanın *P. chrysosporium* ve *S. coromofuscus* A11 tarafından gerçekleştirilen dekoloreasyon ve degradasyon yolları açıklanmıştır [45]. Her iki organizmanın peroksidazları azo boyayı suyun ve H₂O₂'in nükleofilik saldırısına uygun kılan kation radikale dönüştürür. Bu olay azo bağlarının simetrik ve asimetrik olarak eş zamanlı parçalanmasıyla ara-ürünlere dönüşmesini ve bu ara-ürünlerin sonradan redoks tepkimesi ile daha kararlı ara ürünlere dönüşmesi ile sonuçlanır (Şekil 2.4).

Burke ve Crawford (1998) streptomiset türlerinin gerçekleştirdiği boya dekoloreasyonuna katılan peroksidaz sınıfını belirlemek amacıyla *S. viridosporus* T7A'nın ekstraselüler peroksidazını saflaştırmışlardır [50]. *S. viridosporus* T7A peroksidazının ise fungal Mn-peroksidaza benzer substrat spesifitesi gösterdiği, hem-

peroksidazın inhibitörü olan KCN ile inhibe olmadığı bulunmuştur [51]. Buna ek olarak]. *S. viridosporus* T7A peroksidazının N-terminal aminoasit sekansı fungal Mn-peroksidaz ve aktinomiset kaynaklı selüloz ile eş homoloji göstermektedir. Daha sonra gerçekleştirilen saflaştırmalar peroksidazın biyokimyasal yapısını doğrulamaktadır. Bu peroksidazın katıldığı moleküler mekanizma ayrıca çalışılmış ve oksijen stresini regüle eden proteini kodlayan *oxyR* geninin düzenleyici rolü olduğu bulunmuştur [52].



Şekil 2.4. Sülfazo boyaların peroksidaz ile degreasyonunun önerilen mekanizması.

2.4.3. Boyar Maddelerin Mayalarla Degredasyonu

Kırmızı oksidatif mayalarla Kristal Violet'in biyodegradasyonu Kwasniewska tarafından rapor edilmiştir [53]. *Rhodotorula sp.* ve *Rhodotorula rubra*'nın Kristal Violet'i parçalayabilme yeteneğinde olduğunu açıklamıştır. Fermantasyon

yeteneğinde sahip *Saccaromyces cerevisiae*'nin Kristal Violet'i parçalayamadığı gözlenmiştir. Parçalayamamanın nedeni kesinlikle boyar maddenin toksik etkisinden kaynaklanmamaktadır. Çünkü organizma hem kontrol hem de test erlenlerinde iyi gelişme göstermiştir.

2.4.4. Boyar Maddelerin Funguslarla Degredasyonu

Wikolazka ve ark. değişik fiziko-ekolojik gruplardaki 115 fungusu kıyaslayarak, yapısı farklı iki boyar maddeyi dekolorize etme yeteneklerini araştırmışlardır. Bu çalışmalar sonucunda sıvı ve katı kültürdeki ırklarda, Asit Kırmızı 183'ün dekolorizasyona dirençli olduğunu saptamışlardır [54].

Yeşilada ve ark. başlangıç pH değerinin, boyar madde konsantrasyonunun, biyomass miktarının, sıcaklığın ve dekolorizasyon etkisinin, *Funalia trogii* tarafından gerçekleştirilen boyar madde dekolorizasyon aktivitesi için önemli olduğunu açıklamışlardır [55].

Başka bir çalışmada *Aspergillus niger*'in sulu solüsyonlarda boyar maddeyi uzaklaştırma kapasitesinin olduğu belirtilmiş, boyar maddenin biyosorpsiyonunun; fungal biyomass içindeki fonksiyonel gruptan ve boyar maddelerin kimyasal yapısından etkilendiği açıklanmıştır [56].

Dönmez, reaktif tekstil boyar maddeleri Remazol Mavi, Reaktif Siyah, Reaktif Kırmızı'nın melas üzerinde büyütülen maya türleri *Candida tropicalis*'le akümülyasyonunu çalışmış ve boyar madde konsantrasyonundaki artışın maya gelişimini inhibe ettiğini ve uzun bir lag periyoduna yol açtığını gözlemlemiştir [57].

Mazmancı ve ark. [58] beyaz çürükçül fungus *Coriolus versicolor*'un Metilen Mavi'sinin degredasyonunu çalışmışlar ve maksimum dekolorizasyon aktivitesinin ikincil metabolik faz sırasında olduğunu saptamışlardır. Bu araştırma C/N oranı 2:1 olan ortamda dekolorizasyon daha yüksek olduğunu göstermiştir.

Mielgo ve ark. bir azo boyar madde olan Orange II'nin sürekli yatak reaktörde, 30 günü aşkın inkübasyonda, immobilize *P. chryso sporium*'la degredasyonunu araştırmışlardır [59]. Çalışma sonucunda ise kromoforik grubun parçalanması ve

aromatik halkanın bağlarının kopması sağlanmış, bunun yanı sıra MnP aktivitesi ve dekolorizasyon arasında bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir.

Robinson ve ark. dört beyaz çürükçül fungusu, LiP ve MnP ve lakkazı azot içermeyen ortamda üretmeye teşvik etmişler ve azot eklendikçe dekolorizasyon süresinin azaldığını gözlemlemişlerdir [60]. Sonuçlar, *Bjerkandera adusta* ve *P. tremellosa*'yı azot kaynağı olsa da olmasa da tekstil atıkların dekolorizasyonunda kullanabileceğini göstermiştir.

Nyanhongo ve ark. [61] dört ligninolitik fungusu; *Trametes modesta*, *T. hirsute*, *T. versicolor* ve *Sclerotium rolfsii*'yi lakkaz üretme yeteneklerine göre karşılaştırmışlar ve fungal lakkazların sekiz sentetik boyar maddeyi dekolorize etme yeteneklerini araştırmışlardır. Test edilen bütün boyar maddeler *T. modesta* tarafından dekolorize edilmiştir. *Trametes spp.* ve özellikle *T. modesta*'dan elde edilen lakkazların tekstil boyar maddelerin dekolorizasyonunda kullanılabileceğini açıklamışlardır.

Atık sulardaki boyar maddelerin algler tarafından parçalanmasıyla ilgili olarak çok az makale bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar *Oscillatoria* türlerinin atık sulardaki boyar maddeleri parçalayabildiğini açıklamıştır [62].

2.5. BOYAR MADDELERİN DEKOLORİZASYONUNU GERÇEKLEŞTİREN ENZİMLER

Boyar maddeler aromatik aminler ve fenoller içerirler. Bu bileşiklerin dekolorizasyonu, lignin peroksidaz, mangan peroksidaz ve lakkaz gibi ligninolitik aktiviteye sahip enzimlerle gerçekleşmektedir. Bunun yanı sıra bakteriyel bir enzim olan azo redüktazda dekolorizasyon aktivitesi göstermektedir. Bu enzim fenolik bileşikleri substrat olarak tanımaktadır.

İlk ligninolitik peroksidazlar *Phanerochate chrysosporium*'dan izole edilmiş ve lignin peroksidaz (LiP) [63, 64] ve mangan peroksidaz (MnP) [65] olarak adlandırılmıştır. Lignin peroksidazlar, veratril alkol gibi fenolik olmayan aromatik aminleri katalizlerler. MnP; Mn^{+2} 'yi Mn^{+3} 'e oksitler ve Mn^{+3} birçok fenolik bileşiğin oksidasyonunda görev alır [66].

Birçok araştırmacı *P. chrysosporium*'dan elde edilen LiP ve MnP'nin çok çeşitli ksenobiyotik bileşitinin ve boyar maddelerin degradasyonunda rol aldığını gözlemlemiştir. İki azo boyar maddenin LiP tarafından parçalanmasını, reaksiyon karışımındaki veratril alkolün stimüle ettiği saptanmıştır [67].

Paszczynski ve ark. *P. chrysosporium* kültürünün ham ekstraktını kullanarak, LiP ve MnP'in spesifik koşullar altında boyar madde parçalanmasını açıklamışlardır [68]. Bu araştırmacılara göre farklı şekilde konumlanmış sülfonatlı azo boyar maddelerin Mn⁺² varlığında ve pH 5'te (MnP koşulları) daha iyi okside olduğunu, bunun yanı sıra diğerlerinin Mn⁺² yokluğunda ve pH 3'te (LiP koşulları) daha iyi parçaladığını bulmuşlardır.

Diğer taraftan Ollikka ve ark. *P. chrysosporium*'dan elde edilen LiP izoenzimlerinin değişik yapısal sınıflardaki boyar maddeler için spesifiteler gösterdiğini saptamışlardır. pI 3,85 olan bir izoenzim (izoenzim H6 olarak tanımlanır) diğer LiP izomerlerine göre daha fazla veratril alkole bağımsız aktivite göstererek Metilen Mavisini, Metil Turuncu, ve Toludin Mavisini parçalamaktadır [68].

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 spesifiteleri çoğu kez oldukça geniş ve enzim kaynağına göre değişkenlik gösterse de (*p*-difenol:oksijen oksidoredüktaz; EC 1.10.3.2) *p*-difenollerin oksidasyonunu ve aynı zamanda meydana gelen dioksijenin suya indirgenmesini katalizlerler. Lakkazlar (EC 1.10.3.2;benzenediol:oksijen oksidoredüktaz), çok büyük bir çoğunlukla, 60000 ve 80000 arasında değişen moleküler ağırlıkları ile bakır içeren ekstraselüler glikoproteinlerdir [69].

Lakkaz, bazı basidiomiset ve askomiset bireylerinde tesbit edilmiştir [69, 70]. Çoğu beyaz çürükçül fungi, *P. chrysosporium* hariç olmakla birlikte, ekstraselüler

lakkazlar üretirler. Bu enzimin lignin degradasyonuna [71, 72] fenolik bileşiklerin detoksifikasyonuna [73] ve bazı klorofenolik bileşiklerin deklorize edilmesine [74] karıştığına inanılmaktadır.

2.6. BOYAR MADDELERİN DEKOLORİZASYONU İLE İLGİLİ YAPILAN ÇALIŞMALAR

1991 yılında Pasti ve Crawford [75] streptomiseslerle yaptığı çalışmalarında kültür ortamında lignoselüloz bulunması muhtemelen dekolorizasyon prosesine katılan enzimlerin üretilmesini indüklediğini gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar bu araştırmalarında üç tip antron boyar madde üzerinde çalışmışlar ve bunlardan RBB-R ve Poly B-411'in bayır turpu peroksidazı ve Mn(II) oksidazla oksidasyonu için uygun substratlar olduğunu saptamışlardır [76]. Bunun tam tersine Poly R-478 ise yukarıda belirtilen enzimler için uygun substrat olmadığı gözlenmiştir. Fakat Poly R-478'in dekolorizasyon aktivitesinin lignoselüloz degradasyonuna katılan diğer enzimlerin aktivitesini etkilemesi olasıdır.

Beyaz çürükçül fungus *P. chrysosporium* ile yapılan çalışmalar organizmanın ligninolitik parçalama aktivitesinin polimerik boyar madde dekolorizasyonundan da sorumlu olduğunu göstermektedir. Aktinomiset ve polimerik boya Poly R-481 ile yapılan çalışmalarda, lignoselülozu solubilize eden organizmaların ayrıca polimerik boyar maddelerin dekolorizasyonunu da gerçekleştirdiği saptanmıştır [77].

Ball ve Colton [78] *Streptomyces viridosporus* T7A ile yaptıkları çalışmada *S. viridosporus*'un, minimal tuz içeren, ve polimerik boyar maddenin başlıca C kaynağı olduğu ortamda büyütüldüğünde, boyar maddeyi tamamen dekolorize ettiğini saptamışlardır. Boyar madde dekolorizasyonunun maksimum olduğu aralık ise 0-48 saattir ve 7. günden sonra dekolorizasyon gerçekleşmemektedir.

Lignin degradasyonu ve dekolorizasyon arasında kesin bir korelasyon kurulamasa da lignoselülozu solubilize eden aktinomisetler ve beyaz çürükçül funguslar gibi diğer lignin degrade eden organizmaların Poly R dekolorizasyon kapasitesinin diğer non-ligninolitik nesillere oranla daha yüksek olduğu bir gerçektir.

P. chrysosporium Kristal Violet (N,N,N',N',N'',N''-heksametilprarosanilin), Prarosanilin, Krezol Kırmızısı, Bromofenol Mavi, Etil Violet, Malaşit Yeşili ve Parlak Yeşili de içeren trifenilmetan boyar maddeleri dekolorize etmektedir [79]. Kristal Violetin üç metaboliti belirlenmiştir. Üç bileşik: N,N,N',N',N''-pentametilprarosanilin, N,N,N',N'-tetra metilprarosanilin ve N,N',N''-trimetilprarosanilin ana bileşiğin N demetilasyonundan oluşmaktadır. Bundan yola çıkılarak, fungal ligninazın N-demetilasyon reaksiyonlarını katalizlediği öne sürülmüştür. Bununla birlikte azotça zengin kültürler kullanıldığında *P. chrysosporium* tarafından gerçekleştirilen Kristal Violet dekolorizasyonu non-ligninolitik enzim sistemi içerebilmektedir. Bu fungusun ligninolitik aktivitesi, önemli miktarda nitrojen içeren ortamlarda baskılanmaktadır [80].

Cripps ve ark. yeni bir tip boyar maddeyi *P. chrysosporium* tarafından parçalanmış organik bileşikler listesine eklemiştir [81]. Bu boyar maddeler, Azure B [3-(dimetilamino)-7-(metilamino) pentotiazin-5-ium klorid], Tropaeoline O {4-[(2-hidroksifenil)azo]benzen sülfonik asit}, ve Kongo kırmızısı {303'-[[1,1'bifenil]-4,4'diylbis-(azo)]bis [4-amino-1-naftalin]sülfonik asit} içermektedir.

Streptomyces sp. genusunun benzen türevlerini klasik aromatik katabolizma yollarıyla degrade ettiği belirtilmiştir [82, 83]. Bazı ırkların naftalin türevlerini metabolize ettiği bilinse de aktinomisetlerin yoğunlaştırılmış polisiklik aromatikleri verimli bir şekilde parçalaması hakkında çok az araştırma yapılmıştır [84]. *Streptomyces spp.*, karbamaten [85, 868], diazinon [87], bromoksilin [880] gibi parçalanması zor bileşikler degrade edebilmektedir.

Aktinomisetler organoklorin içeren bileşikler parçalayabilmektedirler [89]. *Streptomyces* sp.'in antron tipi boyar maddeleri dekolorize etme yeteneği ve lignoselüloz degradesyonu arasında bir korelasyon olup olmadığı araştırılmıştır [90] ve bazı kanıtlar, streptomisetlerin diğer toprak organizmalarıyla sinerjik etki göstererek, parçalanması zor bileşikler degrade edebildiğini göstermektedir [87, 88].

Ligninde bulunan guaiakol'ün ortama eklenmesi durumunda ise *P. chrysosporium* ve *Streptomyces* sp. türleri tarafından azo boyar maddelerin degradesyonundaki hassasiyetinin arttığı gözlenmiştir [91]. *P. chrysosporium*'un

azo boyar maddeyi 300 ppm [92] ve *Streptomyces* sp.'in ise 50 ppm [93] konsantrasyona kadar degrede edebildiği ve azo boyaların bu organizmalar tarafından parçalanmasının aromatik halkanın yapısına bağlı olarak değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Pasti ve ark. lignoselülitik *Streptomyces spp.*'de azo boyar maddeleri kısmen mineralize etme yeteneğinde olduğunu göstermişlerdir [75].

Paszczynski ve Crawford veratril alkolün, lignin peroksidaz tarafından katalizlenen azo boyar maddelerin oksidasyonuna katıldığını saptamışlardır [94]. Lignin peroksidaz bileşiği I, azo boyar maddeleri okside eder. Lignin peroksidaz bileşiği II oluşturulur ve veratril alkolle indirgenerek enzimin katalitik siklusunun tamamlanmasına yardım eder.

Aerobik koşullar altında azo boyar maddeler bakteriler tarafından etkili şekilde parçalanmamaktadır [19, 95]. Bununla beraber Kulla [96], daha önce karboksile edilmiş azo boyar maddelerde büyümeye adapte edilmiş *Pseudomonas* ırkları için sülfonatlı azo boyar madde degradasyon yollarını açıklamıştır. Daha sonraları Idaka ve ark. [97] *Pseudomonas cepacia* tarafından gerçekleştirilen azo bağlarının indirgenme fizyolojisini açıklamışlar ve asetilasyonla gerçekleşen olayın amino benzenlerle sonuçlandığını bildirmişlerdir. Sülfonatlı azo boyar maddelerin tam olarak degradasyonu, anaerobik-aerobik yöntem kullanılarak tamamlanabilmektedir [20].

Üç azo boyar maddenin (Kongo kırmızı, Orange II, Tropaeolin O) *P. chrysosporium* tarafından aerobik degradasyonu ise ilk kez Cripps ve ark. [98] tarafından açıklanmıştır. Fungal lignin degradasyon sistemi, dekolizasyon prosesi ile bağlantılı olsa da Orange II ve Tropaeolin O dekolizasyonunda ham lignin peroksidaz ilk basamakta gereklidir. Paszczynski ve ark. [99] ligninazın Asit Sarı 9'u substrat olarak tanıırken, Mn(II) peroksidazın diğer azo boyar maddelerin dekolizasyonundan sorumlu olduğunu göstermişlerdir.

Paszczynski ve Crawford [100] *P. chrysosporium* tarafından gerçekleştirilen degradasyona veratril alkol ilave ettiklerinde veratril alkolün üçüncü bir substrat gibi hareket ederek (H₂O₂ ve azo boyar madde ile birlikte) ligninazın azo boyar maddenin oksidasyonunu stimüle ettiğini gözlemlemişlerdir.

1960'ların sonlarına doğru odun parçalayan fungusların fenoloksidaz aktivitesini ölçme teknikleri çok büyük bir önem kazanmıştır [101-103]. Özellikle işaretli C¹⁴ içeren lignin modelinin [104-106] ¹⁴CO₂'e dönüşümü, mikrobiyal lignin metabolizmasının açıklanabilen ilk mekanizması olarak görünmektedir. Ancak bu metot oldukça kompleks ve pahalı olduğundan, Glenn ve Gold (1988) belirli türleri veya ırkları ve polimerik boyar maddeleri kullanarak ligninolitik aktiviteyi saptamayı önermiştir. Bu tip boyar maddelerin dekolorizasyonu, ekstraselüler peroksidazlarla (özellikle Mn peroksidazlarla) bağlantılıdır [107].

Streptomyces chromofuscus A11 tarafından üretilen peroksidazlar azo boyar maddelerin transformasyonunda görev almaktadır [108, 109]. *S. chromofuscus* A11'in degrede ettiği sülfonatlı azo boyar maddeler: azo bağına bağlı *p*-hidroksi grup ve hidroksi gruba bağlı iki *o*-metil grubu içerirler. Sülfonatlı azo boyar maddeler ekstraselüler peroksidaz üreten aktinomisetlerce degrede edilirler [110].

Azo boyar maddelerin degradasyonunda çoğunlukla bakteriler incelenmiştir [111, 112]. Bazı araştırmacılar sistematik olarak bakteriler tarafından gerçekleştirilen azo boyar maddelerin parçalanma mekanizmalarını çalışmışlardır [113-115]. Bu çalışmaların sonunda azo boyar maddelerin degradasyon basamaklarını şu şekilde açıklamışlardır: azo bileşiği-aromatik amin-basit moleküller-azo bağlarının azo redüktazla parçalanması.

Polar ve tahminen polimerik azo bileşiklerin, anaerobik koşullar altında, ara madde katalizli indirgenme reaksiyonu ile lignin benzeri polimerik maddelerin aerobik parçalanması arasında ilginç bir paralellik gözlenmektedir. Daha önceden de belirtildiği gibi lignin peroksidaz ve lakkazın çalışması veratril alkol, mangan iyonları ve 3-hidroksiantranilat gibi ara maddelere bağlıdır [116-118]. Çizelge 2.2'de literatürde bulunan Kristal Violet'in çeşitli organizmalarla parçalanması ile ilgili çalışmalar verilmiştir.

Çok çeşitli bakteri ırkı azo boyar maddeleri anaerobik koşullar altında parçalamaktadır. Bu fenomen için en geçerli hipotez; "birçok bakteriyel hücrenin anaerobik koşullar altında azo boyar maddelerden elektron transferi yapan, spesifik olmayan azo redüktaz üretmelerine dayanmaktadır" şeklinde geliştirilmiştir [119-

121]. Naftalin sülfonatu degrede eden *Sphingomonas sp.* BN6, 2-naftalin sülfatu bir çeşit ara maddeye dönüştürür [122]. Bu redoks ara maddelerinin anaerobik koşullar altında azo boyar maddeleri redoks tepkimelerine katılmalarına teşvik ettiği düşünülmektedir.

Çizelge 2.2. Çeşitli organizmalar tarafından kristal violetin dekolorizasyonu

Organizma	KV kons. (ppm)	Büyüme zamanı (saat)	Dekolorizasyon zamanı (saat)	Dekolorizasyon (%)
<i>Pseudomonas pseudomallei</i> 13NA	20,4	20	120	96
<i>Rhodotorulae rubra</i> & <i>R. sp.</i>	10	24	96	99
<i>P. chrysosporium</i> BKM-F-1767	5	144	6	65
<i>Bacillus subtilis</i> IFO13719	0,852	24	24	100
<i>Nocardia globerula</i>	0,852	24	24	96
<i>N. corallina</i>	0,933	18	1,5	80
<i>P. chrysosporium</i> ME446	5	144	72	62
<i>Coriolus versicolor</i>	5	144	72	92
<i>Funalia trogii</i>	5	144	72	82
<i>Laetiporus sulphureus</i>	5	144	72	86
<i>Cyathus bulleri</i>	29,38	192	96	96,3
<i>Cyathus stercoreus</i>	29,38	192	96	84,7
<i>Cyathus striatus</i>	29,38	192	96	75,5
<i>Phanerochate chrysosporium</i> NCIM1197	20	144	216	92
<i>Phanerochate chrysosporium</i> MTCCno787	5	120	70	90

3. MATERYAL ve METOT

3.1. MATERYAL

3.1.1. Kimyasallar

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

3.1.2. Çalışılan Mikrobiyal Suşlar

Çalışmada kullanılan *Streptomyces* sp. suşlarının tamamı, Dr. Nevzat Şahin ve çalışma arkadaşları tarafından (Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Samsun) topraktan izole edilerek tanımlanmış ve lignoselülitik aktivitelerinin çalışılması için bölümümüze bağışlanmıştır. Bu çalışmada kullanılan mezofilik *Streptomyces* sp. suşları ise *Streptomyces* sp. F2621, *Streptomyces* sp. F3118 ve *Streptomyces* sp. F4880'dir.

3.1.3. Cam Malzemeler

Kullanılan bütün cam malzemeler deterjanla yıkandıktan sonra, önce şehir şebeke suyu ile sonra distile su ile durulanmıştır. Besiyeri içeren erlenler ve mikropipet tipleri otoklavda 121°C'de 0,124 MPa basınç altında 15 dk süre ile steril edilmiştir. Petri kapları ise besiyeri dökülmeden önce Pasteur fırınında 200°C'de 2 saat süre ile steril edilmiştir.

3.1.4. İnkübatörler

Katı kültür ortamların inkübasyonunda Nüve marka EN400 model (Nüve Sanayi Malzemeleri İmalat ve Ticaret A.Ş., Ankara, Türkiye) inkübatör kullanılırken; sıvı kültür ortamların inkübasyonunda J.P. Selecta marka Rotabit model (J.P. Selecta, Barcelona, Spain) orbital çalkalamalı inkübatör kullanılmıştır.

3.1.5. Santrifüjler

Rutin olarak yapılan santrifüjleme işlemleri, Eppendorf marka 5804 model mikrosantrifüj (Eppendorf, Hamburg, Germany) ve Hettich marka 32R soğutmalı model santrifüj ile yapılmıştır.

3.1.6. UV/Visible Spektrofotometre

Örneklerin, dalga boyu taramaları ve absorbans değerlerinin elde edilmesinde Perkin Elmer marka Lambda EZ 210 serisi, UV/Visible spektrofotometre (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, USA) kullanılmıştır.

3.2. METODLAR

3.2.1. *Streptomyces* sp. Suşlarının Kültürü ve Muhafaza Edilmesi

Streptomyces suşları, spor ve hif fragmentlerini içeren bir süspansiyon halinde %20'lik gliserol içinde, -50°C'da muhafaza edilmiştir. Kültürler, rutin olarak Bennet's Agar besiyerine ([123]'dan modifiye edilmiştir) veya ISP4 [124] ekilmiş ve en az 72 saat, sporulasyon meydana gelinceye kadar 28°C'de inkübe edilmiştir.

A. Katı Besiyerleri

i. 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 (1 M) kullanılarak pH 7,0'ye ayarlanmıştır.

ii. 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.
Niğasta 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 (1 M) kullanılarak pH 7,0'ye ayarlanmıştır.

B. Sıvı Besiyeri (MS-YEM)

Streptomyces sp. suşlarının sıvı besiyerlerinde üretimi sırasında 250 mL hacme sahip erlenler kullanılmış olup, sıvı besiyeri hacmi 50 mL ile sınırlı tutulmuştur. Sıvı kültürler için kullanılan besiyerinin bileşimi:

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.
Poly R-478	0,2 g.
İz element solüsyonu	1 mL.
Distile su	1 L.

Amaca uygun şekilde karbon ve enerji kaynağı olarak, yulaf ksilanı [%0,6 (w/v)] veya öğütülmüş 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.

Çevresel koşulların ekstrasellüler enzimlerin üretimi üzerine olan etkilerinin araştırılması sırasında kültür sıvısının pH'ı ve inkübasyon sıcaklıkları amaçlar doğrultusunda değiştirilmiştir.

3.2.2. Substratların 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. İnokulumun Hazırlanması

Organizma sporlarının ve hifsel fragmentlerin, 10 mL steril fizyolojik tuzlu su (FTS) (%0,9'luk NaCl) içindeki süspansiyonu, besiyeri hacminin %2'sine denk gelecek şekilde erlenlere inokule edilmiştir. İnokulasyondan sonra kültürler 28°C'de amaca uygun olarak 10 gün süre ile 150 rpm'de inkübe edilmiştir.

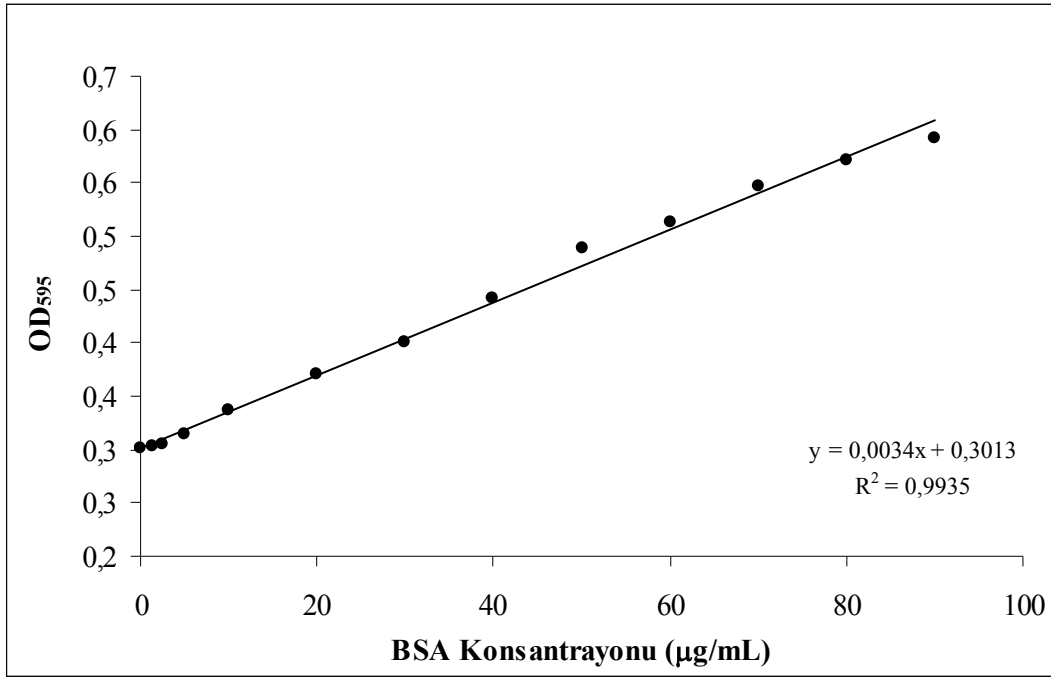
3.2.4. Kültür Sıvısının Toplanması

Kültür sıvısı, biyomas içeren kültür ortamlarının 12 000 g'de 5 dk. santrifüjlenmesi ile elde edilmiştir.

3.2.5. Enzim Preparasyonları ve Ekstrasellüler Protein Miktar Tayini

Ekstrasellüler peroksidaz üretimi ve ekstrasellüler protein miktarının belirlenmesinde, günlük olarak sıvı kültürlerden aseptik koşullar altında alınan (1,5 mL) sıvı 10,000 g'de 5 dk. santrifüjlenmiştir. Berrak hale gelmiş olan kültür sıvısından elde edilen süzöntü, ham enzim preparasyonu olarak kullanılmıştır. Kültür sıvısındaki protein konsantrasyonlarının belirlenmesinde, Bradford protein assey [125] yöntemi kullanılmıştır. Bu işlem sırasında döküntüden alınan 100 µL örnek, 500 µL Bradford solusyonu ve 500 µL saf su ile vorteks yardımı ile karıştırılmış ve 10 dk sonra 595 nm dalga boyundaki optik yoğunluk değeri kaydedilmiştir.

Protein konsantrasyonlarının tayini sırasında kullanılan protein standart eğrisi (Şekil 3.1.) ise bovin serum albuminin (BSA) 0,0-90,0 µg / mL arasında değişen farklı konsantrasyonları ile elde edilmiştir.



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

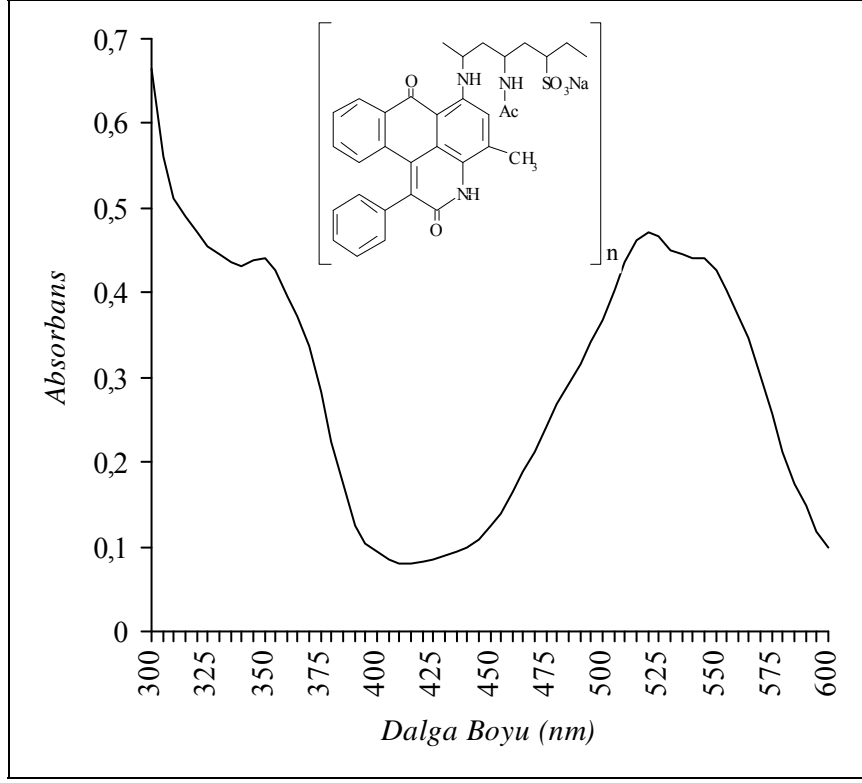
3.2.6. Peroksidaz Aktivitesinin Tayini

Peroksidaz aktivitesi, substrat olarak 2,4-DCP [126] 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 45 °C'da (sıcaklık çalışmaları sırasında 40-90°C arasında değişen sıcaklıklarda) 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.

3.2.7. İnkübasyon Süresinin Renk Giderimi Üzerine Etkisi

Bu çalışmada kullanılan Poly R-478'in *Streptomyces* sp. suşlarının büyüme kinetikleri ile olan ilişkisinin belirlenmesi amacıyla, boya içerene sıvı besiyerine inoküle edilen mikroorganizmaların inkübasyonuna 10 gün boyunca devam edilmiştir. 10 Günlük inkübasyon periyodu boyunca, 24 saat aralıklarla alınan sıvı kültür örneği ise spektrofotometrik olarak incelenmiştir. Poly R-478'in UV/Vis. ışık spektrumundaki absorban taraması ise boyanın 348 nm ve 520 nm dalga boylarında olmak üzere iki farklı bölgede maksimum absorban gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Polimerik bir boya olan Poly R-478'in (%0,004 w/v) görünür ışık bölgesindeki absorbans taraması. İçte ise boyanın kimyasal yapısı verilmektedir.

Poly R-478 boyar maddesinin renginin giderilmesi ise maksimum absorbans gösterdiği iki dalga boyunun oranı ($A_{520/348}$) olarak ölçülmüştür. Bu iki dalga boyu ise Poly R-478'in dıgredasyonu esnasında meydana gelen absorbsiyon değişikliğindeki en büyük oranı vermesinden dolayı seçilmiştir. Kültür sıvısından bulunan boyar maddenin bir kısmının hücreler tarafından absorplanması ve bunun sonucunda da absorbansın düşmesi nedeni ile renk gideriminin ölçülmesi, iki pikin oranı olarak ele alınmıştır.

3.2.8. Kültür pH'sının Renk Giderimi Üzerine Olan Etkisi

Streptomyces sp. F2621, *Streptomyces* sp. F3118 ve *Streptomyces* sp. F4880 suşları tarafından gerçekleştirilen renk giderimi üzerine, kültür pH'sının etkisini belirlemek için organizmalar, pH değerleri 5,0-9,0 arasında değişen, karbon ve enerji kaynağı olarak sadece Poly R-478 (% 00.2 w/v) içeren MS-YEM sıvı besiyerinde, 28

°C’de 96 saat süreyle, 150 rpm’de inkübe edilmişler. İnkübasyon süresinin sonunda sıvı kültürlerden alınan örnekler, renk yoğunluğu bakımından spektrofotometrik olarak analiz edilmiştir. Tüm çalışmalar üçer tekrarlı olarak yapılmış ve tekrarlamalı sonuçların aritmetik ortalamaları alınmıştır.

3.2.9. Farklı Karbon Kaynaklarının Renk Giderimi Üzerine Olan Etkisi

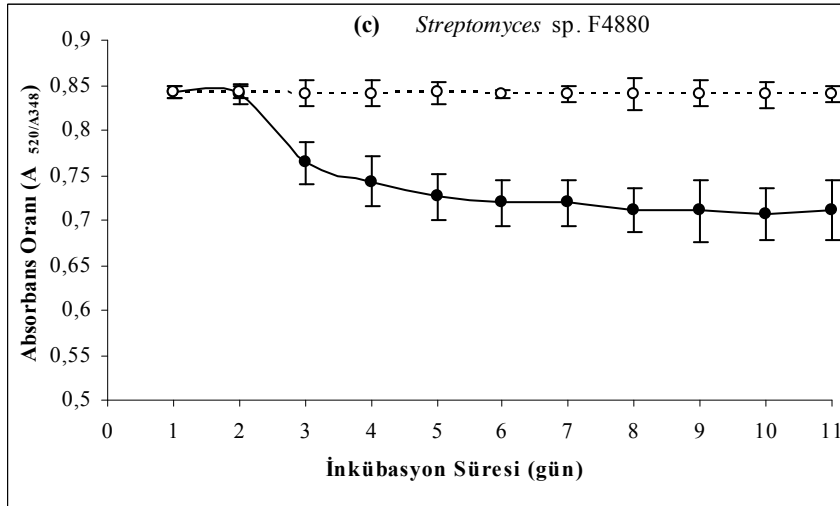
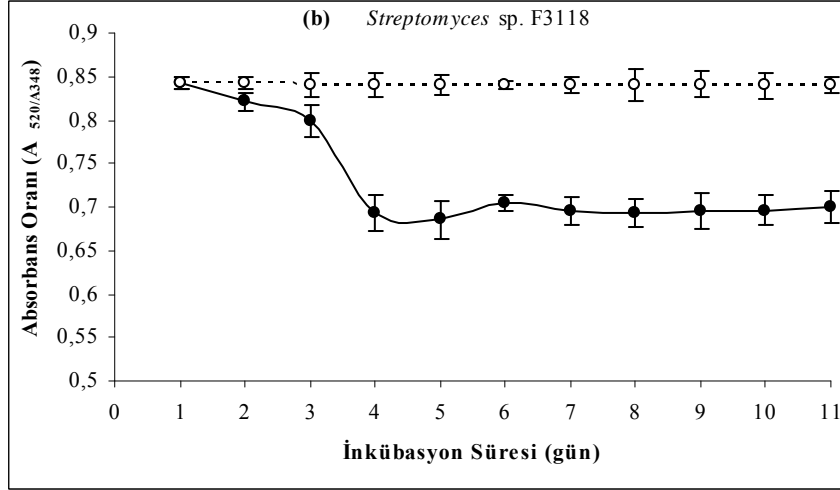
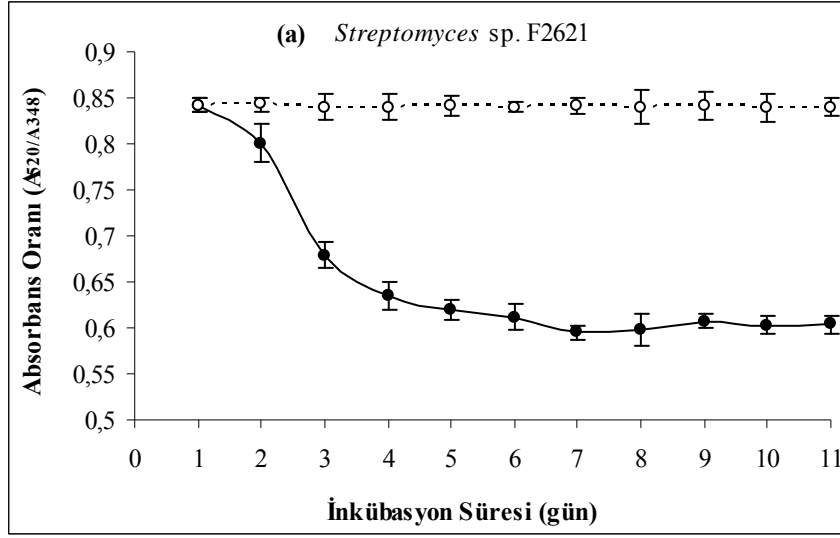
Streptomyces sp. F2621, *Streptomyces* sp. F3118 ve *Streptomyces* sp. F4880 suşlarının, farklı karbon ve enerji kaynaklarının üzerinde büyümeleri sırasındaki renk giderim aktivitelerinin belirlenmesi için organizmalar, Poly R-478’e ilaveten, % 0,6 (w/v) oranında öğütülmüş buğday samanı veya glikoz (10 g/L) içeren sıvı MS-YEM besiyerlerinde 30 °C’de, 10 gün süreyle, 150 rpm’de inkübe edilmişler. İnkübasyon süresi boyunca, 24 saat aralıklarla sıvı kültürlerden alınan örnekler renk yoğunlukları için analiz edilmiştir. Tüm çalışmalar üçer tekrarlı olarak yapılmış ve tekrarlamalı sonuçların aritmetik ortalamaları alınmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. İnkübasyon Süresinin Renk Giderimi Üzerine Etkisi

Bu çalışmada öncelikle toprak kaynaklı olan mezofilik *Streptomyces* sp. suşları tarafından fenolik bir yapıya sahip olan Poly R-478 boyar maddesinin renginin giderilmesi ile mikroorganizmaların büyüme kinetikleri arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla, boya içeren sıvı besiyerlerinde mikroorganizmaların 10 günlük inkübasyonları gerçekleştirilmiştir. 10 Günlük inkübasyon periyodu boyunca, 24 saat aralıklarla alınan sıvı kültür numuneleri ise hem renk yoğunluğunun kaybolup kaybolmadığını, hem de kültür sıvısı içerisindeki ekstrasellüler peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi için analize tabi tutulmuştur. Kültür sıvısından alınan numunelerin renk yoğunlukları ise spektrofotometrik olarak Poly R-478'in maksimum absorbans gösterdiği 348 nm ve 520 nm dalga boylarındaki absorbanslarının belirlenmesi ile ölçülmüştür.

Karbon ve enerji kaynağı olarak sadece polimerik bir boya olan Poly R-478'in varlığında, *Streptomyces* sp. suşları normal gelişimlerini göstererek inkübasyon süresinin 3.-4. günlerinde maksimum biyokütle ulaşmıştır (Şekil 4.1). Biyokütle oluşumuna paralel olarak çalışmada kullanılan *Streptomyces* sp. suşlarının sağlamış oldukları renk giderim profilleri ise detayda bazı farklılıklar bulunsa da genel profilleri birbirine benzemektedir. Renk gideriminin özellikle *Streptomyces* sp. suşlarının büyüme kinetiklerinin ekponansiyel büyüme fazına denk gelmesi, büyüme fazının sona ermesi ile birlikte durgun ve ölüm fazları boyunca görülen renk giderimlerinin de kararlı bir şekilde sabit kaldığı görülmektedir. Renk giderimlerinin özellikle ekponansiyel büyüme fazında meydana gelmesi ise çalışmada kullanılan *Streptomyces* sp. suşlarının boya maddenin dekolorizasyonundan sorumlu olan metabolik sistemlerinin birincil metabolizmada rol aldığına işaret etmektedir. Organizmaların büyümeleri sırasında gerekli olan enerjinin ve karbonun temin edilebilmesi için gerekli olan metabolik yollar çalıştırılarak yapısal enzimlerin üretilmesi sonucunda boya maddenin parçalanması gerçekleştiriliyor olabilir. *Streptomyces* sp. suşları ise büyüme fazlarının sonuna ulaşmış, durgun faza geçtiklerinde ise daha fazla enzim üretmediklerinden olsa gerek boya maddenin daha fazla parçalanması gerçekleştirilememektedir.



Şekil 4.1. *Streptomyces* sp. F2621, *Streptomyces* sp. F3118 ve *Streptomyces* sp. F4880 suşlarının 10 günlük inkübasyon süresince göstermiş oldukları renk giderim aktiviteleri.

On günlük inkübasyon sonunda elde edilen grafiklerde de görüldüğü üzere (Şekil 4.1) her üç organizma da Poly-R478'i büyüme kinetiklerinin eksponansiyel fazında maksimum oranda parçalamaktadırlar. Absorbanstaki azalışın maksimum olduğu aralıklar; *Streptomyces* sp. F2621 için 2. ve 3.; *Streptomyces* sp. F3118 için 3. ve 4. ve *Streptomyces* sp. F4880 için ise 3. ve 4. günler arasındadır. Absorbanstaki azalışın minimum olduğu aralıklar ise büyüme kinetiklerinin durağan fazında gerçekleşmiş olup, bu aralıklar sırayla *Streptomyces* sp. F2621 için 6-7., *Streptomyces* sp. F3118 için 6-7. ve *Streptomyces* sp. F 4880 için 7-8. günler arasındadır.

Çalışılan 3 organizma içinde boyayı en iyi parçalayan organizma ise *Streptomyces* sp. F2621 olarak saptamıştır. Başlangıçta absorban oranının değeri 0,842 iken (%100) 10. gün sonunda bu değer 0,603'e (%71) düşmüştür. Fakat boya degradasyonunun inkübasyon süresine göre en verimli olduğu aralık ise inkübasyonun 0-3. günleri arasında olup, 3. günün sonundaki degradasyon verimi %29 olarak hesaplanmıştır. *Streptomyces* sp. F2621'den sonra Poly-R478'i en iyi parçalayan organizma ise *Streptomyces* sp. F3118 olmuştur. Bu organizma için 10. günde absorban oranının değeri 0,701 olarak (%83) ölçülmüştür. Dolayısıyla *Streptomyces* sp. F3118 suşunun en verimli olduğu süre de yine inkübasyon süresinin 3. ve 4. günlerinde olup, bu günlerdeki verimi yaklaşık olarak %18 olarak gerçekleşmiştir. Boyayı en az parçalayan organizma ise *Streptomyces* sp. F4880'dir. Bu organizma için 3. günde ölçülen absorban değeri 0,743 iken (%12 verim) 10. günde ise 0,707 (%16 verim) dir. Her ne kadar *Streptomyces* sp. F3118 ve *Streptomyces* sp. F4880'in 10. gündeki absorban oranları birbirine yakın olsa da, *Streptomyces* sp. F3118'nin eksponansiyel fazda boyayı parçalama oranı *Streptomyces* sp. F4880'e göre daha fazladır.

Pasti ve Crawford [48], streptomiset ile yaptıkları çalışmada Remazol Brilliant Blue R, Poly-B411 ve Poly-R478'i dekolorize etmişlerdir. Elde ettikleri verileri *P. chrysosporium* ile kıyasladıklarında, streptomiset suşların boyaları parçalamada funguslar kadar başarılı olmadıklarını saptamışlardır. Bu çalışma esnasında boyaların (RBBR ve Poly-B411) ve lignoselülozun parçalanması arasında bir korelasyonun olduğu gözlenmiştir. Lignoselülozun degradasyonunun daha fazla olduğu streptomiset suşlarıyla yapılan çalışmada renk gideriminin daha etkili şekilde gerçekleştiği gözlenmektedir [48].

Poly-R478'in parçalanması ile lignoselüloz degradasyon aktivitesi arasında çok zayıf bir korelasyon olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda aynı açıklama, Ball ve ark. [46] tarafından *S. badius* 252 için yapılmış ve Poly-R dekolizasyonu ile ligninolitik aktivitesini ölçmek amacıyla kullanılan yöntemlerin (veriatril alkol ile oksidasyon, şirincik veya kumarik asit kullanımı, APPL üretimi) hiçbiri arasında korelasyon bulunmadığı saptanmıştır [46].

Pasti ve Crawford [48], bir çalışmada kara turp peroksidaz (HRP) tip-2 ile Poly-R478'i inkübe ettiği zaman, RBBR ve Poly-B411'in aksine hiçbir şekilde dekolizasyonun gerçekleşmediğini gözlemlemiştir. Aynı zamanda Mn(II) peroksidazın da bu boyayı minimum koşullarda parçalığı belirlenmiştir [48].

Barbosa ve Hardy [127], 3 askomiset; *Aspergillus* sp., *Botryosphaeria* sp. ve *Conichaeta* sp. ile yaptıkları çalışmalarda ise her üç organizmanın da %0,01 (w/v) Poly-R478'i inkübasyonun 4. gününde tamamen dekolize ettiklerini saptamışlardır. Bütün funguslar, ilk olarak boyayı misellerine adsorbe etmişler ve daha sonra tamamen parçalamışlardır. *Aspergillus* sp. izolatları ile yapılan bir çalışmada ise bu izolatların Poly-R478'i dekolize ederken lakkaz, MnP veya LiP üretmedikleri, dolayısı ile boya dekolizasyonu ile ligninin parçalanması arasında bir korelasyonun bulunmadığı rapor edilmiştir.

4.2. Kültür pH'sının Renk Giderimi Üzerine Olan Etkisi

Çalışmada kullanılan *Streptomyces* sp. suşları ile Poly R-478'in renginin giderilmesinin yanı sıra, bu organizmaların ligninolitik ekstraselüler enzimlerinin üretimi üzerine kültür pH'sının etkisinin belirlenmesi, kültür ortamının pH'sı 5,0 ile 9,0 arasında ayarlanarak incelenmiştir. Çalışmada karbon ve enerji kaynağı olarak %00,2 (w/v) Poly R-478 içeren MS-YEM besiyeri büyüme ortamı olarak kullanılmış ve inkübasyon 30°C sıcaklıkta, 150 rpm'de, 96 saat süreyle gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmalar sırasında kullanılan bütün *Streptomyces* sp. suşları, en yüksek dekolizasyon aktivitelerini pH 7,0-9,0 aralığında göstermelerine rağmen, elde edilen en yüksek dekolizasyon aktivitesi ise *Streptomyces* sp. F2621 tarafından pH 8,0'de sergilenmiştir. pH 8,0'de göreceli olarak %100 olan bu suşun dekolizasyon

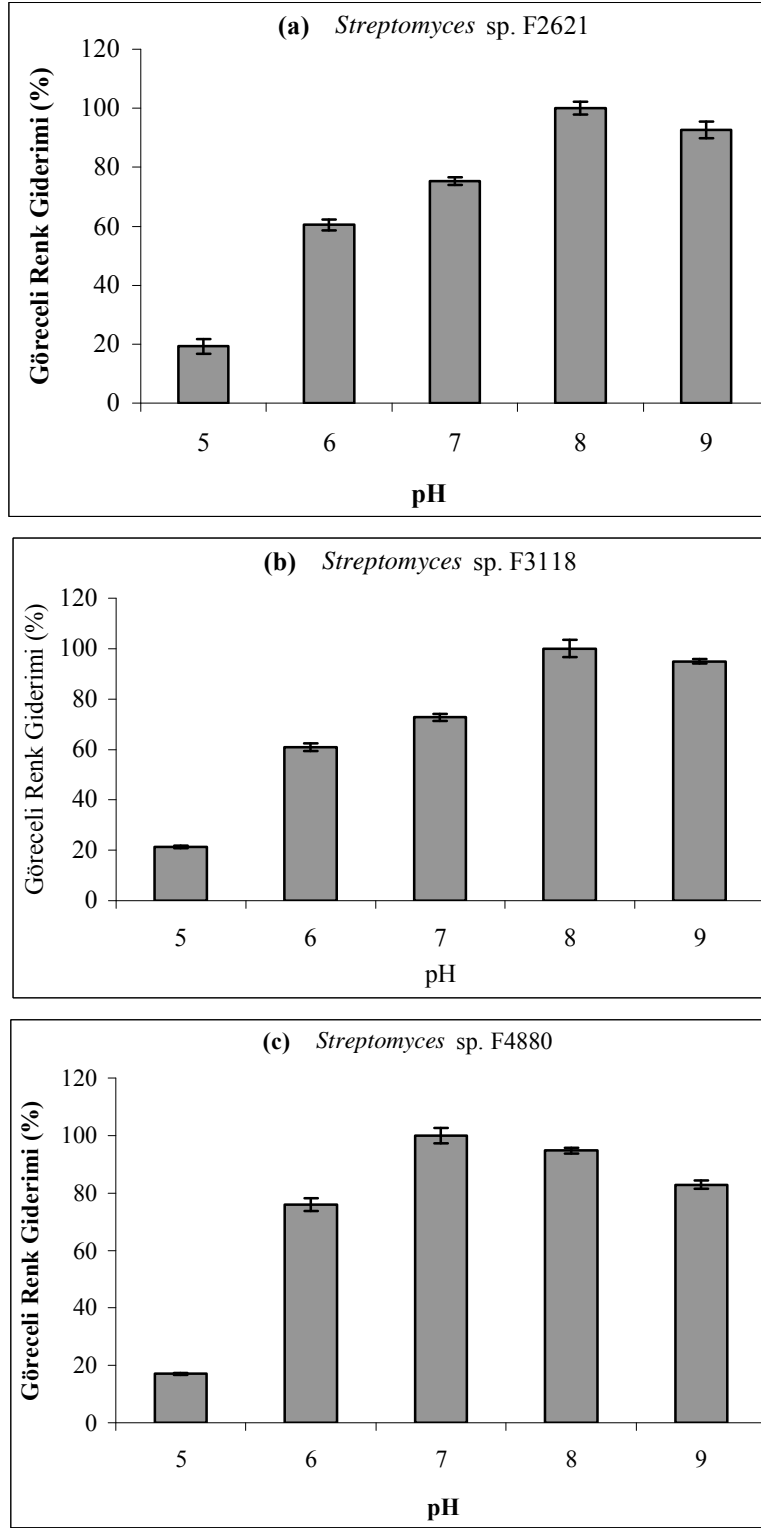
aktivitesi pH 9,0'da %92,60'a düşerken, pH 5,0'de ise %19,23'e kadar gerilemiştir (Şekil 4.2, a).

Streptomyces sp. F3118 tarafından üretilen en yüksek göreceli dekolorizasyon aktivitesi de *Streptomyces* sp. F2621'de olduğu gibi pH 8,0'de belirlenmiştir (Şekil 4.2, b). Bu suşun pH 9,0'daki göreceli dekolorizasyon aktivitesi %95,00'e gerilerken pH 5,0'de daha büyük bir düşüş gerçekleşmiş ve göreceli dekolorizasyon aktivite %21,30'a gerilemiştir (Şekil 4.2, b).

Streptomyces sp. F4880 ise *Streptomyces* sp. F2621 ve *Streptomyces* sp. F3118'den farklı olarak optimum dekolorizasyon aktivitesini pH 7,0'de göstermiştir (Şekil 4.2, c). *Streptomyces* sp. F4880'in pH 5,0'deki dekolorizasyon aktivitesi ise göreceli olarak %17,11'e gerilemiştir. *Streptomyces* sp. F4880 tarafından sergilenen göreceli dekolorizasyon verimlilikleri ise pH 8,0'de %94,74; pH 9,0'da ise %82,89 olarak gözlenmiştir.

Aksu ve Dönmez [128] tarafından *Candida lipolytica* ile yapılan bir çalışmada ise bu organizmanın Remazol Brilliant Blue R'yi pH 2'de maksimum verimlilikle parçaladığı rapor edilmiştir.

Chen ve Liou [129] ise bakteriler üzerinde yaptıkları çalışma sonrasında *Aeromonas hydrophila*'nın aerobik ortamda iyi üreme göstermesine rağmen, bu bakterinin maksimum renk giderimini anaerobik koşullarda gerçekleştirdiğini rapor etmişlerdir. *Aeromonas hydrophila*'nın tekstil sanayinde sıklıkla kullanılan boyalardan biri olan Red RBN'nin 3000 mg/L konsantrasyonunu, 8 gün içinde %90 oranında parçaladığı belirlenmiştir. Bu çalışmada uygun pH da araştırılmış ve sonuçta *Aeromonas hydrophila*'nın pH 5,5 ile pH 10 arasında maksimum renk giderimi sergilediği belirlenmiştir. Buna ek olarak kültür ortamının pH'sı 4,5'e ayarlandığında ise organizmanın boyayı tamamen adsorbe ettiğini bildirmişlerdir.



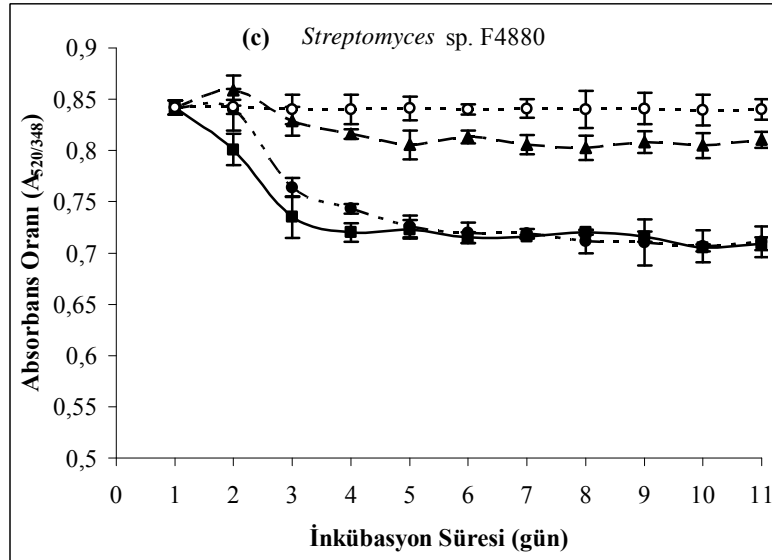
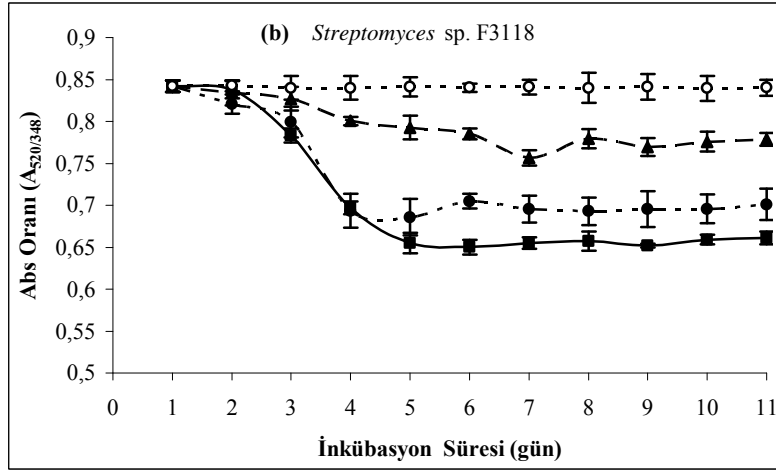
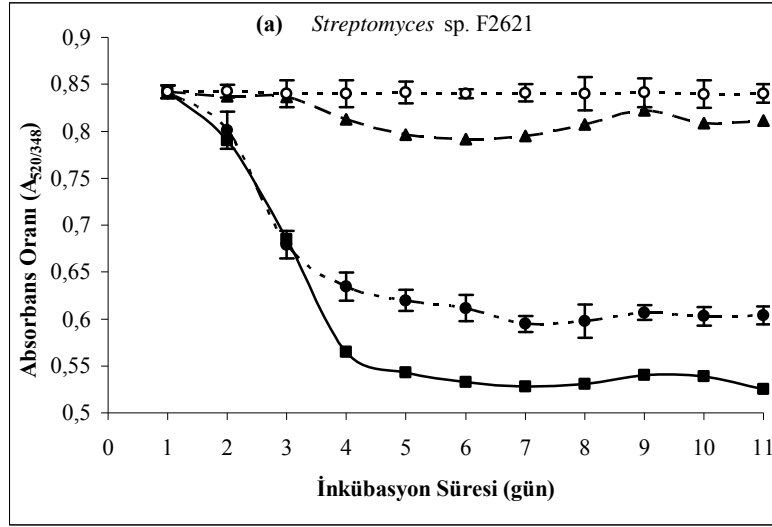
Şekil 4.2. Farklı pH koşulları altında 96 saatlik inkübasyon sonrası *Streptomyces* sp. suşlarının sergiledikleri göreceli renk giderim aktiviteleri.

Zhang ve ark. [130] tarafından yapılan bir çalışmada ise beyaz çürükçül funguslarla renk gideriminde, optimum pH aralığının 4 ile 5 arasında olduğu rapor edilmiştir. Radha ve ark. [131] tarafından yapılan bir başka çalışmada ise *P. chrysosporium* ile 7 farklı boyar maddenin renk giderimi araştırılmıştır. Bu çalışmada, optimum pH'nın saptanması amacıyla 2,0 ile 7,0 arasında değişen pH'lar çalışılmış ve kullanılan boyar maddelerden 4'ünün pH 5.,0'de, 2'sinin ise pH 2,5'de, birisinin ise pH 3,0'de dekolorize edildiği rapor edilmiştir.

4.3. Farklı Karbon Kaynaklarının Renk Giderimi Üzerine Olan Etkisi

Farklı karbon kaynaklarının renk giderimi ve ekstraselüler lignoselülitik enzimlerin üretimi üzerine olan etkisini araştırmak için, karbon ve enerji kaynağı olarak sadece Poly R-478 veya bu boyaya ilaveten öğütülmüş buğday samanı (%0,6; w/v) ya da glukoz (10 g/L) içeren MS-YEM besiyeri kullanılmıştır. Karbon kaynaklarına ilaveten Poly R-478 içeren sıvı besiyerleri inoküle edilerek, organizmalar 30 °C sıcaklıkta, 150 rpm'de, 96 saat süreyle inkübe edilmişlerdir. Kontrol olarak kullanılan besiyerlerine ise inokülasyon yapılmamış olup, besiyeri steril olarak inkübe edilmiştir.

Lignoselüloz olarak öğütülmüş buğday samanı kullanılarak yapılan indükleme çalışmaları sırasındaki en yüksek renk giderim aktivitesi, *Streptomyces* sp. F2621 tarafından, %0,6 (w/v) saman içeren kültür ortamında belirlenmiştir (Şekil 4. 3, a). *Streptomyces* sp. F2621 tarafından sergilenen renk giderim aktivitesi ise inkübasyon süresinin 4. gününden sonra en yüksek düzeye ulaşmıştır. Organizmanın bu konsantrasyonda sergilediği renk giderim aktivitesi (%38), aynı zamanda tüm çalışmalar boyunca belirlenen renk giderim aktivitesi için kaydedilen en yüksek değer olmuştur. Bununla beraber, organizmanın karbon kaynağı olarak sadece Poly R-478 içeren ortamdaki renk giderim aktivitesi %30 iken, 10 g/L glikoz içeren sıvı ortamdaki renk giderim aktivitesi ise ancak %6 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.3. Farklı karbon kaynaklarının varlığında *Streptomyces* sp. suşlarının göstermiş oldukları renk giderim aktiviteleri. Poly R-478 (●); Poly R-487 + Öğütölmüş buğday samanı (■); Poly R-487 + Glukoz (▲) ve kontrol (○).

Streptomyces sp. F3118'in en yüksek renk giderim aktivitesi sergilediği karbon kaynağı da *Streptomyces* sp. F2621 de olduğu gibi saman üzerinde belirlenmiş ve bu suşun renk giderim aktivitesinin verimi inkübasyon süresinin 5. gününden itibaren en yüksek düzeye ulaşmıştır (Şekil 4.3, b). *Streptomyces* sp. F3118 tarafından gösterilen renk giderim aktivitesi ise 5. günde %16 olarak hesaplanmıştır. Bununla beraber, organizmanın karbon kaynağı olarak sadece Poly R-478 içeren ortamdaki renk giderim aktivitesi %13 iken, 10 g/L glikoz içeren sıvı ortamdaki renk giderim aktivitesi ise ancak %7 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.3, b).

Streptomyces sp. F4880'in ise karbon kaynağı olarak öğütülmüş buğday samanı ile desteklenmesi durumunda sergilediği en yüksek renk giderim aktivitesi ise karbon kaynağı olarak sadece Poly R-478 içeren ortamdaki ile benzer şekilde sonuçlanmıştır. Bu nedenle *Streptomyces* sp. F4880'in gösterdiği renk giderim aktivitesi hem saman varlığında hemde yokluğunda inkübasyonun 5. gününde %15 olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4.3, c). Buna rağmen glikoz içeren ortamda *Streptomyces* sp. F4880'in sergilediği renk giderim aktivitesi ise ancak %4 civarında tesbit edilebilmiştir.

Çalışmalarda kullanılan *Streptomyces* sp. F2621, *Streptomyces* sp. F3118 ve *Streptomyces* sp. F4880'in üçünün de en yüksek renk giderim aktiviteleri, %0,6 (w/v) saman konsantrasyonuna sahip besiyerinde tespit edilmiş ve bu konsantrasyondaki renk giderim aktiviteleri her üç suş için sırası ile %38, %13 ve %15 olmuştur. Buna rağmen karbon kaynağı olarak glikozun varlığı ise her üç suş için de renk giderim aktivitesindeki verimi düşürmüştür. Hatta glikozun varlığı, karbon kaynağı olarak sadece Poly R-478'in bulunması durumunda elde edilen renk giderim verimlerinden daha düşük seviyelerde gerçekleşmiştir.

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, lignoselüloz degrade eden *Streptomyces* sp. F2621, *Streptomyces* sp. F3118 ve *Streptomyces* sp. F4880 suşlarının büyümesi ve lignoselüloz degrade eden ekstrasellüler peroksidaz aktivitelerinin üretimi, 30 °C'da 10 gün boyunca incelenmiştir (Şekil 4.4). Bu üç suş tarafından ekstrasellüler

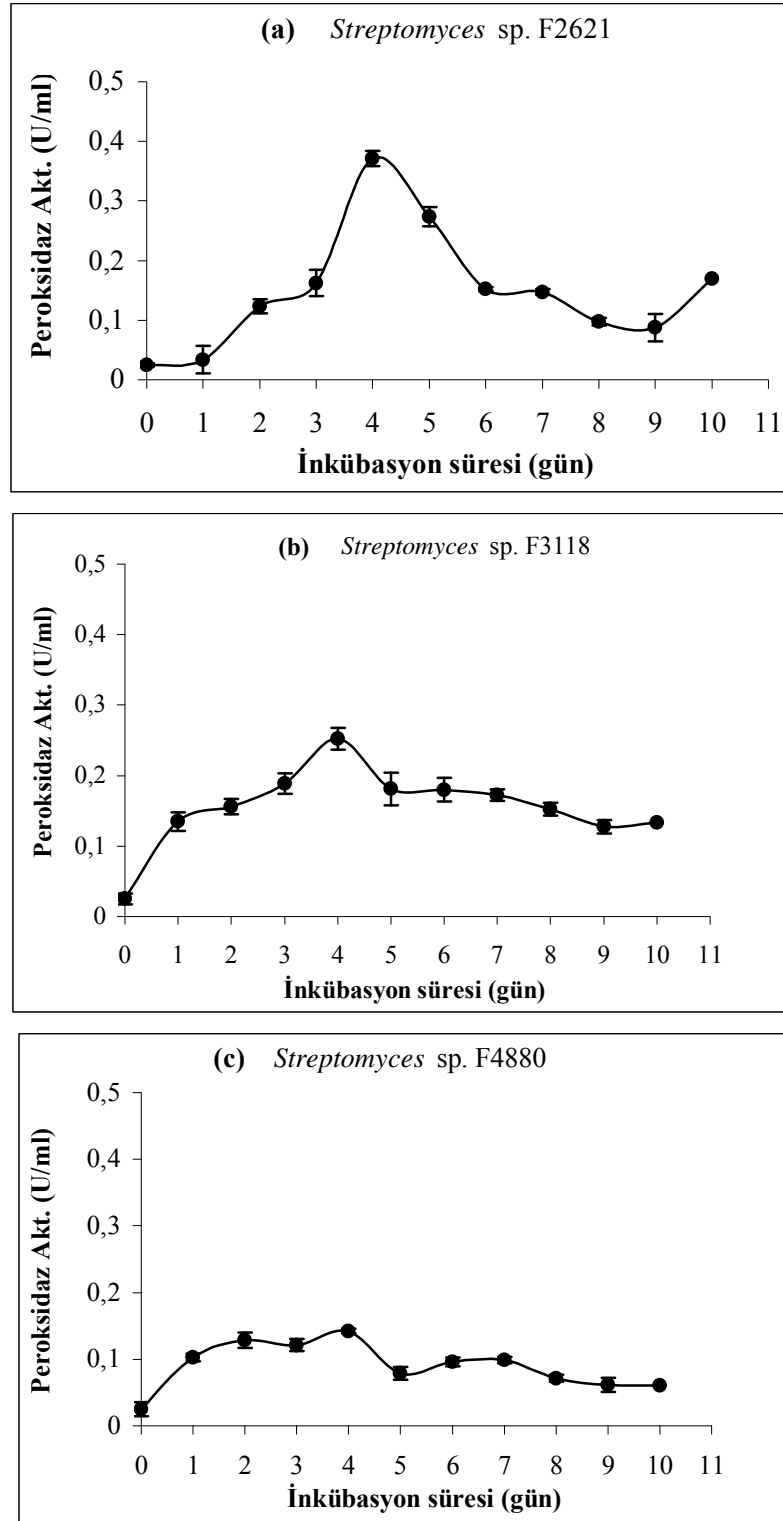
peroksidaz üretimi, organizmaların logaritmik büyüme fazı (genellikle 3-4. günler arası) boyunca belirgin bir şekilde artış göstererek, durgun fazın başlangıcında maksimum düzeylerine ulaşmıştır. Durgun faz dönemi ile birlikte (5. gün) ekstrasellüler peroksidaz enzimlerin kültür sıvısındaki konsantrasyonlarında ise belirgin bir düşüş başlamış ve daha sonra ölün fazı süresince (6-10. günler) sabit biçimde ilerlediği gözlenmiştir.

İnkübasyonun devam ettirildiği 10 günlük periyotta, en yüksek peroksidaz aktivitesini (0,371 U/mL) *Streptomyces* sp. F2621 suşu, inkübasyonun 5. gününde gösterirken (Şekil 4.4. a), bu aktivite inkübasyonun 10. gününde minimum seviyeye (0,098 U/mL) ulaşmıştır. *Streptomyces* sp. F2621 suşu tarafından sergilenen renk giderim aktivitesinin de inkübasyon süresinin 5.-6. gününde en yüksek düzeye ulaşmış olması, bu suş tarafından gerçekleştirilen renk giderim aktivitesi ile ligninolitik bir enzim olan peroksidaz arasında bir ilişkinin olabileceğine işaret etmektedir.

Streptomyces sp. F3118 suşu, en yüksek peroksidaz aktivitesini (0,253 U/mL) logaritmik büyüme fazın 4. gününde göstermiştir (Şekil 4.4, b). Peroksidaz aktivitesinin minimum (0,128 U/mL) düzeye ulaşması ise inkübasyon periyodunun 9. gününde gerçekleşmiştir. *Streptomyces* sp. F3118 suşu tarafından sergilenen renk giderim aktivitesinin de *Streptomyces* sp. F2621’de olduğu gibi inkübasyon süresinin 5. gününden sonra en yüksek düzeye ulaşmış olması, bu suş tarafından gerçekleştirilen renk giderim aktivitesi ile lignoselüolitik enzim aktivitesi arasında bir ilişkinin olabileceğine işaret etmektedir.

Streptomyces sp. F4480 suşu ise en yüksek peroksidaz aktivitesini (0,147 U/mL) diğer iki suşta olduğu gibi logaritmik büyüme fazın 4. gününde göstermiştir (Şekil 4.4, c). Peroksidaz aktivitesinin minimum (0,060 U/mL) düzeye ulaşması ise inkübasyon periyodunun 9.-10. günlerinde gerçekleşmiştir. *Streptomyces* sp. F4880 suşu tarafından sergilenen renk giderim aktivitesinin de *Streptomyces* sp. F2621 ve *Streptomyces* sp. F3118’de olduğu gibi inkübasyon süresinin 5. gününden sonra en yüksek düzeye ulaşmış olması, bu çalışmada kullanılan ve doğal olarak toprakta bulunan ve lignoselüolitik aktivite gösterdikleri bilinen bu suşlar tarafından

gerçekleştirilen renk giderim aktivitesi ile liginoselülolitik enzim aktivitesi arasında bir ilişkinin olabileceğine işaret etmektedir.



Şekil 4.4. Büyüme kinetiğine bağlı olarak 10 günlük inkübasyon süresince *Streptomyces* sp. suşları tarafından üretilen peroksidaz aktivitelerinin (-●-)zamana bağlı değişimi.

Heinfling ve ark. [132] tarafından yapılan bir çalışmada ise *Phanerochaete chrysosporium* ve *Bjerkanda adusta* ile Reactive Blue 38, Reactive Violet 5, Reactive Black 5, Reactive Orange 96 ve Reactive Red 198'in degradasyonu incelenmiş ve boya ların *P. chrysosporium* tarafından üretilen MnP ve *B. adusta* tarafından üretilen LiP ile hemen hemen hiç okside olmadığı gözlemlenmiştir. Ancak ortama veratril alkol eklendiği zaman spesifik aktivitenin 3,9'dan 9,6 U/mg'a yükseldiği saptanmıştır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, tekstil fabrikalarında yaygın olarak kullanılan Poly R-478 boyar maddesinin üç *Streptomyces* sp. suşu tarafından sıvı kültür ortamında 10 günlük inkübasyonu boyunca renk giderim verimlilikleri ile bu suşlar tarafından üretilen ekstrasellüler peroksidaz arasındaki ilişki belirlenmeye çalışılmıştır.

Tekstil fabrika sularının verildiği ortamlarda çevre kirliliği oluşmaktadır. Bunun sonucunda doğal flora ve fauna yok olmaktadır. Çevre kirliliğinin önlenmesi için boyar maddelerin çeşitli yöntemlerle ortamdaki uzaklaştırılması zorunludur. Daha önceden de belirtildiği gibi boyar maddeler ortamdaki uzaklaştırılmasında çeşitli yöntemler geliştirilmiş bulunmaktadır. Ancak her hangi bir boyama işlemi esnasında birden çok ve yapıları birbirinden oldukça farklı boyar madde bir arada kullanıldığından, tek bir metot yeterli olamamaktadır. Aynı zamanda kullanılan fiziksel ve kimyasal metotlar, çok fazla atık oluşturduklarından ve ana maliyetleri yüksek olduğundan, daha ekonomik ve daha az atık oluşturan yöntemler geliştirilmek zorunda kalmıştır. Bunun başında ise biyolojik yöntemler gelmektedir. Yine de çok fazla boyar madde bir arada kullanıldığı için bu yöntem de yeterli değildir. Etkili bir arıtım için çoğunlukla anaerobik ve aerobik prosesler bir arada kullanılmaktadır.

Yapılan çalışmalardan ve araştırmalardan anlaşılacağı üzere, boyar maddelerin aerobik degradasyonunda kullanılan ligninazları stimüle etmek için veratril alkol ve guaiakol gibi bileşikler kullanılmaktadır. Anaerobik proseslerde ise azo redüktaz boyar maddelerin parçalanmasından sorumludur.

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 üretilebilmesi için gerekli olan çevresel koşulların araştırılarak, daha verimli proseslerin geliştirilmesi için çalışmalar yapılmalıdır.

Bu tezle ortaya konulan çalışmada, izole edildikleri ortamlar göz önüne alındığında, iyi derecede lignoselüloz degradasyonu potansiyeline sahip olabilecekleri düşünülen üç *Streptomyces* sp. suşu seçilmiştir. Bu üç suşun lignoselüloz degradasyonunda rol alan ekstraselüler enzimlerinin üretim seviyeleri ise inkübasyon ortamının pH'nın ve sıcaklığının değiştirilmesinin yanı sıra, farklı karbon kaynaklarının farklı konsantrasyonlarının kullanılması ile daha önce yapılmış olan çalışmalar ile optimize edilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda ekstraselüler lignoselüloolitik enzimlerin (endoglukanaz, endoksilanaz ve peroksidaz) üretiminin, primer metabolizma sırasında gerçekleşmiş olduğu; endoksilanaz ve peroksidaz aktivitelerinin en yüksek sekresyon değerlerine ise logaritmik büyüme fazının sonunda ulaştıkları belirlenmiştir.

Bu çalışmalar sonrasında, çalışılan suşların ekstraselüler lignoselüloolitik enzim aktivitelerinin en yüksek değerlerine inkübasyonun 4-5. günlerinde ulaştıkları ve buna paralel olarak aynı suşların gösterdikleri renk giderim aktivitelerinin de aynı dönemlerde gerçekleştiği belirlenmiştir.

Her yeni teknolojiye olduğu gibi, enzim teknolojilerinin de geleneksel endüstride kabul görebilmesi için çeşitli koşulların sağlanması gerekmektedir. Bu koşullar (sistemin hayata geçirilmesi için başlangıçta yapılması gereken yatırımı ve daha sonrasında işletim maliyetini içerisine alan) prosesin ekonomik olarak uygulanabilirliğini, daha uygun alternatiflerin olmamasını ve enzimler tarafından sağlanan avantajların diğer yöntemlerle kıyaslandığında tercih edilmesini sağlayacak derecede eşsiz olmasını içerir.

6. 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] Chung, K.T. and Stevens, S.E. “Degradation of Azo Dyes by Environmental microorganisms and Helminths”, *Environ. Toxicol. and Chem.* **12**: 2121-2132, (1993)
- [4] Wong, P.K. and Yuen, P.Y. "Decolorization and Biodegradation of Methyl Red by *Klebsiella pneumoniae RS-13*", *Water Res.*, 30: 1736-1744, (1996).
- [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 posible 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] Banat, I.M., Nigam, P., Singh, D. and Marchant, R. “Microbial Decolorization of Textile Dye-Containing Effluents: A Review”, *Bioresource Technology*, **56**: 217-227 (1996)
- [9] Harmer, C. and Bishop, P. “Transformation of Azo Dye AO-7 by Wastewater Biofilms”, *Water Science and Technology* –636, (1992)
- [10] Seventekin, N. “Boyar Madde Kimyasına Giriş”, Bornova-İzmir, (1988)
- [11] Başer, İ. ve İnanıcı, Y. Marmara Üniversitesi Yayın No: 482. Teknik Eğitim Fakültesi Yayın No: 2, (1990)
- [12] Kurbanova, R., Mirzaoğlu, R., Ahmedova, G., Şeker, R. ve Özcan, E., “Boya ve Tekstil Kimyası ve Teknolojisi”, 1. Baskı, Konya. (1998).
- [13] Çoban, S. , "Neden Eko Tekstil", *Eko Tekstiller Eki*, Yıl 5, Sayı 1, (1995)
- [14] Demircanlı, Ü., "Ekolojik Üretim ve Çevre İlişkileri", *Tekstil ve Konfeksiyon*, No:2, (1998)

- [15] Çakıroğlu, F./İhracatçı Gözüyle Ekolojik Tekstilde Alınması Gereken Tedbirler", Tekstil Terbiye ve Teknik, Tanıtım Sayısı (2003)
- [16] Seventekin, N."İnsan Ekolojisi", Eko Tekstiller Eki, Yıl 5, Sayı 1, (1995)
- [17] Seventekin, N.; Özdoğan E.,"Ekotekstiller Açısından Toksik Ağır metaller", Tekstil ve Konfeksiyon, No:1, (1998)
- [18] Bayraktar, T., İTKİB, Genel Sekreterliği, İTKİB AR&GE ve Mevzuat Şubesi, (2005)
- [19] Zimmermann, T., Kulla, H.G. and Leisinger, T. "Properties of purified Orange II azoreductase, the enzyme initialing az dye degradation by Pseudomonas KF46.", Eur. J. Biochem., **129**: 197-203, (1982)
- [20] Haug, W., Schmidt, A., Nörtemann B., Hempel, D.C., Stolz, A. and Knackmuss H.J. "Mineralization of the sulfonated azo dye Mordant Yellow 3 by a 6-aminoaphtalene-2-sulfonate -degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*.", Appl. Environ. Microbiol., **57**: 3144-3149, (1991)
- [21] Sani, R.K. and Banerjee, U.C. "Decolorization of triphenylmethane dyes and textile and dye-stuff effluent by *Kurthia* sp.", Enzyme Microbiol. Technol., **24**: 433-437, (1999)
- [22] Gold, M.H., and Alic, M. "Molecular biology of lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*.", Microbiol. Rev., **57**: 605-622, (1993)
- [23] Balan, D.S.L., and Monteiro, R.T.L. "Decolorization of textile İndigo dye by ligninolytic fungi.", J. Biotechnol., **89**: 141-145, (2001)
- [24] Novotny, C., Rawal, B., Bhatt, M., Patel, M., Sasek, V., and Molitoris, P. "Capacity of *Irpex lacteus* and *Pluerotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes.", J. Biotechnol., **89**: 113-122, (2001)
- [25] Martins, M.A.M., Carsodo, M.H., Queiroz, M.J., Ramalho, M.T., and Campos, A.M.O. "Biodegradation of azo dyes by yeast *Candida zeylanoides* in batch aerated cultures.", Chemosphere, 38: 2455-2460, (1999)
- [26] Zhou, W., and Zimmermann, W. "Decolorization of industrial effluents containing reactive dyes by actinomycetes.", FEMS Microbiol. Lett., **107**: 157-162 (1993)

- [27] Dilek, F.B., Taplamacioglu, H.M., and Tarlan, E. "Colour and AOX removal from pulping effluents by algae.", *Appl. Microbiol. Technol.*, **52**: 585-591 (1999)
- [28] Swamy, J., and Ramsay, J.A. "The evaluation of white rot fungi in the decolorization of textile dyes.", *Enzyme Microbiol. Technol.*, **24**: 130-137, (1999)
- [29] Whurmann, K., Mechsner K. and Kappeler, T. "Investigation on rate determining factors in the microbial reduction of azo dyes.", *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **9**: 325-338 (1980)
- [30] Ogawa, T., Shibata, M., Yatome, C., and Idaka, E. "Growth inhibition of *Bacillus subtilis* by basic dyes.", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **40**: 545-552 (1988)
- [31] Yatome, C., Ogawa, T., Koga, D. and Idaka, E. "Biodegradability of azo and triphenylmethane dyes by *Pseudomonas pseudomallei* 13NA.", *J. Soc. Dyers Colourists*, **97**: 166-169; (1981)
- [32] Yatome, C., Ogawa, T. and Matsui, M. "Degradation of Crystal Violet by *Bacillus subtilis*.", *J. Environ. Sci. Health.*, **A26**: 75-87, (1991)
- [33] Roth, P., Sattler, K., Berger, R. and Vinz, M. "Hydrophobicity and microbial activities. III. Discoloring, detoxification, and degradation of triphenylmethane dyes.", *Zbl. Microbiol.*, **147**: 409-417, (1992)
- [34] Akad. Wiss. Microbial breakdown of xenobiotic dyes of triphenylmethane series. German patent. PN:DD-;DD-;290004;16.05.1991,PY;1991.
- [35] Knapp, J.S., Newsby, P.S. and Reece L.P. "Decolorization of wood-rotting basidiomycete fungi.", *Enzyme Microbiol. Technol.*, **17**: 664-668, (1995)
- [36] Rafii, F., Franklin, W. and Cerniglia, C.E. "Azoreductase activity of anaerobic Bacteria isolated from human intestinal microflora.", *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 2146-2151, (1990)
- [37] Sumathi, S. and Manju, B.S. "Uptake of reactive textile dyes by *Aspergillus foetidus*.", *Enzyme and Microbiol Technol.*, **27**: 347-355, (2000)
- [38] Chen, K.C., Wu, J.Y. Liou, D.J. and Hwang, S.C.I. "Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains.", *J. Biotechnol.*, **101**: 57-68, (2003)

- [39] Okami, Y. and Hotta, K. "Search and discovery of new antibiotics", p. 33-67. In M. Goodfellow, S.T. Willams, and M. Mordanski (ed.), "Actinomycetes in biotechnology", Academic Press, Inc., San Diego, (1988)
- [40] 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)
- [41] Fogarty, A.M. and Tuovinen, O.H. "Microbial degradation of pesticides in yard waste composting.", *Microbiol. Rev.*, **55**: 225-233, (1991)
- [42] Sariaslami, F., Traver M.K. and Buchholz, S.E. "Xenobiotic transformations by *Streptomyces griseus*.", *Dev. Int. Microbiol.*, **30**: 161-171, (1989)
- [43] 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)
- [44] Yatome, C., Yamada, S., Ogawa, T. and Matsui, M. "Degradation of Crystal Violet by *Nocardia corallina*.", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**: 565-569, (1993)
- [45] Goszczynski, S., Paszczynski, A., Pasti-Grigsby, M.B., Crawford, R.L., 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)
- [46] Ball, A.S., Betts, W.B. McCarthy, A.J. "Degradation of lignin-related compounds by actinomycetes." *Appl Environ Microbiol.*, **55**:1642-1644, (1989)
- [47] Zhou, W., Zimmermann, W. "Decolorization of industrial effluents containing reactive dyes by actinomycetes." *FEMS Microbiol Lett.*, **107**: 157-162
- [48] Pasti, M.B., Crawford, D.L. "Relationships between the abilities of streptomycetes to decolorize three anthron-type dyes and to degrade lignocellulose." *Can J Microbiol.*, **37**: 902-907, (1991)
- [49] Paszczynski, A., Pasti-Grigsby, M.B., Goszczynski, S., Crawford, R.L., Crawford, D.L. "Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*." *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 3598-3604. (1992)

- [50] Burke, N.S., 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)
- [51] Manguson, T.S. "Biochemical and genetic studies on the ligninocellulose degradation system of *Streptomyces viridosporus* T7A" Ph.D. thesis, University of Idaho
- [52] Ramachandran, S., Manguson, T.S., 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)
- [53] Wasniewska, K. "Biodegradation of Crystal Violet (hexamethyl-*p*-rosaniline chloride) by oxidative red yeast.", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **34**: 323-330, (1985)
- [54] Wilkolazka, A.J.W., Rdest, J.K., Malarozyk, E. Wardas, W. and Leonowicz, A. "Fungi and their ability to decolourize azo and anthraquinonic dyes.", *Enzyme and Microbiol. Tech.*, **30**: 566-572, (2002)
- [55] Yesilada, O., Cing, S. and Asma, D. "Decolourization of the textile dye Astrazon Red FBL by *funaila trogii* pellets.", *Bioresource Technol.*, **82**: 139-145, (2001)
- [56] Fu, Y. and Virarghavan, T. "Dye biorpsion sites in *Aspergillus niger*.", *Bioresource Technol.*, **82**: 139-145, (2002)
- [57] Donmez, G. "Bioaccumulation of the reactive textile dyes by *Candida tropicalis* growing in molasses medium.", *Enzyme and Microbiol. Tech.*, **30**: 363-366, (2002)
- [58] Mazmanacı, M.A. and Unyayar, A. Ekiz, H.I. "Decolorization of Methylene Blue by white rot fungus, *Coriolus versicolor*.", *Frenesius Environ. Bull.*, **11**: 254-258, (2002)
- [59] Mielgo, I., Moreira, M.T., Feijoo, G. and Lema, J.M. "A packed-bed fungal bioreactor for the continuous decolorization of azo dyes.(Orange II).", *Biotechnol.*, **89**: 99-106, (2001)
- [60] Robinson, T., Chandran, B. and Nigam, P. "Studies on the production of enzymes by white rot fungi for the decolorization of textile dyes.", *Enzyme and Microbiol. Tech.*, **29**: 575-579, (2001)

- [61] Nyanhonga, G.S., Gomes, J., Gubitz, G.M., Zvauya, R., Read, J. and Steiner, W. "Decolorization of textile dyes by laccases from newly isolated strain of *Trametes modesta*.", *Wat. Res.*, **36**: 1449-1456, (2002)
- [62] Anon. "Decoloration of dye waste water by *Oscillatoria*.", *Environ. Sci.*, **2**: 39-45, (1977)
- [63] 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)
- [64] Tien, M. and Kirk, T.K. "Lignin-degrading enzyme from hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium*.", *Burds. Science*, **221**: 661-663, (1983)
- [65] 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)
- [66] 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)
- [67] Paszczyński, A. and Crawford, R.L. "Degradation of azo compounds by ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*.", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **178**: 1056-1063, (1991)
- [68] Ollikka, P., Alhonmaki, K., Leppanen. V.-M., Glumoff, T., Rajiola, T. and Suominen, L. "Decolorization of azo, triphenylmethane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*.", *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 4010-4016, (1993)
- [69] Yarpolov, 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)
- [70] Thurston, C. F. "The structure and function of fungal laccase.", *Microbiology*, **140**: 19-26, (1994)
- [71] Bourbonnais, R. and Paice, M.G. "Oxidative enzymes from the lignin-degrading fungus *Pleurotus sajorcaju*.", In *Plant Cell IVall Polymers*

- Biogenesis and Biodegradation (ed). Lewis, N.G. and Paice, M.G. pp. 473-481. Washington, DC: American Chemical Series, (1989)
- [72] Gold, M.H. and Alic, M. "Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*.", *Microbiology Reviews*, **57**: 605-622, (1993)
- [73] Bollag, J.M., Shuttlevorth, K.L. and Anderson, D.H. "Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds", *Applied and Environmental Microbiology*, **54**: 3086-3091, (1988)
- [74] 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)
- [75] Pasti, M.B., Goszczynski, S., Crawford, D.L. and Crawford, R.L. "Mineralization of azo dyes in liquid cultures by *Streptomyces chromofuscus* A11, P-026", *Abstr. 8th Int. Symp. Biol. Actinomycetes. Madison, Wis.*, (1991)
- [76] Glenn, J.K. and Gold, M.H. "Degradation of several polymeric dyes by the lignin degrading basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium*.", *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**: 1741-1747, (1983)
- [77] Ball, A.S., Betts, W.B. and McCarthy, A.J. "Degradation of lignin related compounds by actinomycetes." *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**: 1642-1644, (1989)
- [78] Ball, A.S. and Colton, J. "Decolorization of the polymeric dye Poly R by *Streptomyces viridosporus* T7A", *J. Basic Microbiol.* **36**: (1) 13-18 (1996).
- [79] Bumpus, J.A. and Brock, B.J. "Biodegradation of Crystal Violet by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*.", *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**: 1143-1150, (1988)
- [80] Keyser, P., Kirk, T.K. and Zeikus J.K. "Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium*: synthesized in absence of lignin in response to nitrogen starvation.", *J. Bacteriol.*, **135**: 790-797, (1978)
- [81] Cripps, C., Bumpus, J.A. and Aust, S.D. "Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*.", *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 1114-1118, (1990)
- [82] Antai S.P. and Crawford, D.L. "Degredation of phenol by *Streptomyces setoni*", *Can. J. Microbial.*, **29**: 142-143, (1983)

- [83] Sutherland, J.B., Crawford, D.L. and Pometto III. A.L. "Catabolism of benzoic acids by *Streptomyces* species.", *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**: 442-448, (1981)
- [84] Crawford, R.L., Crawford, D.L. and Dizikes G.J. "Catabolism of the lignin substructure model compounds dehydrovanilin by lignin-degrading *Streptomyces*", *Arch. Microbiol.*, **129**: 204-209, (1981)
- [85] Gauger, W.K., MacDonald, J.M., Adrian, N.R., Matthees, D.P. and Walgenbach, D.D. "Characterization of streptomyces growing on organophosphate and carbamate insecticides.", *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **15**: 137-141, (1986)
- [86] Schatz A., Isenberg H.D., Angrist, A.A. and Schatz, V. "Microbial metabolism of carbamates. I. Isolation of *Streptomyces nitrificans*, *spec. nov.*, and other organisms which grow on urethan.", *J. Bacteriol.*, **68**: 1-4, (1954)
- [87] Gunner, H.B. and Zuckman, B.M. "Degradation of diazinon by synergistic microbial action.", *Nature (London)*, **217**: 1183-1184, (1968)
- [88] Kristufek, V., Koluskova, N, Cermakova M. and Blumaureova, B. "Degradation of bromoxynil by *Streptomyces griseus* in soil.", *L_Folia Microbiol.*, **33**: 50-54, (1988)
- [89] Winted, B., Fiechter A. and Zimmermann, W. "Degradation of organochloride compounds in spent sulfite bleach plant effluents by actinomycetes.", *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 2848-2863, (1991)
- [90] Pasti, M.B. and Crawford, D.L. "Relationships between the abilities of streptomycetes to decolorize three anthron-type dyes and to degrade liginocellulose", *Can. J. Microbiol.*, **37**: 902-907. (1991)
- [91] Paszczynski A., Pasti, M.B., Goszczynski, S., Crawford, D.L. and Crawford, R.L. "New approach to improve degradation of recalcitrant azo dyes by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*.", *Enzyme Microbiol. Technol.*, **13**: 378-384. (1991)
- [92] Paszczynski A., Pasti, M.B., Goszczynski, S., Crawford, D.L. and Crawford, R.L. "Designing biodegradability: lessons from lignin.", p. 73-78. *Abstr. Int. Symp. Appl. Biotechnol. Tree Culture Prot. Utilization. Columbus, Ohio. Northeastern Forest Experiment Station, U.S. Department of Agriculture, Radnor, Pa.*, (1991)

- [93] Pasti, M.B., Hagen, S.R., Goszczynski, S., Paszczynski A., Crawford, D.L. and Crawford, R.L.. "The influence of guaiacol and syringyl groups in azo dyes on their degradation by lignocellulolytic *Streptomyces* spp.", p. 119-120. Abstr. Int. Symp. Appl. Biotechnol. Tree Culture Prot. Utilization. Columbus, Ohio. Northeastern Forest Experiment Station, U.S. Department of Agriculture, Radnor, Pa., (1991)
- [94] Paszczynski A. and Crawford, R.L. "Degradation of azo compounds by ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of veratryl alcohol.", Biochem. Biophys., **244**: 750-765, (1991)
- [95] Michaels, G.B. and Lewis, D.L. "Microbial transformation rates of azo and triphenylmethane dyes.", Environ. Toxicol. Chem, **5**:161-166, (1986)
- [96] Kulla, H.G. "Aerobic bacterial degradation of azo dyes p.387-399 T. Leisinger, A.M. Cook, R. Hütter, and R. Nüesch (ed.), microbial degradation of xenobiotic and recalcitrant compounds.", Academic Press, Inc., Ltd., London, (1981)
- [97] Idaka, E., Ogawa T. and Horitsu, H. "Reductive metabolism of aminobenzenes by *Pseudomonas cepecia*.", Bull. Environ. Contam. Toxicol., **39**: 100-107, (1987)
- [98] Cripps, J., Bumpus, J.A., Aust, S.D. "Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*.", Appl. Environ. Microbiol., **56**: 1114-1118, (1990)
- [99] Paszczynski, A, Pasti, M.B., Goszczynski, S., Crawford, D.L. and Crawford, R.L. "New approach to improve degradation of recalcitrant azo dyes by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*.", Enzyme Microbiol. Technol., **13**: 378-384, (1991)
- [100] Paszczynski, A. and Crawford, R.L. "Degradation of azo dyes by ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of veratryl alcohol.", Biochem. Biophys. Res. Commun., **178**: 1056-1063, (1991)
- [101] Selin, J.-F. and Sundman, U. "Analysis of fungal degradation of lignosulfonates in solid media.", Arch. Microbiol., **81**: 383-385, (1972)
- [102] Sundman, U. and Nose, L. "A simple plate test for direct visualization of biological lignin degradation.", Pap. Puu., **53(2)**: 67-71, (1971)
- [103] Nobles, M.K. "A rapid test for extracellular oxidase in cultures of wood-inhibiting Hymenomycetes.", Can. J. Bot. ,**36**: 91-99, (1958)

- [104] Crawford, D.L., Crawford, R.L. and Pometto, A.L.,III "Preparation of specifically labelled ^{14}C -(lignin)-and ^{14}C -(cellulose)-lignocelluloses and their decomposition by the microflora of soil.", *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**: 1247-1251, (1977)
- [105] Haider, K. and Trojanowski, J. "Decomposition of specifically ^{14}C -labelled and dehydropolymers of coniferyl alcohols as models for lignin degradation by soft and white rot fungi.", *Arch. Microbiol.*, **105**: 33-41, (1975)
- [106] Kirk, T.K., Connors, W.J. and Bleam, R.D., *et al.* "Preparation and decomposition of synthetic [^{14}C]-lignins.", *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **72**: 2515-2519, (1975)
- [107] Gold, M.H. and Glenn, J.K. "Manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*.", *Methods Enzymol.*, **161**: 74-78, (1988)
- [108] Goszczynski, S., Pazczynski, A., Pasti-Grigsby M.B., Crawford, R.L. and Crawford, D.L. "New pathway for degradation of sulfonated azo dyes by microbial peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*.", *J. Bacteriol.*, **176**: 1339-1347, (1994)
- [109] Pasti-Grigsby, M.B., Paszczynski, A., Goszczynski, S., Crawford, D.L. and Crawford, R.L. "Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*.", *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 3605-3613, (1992)
- [110] Pasti, M.B., Pometto A.L. Nuti, M.P. and Crawford, D.L. "Lignin-solubilizing ability of actinomycetes isolated from termite (Termitidae) gut.", *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 2213-2218, (1990)
- [111] Liu, Z.P. and Yang, H.F. "Reduction of azo dyes by microorganisms.", *Environ. Pollut. Control.*, **9**: 2-5. (1987)
- [112] Xian, H.J. and Yang, H.F. "Decolorization of dyes by microorganisms." *Acta Scientiae Circumstantiae.*, **8**: 266-274, (1988)
- [113] Brown, D. "The aerobic biodegradability of primary aromatic amines.", *Chemosphere.*, **12**: 404-414, (1983a)
- [114] Brown, D. "The degradation of dyestuff. Part I: Primary biodegradation under anaerobic conditions.", *Chemosphere.*, **12**: 397-404, (1983b)
- [115] Pagga, U. and Brown, D. "The degradation. Part II: Behavior of dyestuff in aerobic biodegradation tests.", *Chemosphere.*, **15**: 479-491, (1986)

- [116] Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F.D. and Eriksson, K.-E.L. "A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase." FEBS Lett., **391**: 178-189, (1996)
- [117] Harvey, P.J., Shoemaker, H.E. and Palmer, J.M. "Veratryl alcohol as a mediator and the role of radical cations in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*." FEBS Lett., **195**: 242-246, (1986)
- [118] Sutherland, G.R.J., Khindaria, A., Chung, N. and Aust, S.D. "The effect of manganese on the oxidation of chemicals by lignin peroxidase.", Biochemistry, **34**: 12624-12629, (1995)
- [119] Dubin, P. and Wright, K.L. "Reduction of azo food dyes in cultures of *Proteus vulgaris*." Xenobiotica, **5**: 563-571, (1975)
- [120] Gingell, R. and Walker, R. "Mechanism of azo reduction by *Streptococcus faecalis*. II. The role of soluble flavins." Xenobiotica, **1**: 231-239, (1971)
- [121] Roxon, J.J., Ryan, A.J. and Wright, S.E. "Reduction of tertrazine by a *Proteus* species isolated from rats." Food Cosmet. Toxicol., **5**: 645-656, (1967)
- [122] Keck, A., Klein, J., Stolz A., Kudlich, M., Knackmuss, H.-J. and Mattes, R. "Reduction of azo dyes by redox mediators originating in the naphthalenesulfonic acid degrading pathway of *Spingomonas* sp. Strain BN6." Appl. Environ. Microbiol., **63**: 3684-3690, (1997)
- [123] 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).
- [124] Küster, E. "Outline of a comparative study of criteria used in characterization of the actinomycetes", Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon, **9**: 97-104, (1959).
- [125] 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).
- [126] 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).

- [127] Barbosa, A.M., Dekker, R.F.H. and Hardy, G.E. “Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete *Botryosphaeria* sp. When screened on the polymeric dye Poly-R 478”, Lett. in Appl. Microbiol., **23**: 93-96, (1996).
- [128] Aksu, Z. and Dönmez G. “ A comparative study on the biosorption characteristics of some yeasts for Remazol Blue reactive dye”, Chemosphere, **50**: 1075-1083, (2003).
- [129] Chen, K. Wu, J., Liou D. and Hwang, S.J. “ Decolorisation of the textile dyes by newly isolated bacterial strains”, Journal of Biotechnol., **101**: 57-68, (2003).
- [130] Zhang, F., Knapp, J.S. and Tapley, K.N., “ Decolorization of cotton bleaching effluent with wood rotting fungus”, Water Res.,**3(4)**: 919-929, (1996).
- [131] Radha, K.V., Regupathi, I., Arunagiri, A., and Murugesan, T., “Decolorization studies of synthetic dyes using *Phanerochaete chrysosporium* and their kinetics”, Process Biochem., **40**: 3337-3345, (2005).
- [132] Heinfling, A., Martinez, M.J., Martnez, A.T., Bergbauer, M. and Szawzyk, U., “Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in amanganese-independent reaction” Appl. Environ. Microbiol., **64**: 2788-2793, (1998).

ÖZGEÇMİŞ

11 Eylül 1980 Mersin doğumluyum. İlk ve orta öğrenimimi Mersin’de tamamladım. 2003 yılında Mersin Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldum. Halen bu üniversitede Yüksek Lisans yapmaktayım. 01 Haziran 2005 tarihinde Antalya Özel Anadolu Hastanesi laboratuvarında Biyolog olarak işe başladım. Ocak 2006 tarihinden bu güne Ankara Tıp Fakültesi, Cebeci Kampüsü, Merkez Laboratuvarında Biyolog olarak çalışmaktayım.

ÖZGEÇMİŞ

11 Eylül 1980 Mersin doğumluyum. İlk ve orta öğrenimimi Mersin'de tamamladım. 2003 yılında Mersin Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldum. Halen bu üniversitede Yüksek Lisans yapmaktayım. 01 Haziran 2005 tarihinde Antalya Özel Anadolu Hastanesi laboratuvarında Biyolog olarak işe başladım. Ocak 2006 tarihinden bu güne Ankara Tıp Fakültesi, Cebeci Kampusü, Merkez Laboratuvarında Biyolog olarak çalışmaktayım.