

**BEYAZ ÇÜRÜKÇÜL FUNGUS *FUNALIA TROGII*  
KULLANILARAK DİAZO BOYAR MADDE  
REAKTİF BLACK 5'İN RENK GİDERİMİ**

136258

**MEHMET ALİ MAZMANCI**

**Mersin Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Çevre Mühendisliği  
Ana Bilim Dalı**

**DOKTORA TEZİ**

**Tez Danışmanı  
Yrd. Doç. Dr. Ali ÜNYAYAR**

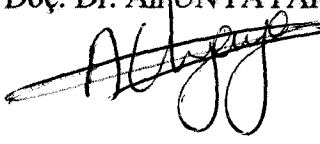
**TC. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANLARI MERKEZİ**

**MERSİN  
MAYIS 2003**

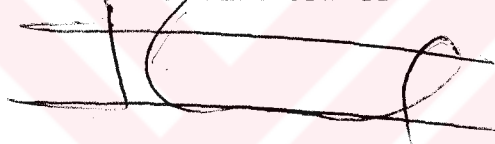
136258

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


İmza  
Tez Danışmanı  
Yrd. Doç. Dr. Ali ÜNYAYAR




İmza  
Jüri Üyesi  
Prof. Dr. Halil KUMBUR



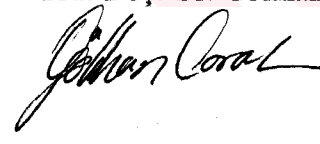
İmza  
Jüri Üyesi  
Prof. Dr. H. İbrahim EKİZ



İmza  
Jüri Üyesi  
Prof. Dr. Ömer ÇOLAK



İmza  
Jüri Üyesi  
Yrd. Doç. Dr. Gökhan CORAL



Bu tezin Fen Bilimleri Enstitüsü yazım kurallarına uygun olarak yazıldığı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 02.07.2003 tarih ve 2003/2/221... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mahir TURHAN  
Enstitü Müdürü



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

## ÖZ

Bu çalışmada, beyaz çürükçül funguslardan *Funalia trogii* ile bir diazo boyar madde olan Remazol Black B (Reaktif Black 5)'in renk giderimi araştırılmıştır. Optimum renk giderim ortamının saptanması için farklı sıcaklıklar, pH'lar, karbon ve azot kaynakları ve azot kaynağı konsantrasyonları test edilmiştir. Sonuçlar optimum sıcaklığın 30 °C ve pH'nın 4,78 olduğunu göstermiştir. En yüksek renk giderimi karbon ve azot kaynağı eklenmemiş ortamlarda saptanmıştır. *F. trogii*'nin serbest miselleri optimum statik koşullarda 9 günde boyar maddenin yaklaşık 77,0 mg/L'sinin rengini giderebilmiştir. *Funalia trogii*'nin *Luffa cylindrica*'ya tutuklanmış kültürlerinin renk giderimi üzerine etkisi de araştırılmıştır. Bu çalışmada, tutuklanmış fungusun misel yaşının renk giderim işleminde önemli bir faktör olduğu bulunmuştur. Üç günlük misel yaşına sahip kültürlerin renk giderim hızı (8,228 mg boyar madde/ g. KMA. gün) 0 ve 6 günlük misel yaşına sahip kültürlerin renk giderim hızlarından (sırası ile 6,8648 ve 7,7957 mg boyar madde/ g. KMA. gün) daha yüksek gerçekleşmiştir. Makroskobik ve mikroskobik incelemeler boyar maddenin fungus misellerine tutunmadığını göstermiştir. *F. trogii*'nin gelişimi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında test edilen tüm boyar madde konsantrasyonlarında inhibe olmuştur, bununla beraber bu etki fungusun life tamamen tutuklanması ile azalmıştır. Optimum misel yaşında, *Luffa cylindrica*'ya tutuklanmış *F. trogii* kültürlerinin renk giderim yeteneği farklı boyar madde konsantrasyonlarında test edilmiştir. Renk giderimindeki kinetik parametreler Lineweaver-Burk'e göre hesaplanmıştır ( $V_{max} = 35,65$  mg boyar madde/ g. KMA. gün ve  $K_m = 58,68$  mg boyar madde/ L).

**Anahtar Kelimeler:** Beyaz Çürükçül Fungus, *Funalia trogii*, Reaktif Black 5, Renk Giderimi, *Luffa cylindrica*, Tutuklama

## ABSTRACT

In this study, the decolorization of a diazoic dye Remazol Black B (Reactive Black 5) by a white rot fungus *Funalia trogii* was investigated. Different temperatures, pH, carbon and nitrogen source and nitrogen concentrations were tested that in order to detected optimal decolorization condition. Results showed that optimal temperature 30 °C and optimal pH 4,78. Maximum decolorization was detected under media that non-added carbon and nitrogen source. Free mycelia of *F. trogii* decolorized approximately 77,0 mg/L dye on 9 days under optimal static conditions. Decolorization effect of dye by *Funalia trogii* cultures immobilized on *Luffa cylindrica* sponge was also investigated. In this study, mycelia age of immobilized fungus was found that an important factor for decolorization process. Decolorization rate of 3-day-old age culture was obtained higher (8,228 mg dye / g DMW. day) than 0 and 6-day-old cultures (6,8648 and 7,7957 mg dye / g DMW. day respectively). Macroscopic and microscobic examinations showed that dye not biosorbed on the fungal micelium. *F. trogii* growth was inhibited by all tested dye concentrations with compared to control, however this effect minimalized when fungus completely immobilized to spongles. In optimum micelial age, cultures of *F. trogii* immobilized on *Luffa cylindrica* sponge were tested for their ability for dye decolorization at different initial concentration. The kinetic parameters of decolorization was calculated according to Lineweaver-Burk plots (Km of 58,68 mg dye / L and Vmax 35,65 mg dye / g DMW. day).

**Keywords:** White Rot Fungus, *Funalia trogii*, Reactive Black 5, Decolorization, *Luffa cylindrica*, Immobilization

## TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım süresince arkadaşlığından, dostluğundan, maddi ve manevi desteklerinden dolayı tez danıőmanım Yrd. Doç. Dr. Ali ÜNYAYAR'a,

Tez komitemde çalıőmalarımı titizlikle inceleyen ve katkılarda bulunan Bölüm Başkanım Prof. Dr. Halil KUMBUR ve Prof. Dr. H. İbrahim EKİZ'e,

Tezimin kinetik değerlendirmelerinde yardımlarından dolayı Doç. Dr. Ayla ÖZER'e,

Laboratuvarı benimle paylaőan ve çalıőmalarımda yanımda olan arkadaşlarım Araştırma Görevlileri H. Duygu ÖZSOY'a ve Hatice ATAÇAĞ'a,

Çalıőmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen Erdoğan TÜRKER ve Mühendislik Fakültesi İdari Personeline teşekkür ederim.

Doktora çalıőmalarım süresince özverili, anlayıőlı ve sevecen olan eőim Birgül MAZMANCI'ya ve kızım Senem'e sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b>	<b>SAYFA</b>
<b>ÖZ</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iii
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b> .....	iv
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	viii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	xi
<b>SİMGE VE KISALTMALAR</b> .....	xiii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMASI</b> .....	2
<b>2.1. BOYAR MADDELER</b> .....	2
<b>2.2. BOYAR MADDELERİN RENK GİDERİM ÇALIŞMALARI</b>	6
<b>2.2.1. Oksidatif Prosesler</b> .....	6
2.2.1.1. Fenton ayırıcı ( $H_2O_2/Fe(II)$ tuzları) .....	6
2.2.1.2. Ozonlama .....	7
2.2.1.3. Fotokimyasal işlemler . .....	8
2.2.1.4. Sodyum hipoklorit ( $NaOCl$ ) .....	8
2.2.1.5. Elektrokimyasal işlemler .....	8
<b>2.2.2. Fiziksel Arıtım</b> .....	9
2.2.2.1. Adsorbsiyon .....	9
2.2.2.2. Aktif karbon .....	9
2.2.2.3. Odun cipsi .....	9
2.2.2.4. Uçucu kül ve kömür .....	10
2.2.2.5. Membran filtrasyon .....	10
2.2.2.6. İyon değıştiriciler .....	10
2.2.2.7. Radyasyon .....	10
<b>2.2.3. Biyolojik Arıtım</b> .....	11
2.2.3.1. Bakteriyel kültürler . .....	11
2.2.3.2. Fungal renk giderimi .....	17

2.2.3.3. Canlı hücrelerle yapılan çalışmalar .....	20
2.2.3.4. Ölü hücrelerle yapılan çalışmalar .....	22
2.2.3.5. Enzimlerle yapılan çalışmalar .....	22
<b>3. MATERYAL ve METOT.....</b>	<b>25</b>
3.1. MATERYAL .....	25
3.1.1. Fungusların Devamlılığının Sağlanması .....	25
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması .....	25
3.1.2.1. Besiyerinin içeriği.....	25
3.1.2.2. Çalışmada kullanılan boyar madde .....	26
3.1.2.3. Fungusların aşılması.....	26
3.2. METOT .....	27
3.2.1. pH ve Renk Analizleri .....	27
3.2.2. Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ) Analizleri .....	28
3.2.3. Toplam Karbonhidrat Tayini .....	29
3.2.4. Protein Tayini .....	29
3.2.5. Kuru Misel Ağırlığı (KMA) Tayini .....	30
3.2.6. Tutuklama Materyali <i>Luffa cylindrica</i> 'nın (Lif) Hazırlanışı.....	31
3.2.7. Fenoloksidaz (Lakkaz ve Peroksidaz) Aktivitelerinin Ölçümü .....	32
<b>4. BULGULAR ve TARTIŞMA .....</b>	<b>33</b>
4.1. ÇALIŞMADA KULLANILACAK FUNGUSUN SAPTANMASI .....	33
4.2. STATİK KOŞULLARDA <i>F. TROGII</i> İLE REAKTİF BLACK 5'İN RENK GİDERİMİ ÜZERİNE ORTAM ŞARTLARININ ETKİSİ..	35
4.2.1. Sıcaklığın Renk Giderimi Üzerine Etkisi.....	35
4.2.2. Başlangıç pH'sının Renk Giderimi Üzerine Etkisi .....	42
4.2.3. <i>Funalia trogii</i> ile Reaktif Black 5'in Renk Giderimi Üzerine Farklı Karbon ve Azot Kaynaklarının Etkisi.....	48

4.2.3.1. Glikoz içeren ortamda farklı azot kaynaklarının renk giderimi üzerine etkisi .....	49
4.2.3.2. Sükroz içeren ortamlarda farklı azot kaynaklarının renk giderimi üzerine etkisi .....	54
4.2.3.3. Nişasta içeren ortamlarda farklı azot kaynaklarının renk giderimi üzerine etkisi.....	59
4.2.4. Boyar Maddenin <i>F. trogii</i> Gelişimi Üzerine Etkisi ve Statik Koşullarda Maksimum Renk Gideriminin Bulunması .....	66
4.3. ÇALKALAMALI KÜLTÜRLERLE RENK GİDERİM ÇALIŞMALARI .....	69
4.3.1. <i>Luffa cylindrica</i> 'nın Tutuklama Materyali Olarak Kullanılması .....	69
4.3.2. Kontrol Grubu .....	72
4.3.3. İnkübasyonun İlk Gününde Boyar Madde Eklenen Ortamlarda Renk Giderimi (0. Gün-T <sub>0</sub> ) .....	74
4.3.4. İnkübasyonun 3. Gününde Boyar Madde Eklenen Ortamlarda Renk Giderimi (3. gün-T <sub>3</sub> ) .....	77
4.3.5. İnkübasyonun 6. Gününde Boyar Madde Eklenen Ortamlarda Renk Giderimi (6. gün-T <sub>6</sub> ) .....	80
4.3.6. Boyar Madde Reaktif Black 5'in Life Tutuklanmış <i>F. trogii</i> 'nin Gelişimi Üzerine Etkisi .....	85
4.3.7. Farklı Misel Yaşlarında Renk Giderimine Ait İlk Hızların Bulunması .....	87
4.3.8. Farklı Boyar Madde Konsantrasyonlarında Tutuklanmış <i>F. trogii</i> 'nin Renk Giderimi .....	92
4.3.9. Kinetik Çalışmalar.....	99
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>104</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>106</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>127</b>



## ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE	SAYFA
Çizelge 2.1. Fungusların canlı hücreleri kullanılarak yapılan çalışmalar.	21
Çizelge 2.2. Fungusların ölü hücreleri ile yapılan çalışmalar .....	23
Çizelge 3.1. Prekültür Ortamı .....	25
Çizelge 3.2. Boyar madde içeren inkübasyon ortamı .....	27
Çizelge 3.3. Kolorimetrik KOİ tayininde kullanılan hacimler .....	28
Çizelge 4.1. Farklı boyar madde konsantrasyonlarında ortamlara eklenen ve rengi giderilen toplam boyar madde konsantrasyonu (mg/L)	98
Çizelge 4.2. Başlangıç boyar madde konsantrasyonuna göre renk giderim ilk hızları .....	100
Çizelge 4.3. Kinetik değerlendirme ve sonuçlar .....	102

## ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL	SAYFA
Şekil 2.1. Reaktif boyar maddelerin karakteristik yapısı .....	5
Şekil 3.1. Reaktif Black 5 (Remazol black B)'nin kimyasal yapısı .....	25
Şekil 3.2. Tutuklama materyali olarak kullanılan <i>Luffa cylindrica</i> 'nın enine kesiti (A) ve tutuklamada kullanılan periferel yüzü (B) .....	31
Şekil 4.1. Fungusların renk ve KOİ giderimleri (pH 5,00; 30 °C; 150 mg/L boyar madde; 21 gün) (1. <i>P. chrysosporium</i> 2. <i>F. trogii</i> 3. <i>Pl. florida</i> 4. <i>Pl. eryngii</i> 5. <i>Pl. sapidus</i> ) .....	34
Şekil 4.2. <i>Funalia trogii</i> 'nin 20 °C'de RB5 içeren ortamda KOİ, Glikoz, renk giderimi (%) ve KMA değişimi (g/L) .....	36
Şekil 4.3. <i>Funalia trogii</i> 'nin 25 °C'de RB5 içeren ortamda KOİ, Glikoz, renk giderimi (%) ve KMA değişimi (g/L) .....	37
Şekil 4.4. <i>Funalia trogii</i> 'nin 30 °C'de RB5 içeren ortamda KOİ, Glikoz, Renk giderimi (%) ve KMA değişimi (g/L) .....	38
Şekil 4.5. <i>Funalia trogii</i> 'nin 35 °C'de RB5 içeren ortamda KOİ, Glikoz, Renk giderimi (%) ve KMA değişimi (g/L) .....	38
Şekil 4.6. Farklı sıcaklıklarda RB5 içeren ortamda KOİ, Glikoz ve Renk giderimi (%) .....	39
Şekil 4.7. Reaktif Black 5'in <i>F. trogii</i> ile inkübasyonu boyunca maksimum absorpsiyon gösterdiği dalga boyunda oluşan kaymalar .....	40
Şekil 4.8. <i>Funalia trogii</i> 'nin pH 6,00'da RB5 içeren ortamda KOİ, Glikoz, Renk giderimi (%) ve KMA değişimi (g/L) .....	43
Şekil 4.9. <i>Funalia trogii</i> 'nin pH 5,50'de RB5 içeren ortamda KOİ, Glikoz, Renk giderimi (%) ve KMA değişimi (g/L) .....	43
Şekil 4.10. <i>Funalia trogii</i> 'nin pH 5,0'da RB5 içeren ortamda KOİ, Glikoz, Renk giderimi (%) ve KMA değişimi (g/L) .....	44
Şekil 4.11. <i>Funalia trogii</i> 'nin pH 4,78'de RB5 içeren ortamda KOİ, Glikoz, Renk giderimi (%) ve KMA değişimi (g/L) .....	45
Şekil 4.12. Farklı başlangıç pH'larında günlere bağlı pH değişimi .....	46
Şekil 4.13. Farklı pH'larda KOİ, Glikoz ve Renk giderimi (%) .....	47

<b>Şekil 4.14.</b> Glikoz içeren ortamlarda <i>F. trogii</i> 'nin renk giderim verimi (%) üzerine $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 'ın etkisi .....	50
<b>Şekil 4.15.</b> Glikoz içeren ortamlarda <i>F. trogii</i> 'nin renk giderim verimi (%) üzerine $\text{NH}_4\text{Cl}$ 'ün etkisi .....	51
<b>Şekil 4.16.</b> Glikoz içeren ortamlarda <i>F. trogii</i> 'nin renk giderim verimi (%) üzerine ürenin etkisi .....	52
<b>Şekil 4.17.</b> Sükroz içeren ortamda <i>F. trogii</i> 'nin renk giderim verimi (%) üzerine $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 'ın etkisi .....	55
<b>Şekil 4.18.</b> Sükroz içeren ortamda <i>F. trogii</i> 'nin renk giderim verimi (%) üzerine $\text{NH}_4\text{Cl}$ 'ün etkisi .....	56
<b>Şekil 4.19.</b> Sükroz içeren ortamda <i>F. trogii</i> 'nin renk giderim verimi (%) üzerine ürenin etkisi .....	57
<b>Şekil 4.20.</b> Nişasta içeren ortamlarda <i>F. trogii</i> 'nin renk giderim verimi (%) üzerine $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 'ın etkisi .....	60
<b>Şekil 4.21.</b> Nişasta içeren ortamlarda <i>F. trogii</i> 'nin renk giderim verimi (%) üzerine $\text{NH}_4\text{Cl}$ 'ün etkisi .....	61
<b>Şekil 4.22.</b> Nişasta içeren ortamlarda <i>F. trogii</i> 'nin renk giderim verimi (%) üzerine ürenin etkisi .....	62
<b>Şekil 4.23.</b> Farklı konsantrasyonlarda boyar madde içeren ortamda renk giderimi .....	66
<b>Şekil 4.24.</b> Farklı konsantrasyonlarda boyar madde içeren ortamda KMA değişimi (g/L) .....	67
<b>Şekil 4.25.</b> <i>Luffa cylindrica</i> ile tutuklanmış <i>F. trogii</i> 'nin kültür ortamında KOİ, şeker (mg/L) ve KMA (g/L) değişimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı) .....	73
<b>Şekil 4.26.</b> <i>Luffa cylindrica</i> ile tutuklanmış <i>F. trogii</i> 'nin kültür ortamında Protein (mg/L) ve Lakkaz, Peroksidaz (CU) enzim aktiviteleri değişimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı) .....	73

<b>Şekil 4.27.</b> Tutuklanmış <i>F. trogii</i> 'nin inkübasyonun ilk gününde boyar madde eklenen ortamlardaki KOİ, şeker (mg/L) ve KMA (g/L) değişimi(30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı) .....	74
<b>Şekil 4.28.</b> <i>Luffa cylindrica</i> ile tutuklanmış <i>F. trogii</i> 'nin inkübasyonun ilk gününde boyar madde eklenen ortamda protein (mg/L) ve lakkaz, peroksidaz (CU) enzim aktiviteleri değişimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı) .....	76
<b>Şekil 4.29.</b> İnkübasyonun ilk gününde boyar madde eklenen ortamda boyar madde giderimi (mg/L) (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı) ..	77
<b>Şekil 4.30.</b> Üç günlük misel yaşına sahip <i>Luffa cylindrica</i> ile tutuklanmış <i>F. trogii</i> 'nin boyar madde içeren ortamda KOİ, şeker (mg/L) ve KMA (g/L) değişimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı) .....	78
<b>Şekil 4.31.</b> Üç günlük misel yaşına sahip <i>Luffa cylindrica</i> ile tutuklanmış <i>F. trogii</i> 'nin boyar madde içeren ortamda Protein (µg/L) ve Lakkaz, Peroksidaz (CU) aktivite değişimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı) .....	79
<b>Şekil 4.32.</b> Üç günlük misel yaşına sahip life tutuklanmış fungus tarafından renk giderimi (mg/L) (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı) .....	79
<b>Şekil 4.33.</b> Altı günlük misel yaşına sahip <i>Luffa cylindrica</i> ile tutuklanmış <i>F. trogii</i> 'nin inkübasyonun KOİ, şeker (mg/L) ve KMA (g/L) değişimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı) .....	80
<b>Şekil 4.34.</b> Altı günlük misel yaşına sahip <i>Luffa cylindrica</i> ile tutuklanmış <i>F. trogii</i> 'nin Protein (mg/L) ve Lakkaz, Peroksidaz (CU) enzim aktiviteleri değişimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı) .....	81
<b>Şekil 4.35.</b> İnkübasyonun 6. gününde boyar madde eklenen ortamda renk giderimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı) .....	82
<b>Şekil 4.36.</b> Farklı inkübasyon sürelerinde eklenen Reaktif Black 5'in life tutuklanmış fungus gelişimi üzerine etkisi .....	86

<b>Şekil 4.37.</b> İnkübasyonun ilk gününde boyar madde eklenen ortamlarda birim zamanda birim kuru hücre başına boyar madde giderimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı) .....	89
<b>Şekil 4.38.</b> İnkübasyonun ilk gününde boyar madde eklenen ortamlarda birim zamanda birim kuru hücre başına boyar madde giderimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı) .....	90
<b>Şekil 4.39.</b> İnkübasyonun ilk gününde boyar madde eklenen ortamlarda birim zamanda birim kuru hücre başına boyar madde giderimi(30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı) .....	90
<b>Şekil 4.40.</b> Günlere bağlı Kuru Misel Ağırlığı (KMA) Değişimi (g/L) (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı) .....	92
<b>Şekil 4.41.</b> Reaktif black 5'in 18 mg/L konsantrasyonda <i>F. trogii</i> ile renk giderimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı) .....	94
<b>Şekil 4.42.</b> Reaktif black 5'in 34 mg/L konsantrasyonda <i>F. trogii</i> ile renk giderimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı) .....	94
<b>Şekil 4.43.</b> Reaktif black 5'in 61 mg/L konsantrasyonda <i>F. trogii</i> ile renk giderimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı) .....	95
<b>Şekil 4.44.</b> Reaktif black 5'in 96 mg/L konsantrasyonda <i>F. trogii</i> ile renk giderimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı) .....	96
<b>Şekil 4.45.</b> Reaktif black 5'in 125 mg/L konsantrasyonda <i>F. trogii</i> ile renk giderimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı) .....	97
<b>Şekil 4.46.</b> Başlangıç boyar madde konsantrasyonuna göre renk giderim kinetiğinin değişimi .....	99
<b>Şekil 4.47.</b> <i>F. trogii</i> tarafından Reaktif Black 5'in renk gideriminde Michealis-Menten grafiği .....	101
<b>Şekil 4.48.</b> <i>F. trogii</i> tarafından Reaktif Black 5'in renk gideriminde Lineweaver-Burk grafiği .....	102

## SİMGELER VE KISALTMALAR

***F. trogii*** : *Funalia trogii*

***P. chrysosporium*** : *Phanerochaete chrysosporium*

***Pl. sapidus*** : *Pleurotus sapidus*

***Pl. florida*** : *Pleurotus florida*

***Pl. eryngii*** : *Pleurotus eryngii*

**RB5** : Reaktif Black 5

**T<sub>0</sub>** : İnkübasyonun ilk gününde boyar madde eklenen ortam

**T<sub>3</sub>** : İnkübasyonun 3. gününde boyar madde eklenen ortam

**T<sub>6</sub>** : İnkübasyonun 6. gününde boyar madde eklenen ortam

**HrP** : Horsereddish (At turpu) Peroksidaz

**LiP** : Lignin Peroksidaz

**CU** : Kolorimetrik Unite

**q** : mg boyar madde/ g kuru misel

**V<sub>max</sub>** : Maksimum renk giderim hızı (mg boyar madde/g kuru misel. gün)

**K<sub>m</sub>** : Fungusun boyar maddeye olan affinitesi (mg boyar madde/L)

**V<sub>0</sub>** : Renk giderimine ilişkin ilk hız

## 1. GİRİŞ

İlk sentetik boyar maddenin W. H. Perkin tarafından 1856'da bulunmasından sonra boyar madde endüstrisi özellikle İngiltere, Fransa, Almanya ve İsviçre'de büyük gelişmeler göstermiştir. Günümüzde ise boyar madde 10000 farklı türde ve yılda yaklaşık  $7 \times 10^5$  tonun üzerinde üretilmektedir. Üretilen boyar maddelerin ise yaklaşık % 10-15'i atık olarak deşarj edilmektedir. Dünyada renkli ürünlere talep arttıkça bu oranın artacağı kesindir.

Renkli bileşikler atık suyun organik bakımından genelde az bir miktarını oluştursalar da, deşarj edildikleri noktalarda öncelikle ortamın estetik açıdan kirlenmesine neden olmaktadır. Deşarj edilen renkli atık sular suda yaşayan primer üreticilerin fotosentezi için gerekli olan ışığın geçirgenliğini azaltmakta ve ekosisteme önemli ölçüde zararlar vermektedir.

Bu nedenle son yıllarda tekstil ve boyar madde üreten endüstrilerden kaynaklanan renkli atık suların renksizleştirilmesi önemli bir bilimsel ilgi alanı oluşturmuştur. Fiziksel, kimyasal ve fiziko-kimyasal renk giderimi çalışmaları yanında biyolojik işlemlerle renk giderimi çalışmaları da hız kazanmıştır. Bakterilerle yapılan renk giderimi çalışmalarında anaerobik sistemlerin, boyar maddelerin mineralizasyonunda ise aerobik sistemlerin daha başarılı olduğu bilinmektedir. Son yıllarda özellikle lignin ve lignin türevi kompleks aromatik bileşikleri parçalayabilen funguslarla veya funguslardan elde edilen enzimlerle renk giderimi çalışmaları yapılmaktadır.

Bu çalışmada da Türkiye'de tekstil fabrikalarında en çok kullanılan ve bir diazo boyar maddesi olan Reactive Black 5 (Remazol black B)'nin bir beyaz çürükçül fungus türü olan *Funalia trogii* tarafından renk giderimi çalışılmıştır. Araştırmada *F. trogii*'nin fizyolojik parametreleri (pH, sıcaklık, karbon kaynağı, azot kaynağı ve konsantrasyonu) ile statik ve çalkalamalı koşullarda en yüksek renk giderim kapasitesinin bulunmasına çalışılmıştır.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2. 1. BOYAR MADDELER

Boyar maddeler 400nm-700nm arasında görünür ışığı absorbe edebilme yetenekleriyle karakterize edilirler ve ışığı absorbe ederek renkli görünürler. Çok değişik yapıda olan ve değişik amaçlarla kullanılan bu bileşiklerin çeşitli sınıflandırmaları mevcuttur. Renklendiriciler iki büyük gruba ayrılırlar [1].

- i- İnorganik boyar maddeler
- ii- Organik boyar maddeler

Renklendiriciler ya boyar maddeler yada pigmentlerdir. Pigmentler su ortamında çözünememeleriyle karakterize edilirler. Diğer taraftan su ortamında tümüyle çözünebilir boyar maddeler saç, tırnak, deri ve tekstil materyalleri gibi çeşitli maddelere uygulanırlar. Boyar maddelerin pigmentlerden farkı, boyaların maddelere özgün afinite göstermeleridir [1].

Normalde bütün hidrokarbonlar renksizdirler. Ancak bunlara kromofor adı verilen doymamış gruplar bağlanırsa renkli görünürler. Kromofor grup bağlanmış hidrokarbonlara ise "kromojen" adı verilmektedir. Kromofor renk verici anlamındadır ve kimyasal yapılarına göre 7 gruba ayrılırlar [1];

<u>Kimyasal yapı grupları</u>	<u>İçerdikleri bağlar</u>
Nitroso grubu:.....	-NO (veya =N-OH)
Nitro grubu :.....	-NO <sub>2</sub> (veya =NO · OH)
Azo grubu :.....	-N=N-
Etilen grubu :.....	=C=C=
Karbonil grubu :.....	=C=O
Karbon-azot grubu: .....	=C=NH ve -CH=N-
Kükürt grubu :.....	=C=S ve ≡C-S-S-



Basit aromatik yapıya renk veren kromofor gruplar yer değiştirebilir ve görünür spektrumda absorban bantlarının gözlenmesini sağlarlar. Kromoforlar boyaların sınıflandırılmasında oldukça önemlidir. Kromofor gruplar redüksiyona uğrayabilirler. Eğer redüksiyona uğrarlarsa elektron rezoransının kaybolmasından ötürü renk kaybolabilir [1].

Kromojenlerin tam olarak boyar madde özelliği kazanabilmesi için "oksokrom" adı verilen ikinci seri grup moleküllerin bileşiğe bağlanması gerekmektedir. Oksokrom gruplar kromojene bağlanarak hem renk şiddeti hem de renk derinliğini arttırmaktadır. Bunlar genellikle amino (-NH<sub>2</sub>), hidroksil (-OH) gibi tuz oluşturan gruplar veya bunların türevi çözünebilir radikaller karboksil (-COOH) veya sülfon (-SO<sub>3</sub>H)'dır. Bu oksokromlar, kromoforlar, kromojenler boyaların sınıflandırılmasında rol oynarlar, fakat -OH, -NH<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub>H, -COOH gibi asiste edici radikaller boyaların kimyasal sınıflandırılmasından çok liflerin direk boyanmasından sorumludurlar [2]. Boyar maddeler boyama özelliklerine göre Bazik (katyonik), Asit (anyonik), Direkt, Mordan, Küpe, İnkışaf, Metal, Dispersiyon, Pigment ve Reaktif boyar maddeler olarak sınıflandırılmaktadırlar. Bazik (katyonik) boyar maddeler; organik bazların hidroklorürleri şeklinde olup, katyonik grubu renkli kısımda taşırlar. Pozitif yük taşıyıcı olarak N (Azot) veya S (Kükürt) atomu içerirler. Yapılarından dolayı bazik (proton alan) olduklarından anyonik grup içeren liflerle bağlanırlar. Başlıca poliakrilonitril, kısmen de yn ve pamuk elyafın boyanmasında kullanılırlar [3].

Direkt boyar maddeler (Substantif Boyar Maddeler); genellikle sülfonik, bazen de karboksilik asitlerin sodyum tuzlarıdır. Yapı bakımından direkt ve asit boyar maddeler arasında kesin bir sınır bulunmamaktadır. Mordan boyarmaddeleri asidik veya bazik fonksiyonel gruplar içerirler. Bitkisel ve hayvansal elyaf ile kararsız bileşikler oluştururlar. Mordan sözcüğü, boyar maddeyi elyafa tespit eden madde veya bileşim anlamını taşır. Birçok doğal ve sentetik boyar madde bu sınıfa girmektedirler. Küpe boyar maddeleri; karbonil grubu içeren ve suda çözünmeyen boyar maddelerdir. Bunlar indirgeme ile suda çözünür hale getirilirler ve bu halde elyafa ektirililer [3].

Elyaf üzerinde oluşturularak son şekline dönüştürülebilen bütün boyar maddeler İnkışaf boyar maddeleridir. Azoik boyar maddeler de denilen Naftol—AS boyar maddeleri ile fitalosiyanın boyar maddeleri bu sınıfa girmektedirler. Belirli gruplara sahip bazı azo boyar maddeleri ile metal iyonlarının kompleks oluşturduğu boyar maddeler metal kompleks boyar maddeleridir. Kompleks oluşumunda azo grubu rol oynar. Metal katyonu olarak Co, Cu ve Ni iyonları kullanılmaktadır [3].

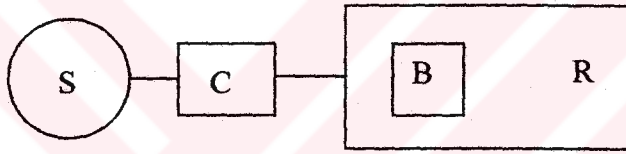
Dispersiyon boyar maddeleri suda eser miktarda çözünebilen, bu nedenle sudaki dispersiyonları halinde uygulanabilen boyar maddelerdir. Bu boyar maddeler, boyama işlemi sırasında dispersiyon ortamından hidrofob elyaf üzerine difüzyon yolu ile çekilmektedirler. Pigment boyar maddeler, bağlayıcı madde denilen sentetik reçineler ile elyaf yüzeyine bağlanan boyar maddelerdir [3].

Reaktif boyar maddeler, selüloz fiberlerini boyamak için kullanılan renkli moleküllerdir. Bunlar azot-azot çift bağı ile karakterize edilirler (-N=N- azo bağı). Azo boyalarının rengi azo bağı ve bunlara bağı kromoforlardan ileri gelir. Boyalar ilk olarak selüloz üzerinde adsorbe olur ve daha sonra fiberlerle reaksiyona girerler. Reaksiyon, boya molekülü ile fiber arasında dayanıklı bir kovalent bağı oluşumu ile gerçekleşir [4].

Reaktif boyaların en önemli özelliği yapılarında kovalent bağı oluşturabilen bir veya iki grup bulunmasıdır [1]. Bu boyaların reaktif sistemleri selüloz substratı üzerindeki iyonize olmuş hidroksil grupları ile ilişkilidir. Bununla birlikte alkali boyama şartlarında boya banyosunda bulunan hidroksil iyonları selüloz substratı ile birlikte fiberle kolayca reaksiyona giremeyen hidrolize olmuş boyalar oluşturabilir. Böylece başlangıç boya yükünün % 10-50'lik kısmı boya banyolarından atık sulara verilerek oldukça renkli atık suların oluşumuna yol açabilirler. Bu boyalar, kimyasal yapıları, molekül boyutu ve yapısı nedeniyle biyolojik indirgenmeye dayanıklıdır. Alıcı ortamlarda kolayca biyolojik indirgenmeye uğramayan reaktif boyalar tekstil atık sularında problem yaratan bileşikler olarak tanımlanırlar [4].

Reaktif boyar maddeler selülozik elyafın boya ve baskısına yarayan çok önemli bir boyarmadde grubudur. Ayrıca çok fazla olmamakla beraber yün, ipek, naylon ve deri boyamada da kullanılmaktadırlar. Reaktif boyar maddelerde geniş bir renk serisine sahiptir ve renkleri oldukça parlaktır [5].

Bütün reaktif boyar maddelerin ortak özellikleri, hepsinin kromoforu taşıyan renkli bir grup yanında, bir reaktif bir de moleküle çözünürlük sağlayan grup içermesidir. Kromoforu taşıyan moleküller çoğunlukla azo, antrakinin ve fitalosiyenin türevleridir. Boyar maddenin reaksiyon yeteneğini ve reaksiyon hızını tayin etmesi nedeniyle boyama tekniğinden sorumlu olan grup reaktif gruptur [5]. Bir reaktif boyar maddenin karakteristik yapısı şematik olarak Şekil 2.1 deki gibi gösterilebilmektedir [3].



**Şekil 2.1.** Reaktif boyar maddelerin karakteristik yapısı.

**S:** (Suda çözünebilir grup) Selüloz ve protein elyafı boyayabilen reaktif boyar maddelerde 1-4 adet sülfonik asit grubu bulunur. Bu özel gruplar moleküle çözünürlük sağlarlar. **C:** (Moleküle renk veren grup) Reaktif boyarmaddenin molekülünde renk verici grup olarak her türlü sınıfa rastlamak mümkün olmaktadır. Ancak genelleme yapıldığında sarı, turuncu ve kırmızı boyar maddelerin basit mono azo yapısında; mor, koyu kırmızı ve lacivert renklerin bakırlı mono ve disazo yapısında; parlak ve açık mavi renklerin ise antrakinin ve fitalosiyenin türevleri olduğu belirtilmektedir. **B:** (Köprü bağları) Moleküldeki renkli grup ile reaktif grubu birbirine bağlayan; -NH-, -CO-, -SO<sub>2</sub>- gibi gruplardır. **R:** (Reaktif grup) Elyaftaki fonksiyonel grup ile kovalent bağ oluşturan gruptur [3].

Günümüzde endüstriyel olarak yaklaşık 10,000 farklı boya ve pigment üretilmektedir. Dünya çapında bu boyaların yıllık üretimi 7x10<sup>5</sup> tonun üzerindedir. Bu boyaların % 10-15'i boyama prosesleri sonucunda atık su ile alıcı ortama deşarj

edilmektedir [2-5]. Bunun yanında, dünyada boyar maddeye duyulan ihtiyaç ve kullanımı ise her geçen gün artmaktadır [6-9].

Renkli organik bileşikler atık suyun organik yük bakımından genellikle az bir miktarını oluşturmalarına rağmen ortama renk vermeleri bunları estetik olarak kabul edilmez kılmaktadır. Tekstil ve boyar madde üretim endüstrilerinden atık su arıtım tesislerine ve alıcı ortama deşarj edilen atık sular önemli sağlık ve çevre kirliliği problemlerine sebep olmaktadır. Bu nedenle renk giderimi son yıllarda önemli bir bilimsel ilgi alanı oluşturmuştur [10].

## 2.2. BOYAR MADDELERİN RENK GİDERİM ÇALIŞMALARI

### 2.2.1. Oksidatif Prosesler

Bu işlem, kimyasal maddeler kullanılarak renk gideriminin sağlandığı bir metottur. Kullanımın kolaylığından dolayı çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu işlemde kullanılan temel oksitleyici ajan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )'dir. Bu ajanın aktive olabilmesi için bazı şartlar gereklidir. Kimyasal renk gideriminde kullanılan birçok metot  $H_2O_2$ 'nin aktive olmasına bağlıdır [11]. Kimyasal oksidasyon, boya molekülünün aromatik halka kırılmasıyla sonuçlanan oksidasyonu boya madde içeren atık sularda boyayı gidermektedir.

#### 2.2.1.1. Fenton ayırıcı ( $H_2O_2/Fe(II)$ tuzları)

Fenton ayırıcı biyolojik arıtıma dirençli veya canlıya zararlı olan atık suların arıtımında kullanılmaktadır [11]. Bu işlemde atık suda bulunan, suda çözünebilen veya çözünemeyen boyar maddeleri birbirine bağlar ve çökmesine neden olur [12]. Bu yöntemin temel dezavantajlarından birisi, sistemde oluşan çamurdur. Konsantre kimyasal ve boyar madde içeren bu çamurun gideriminde de yeni işlemler gerekmektedir. Bunun yanında sistemin performansı flok oluşumuna ve çökelebilmek kalitesine bağlıdır. Asit, direkt, vat, mordan ve reaktif boyar madde içeren atık sulara uygulandıklarında boyar maddeler çökebilmektedir, ancak oluşan floklar

zayıftır ve iyi bir çökme sağlanamamaktadır [13]. Fe(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasında U.V. kullanıldığında boyar madde giderim verimi artmaktadır [14].

Bu metodun kullanıldığı boyar madde giderim çalışmasında optimum pH 3,00; sıcaklık 50 °C, FeSO<sub>4</sub> konsantrasyonu 100 mg/L ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonunun 400 mg/L olduğu belirlenmiş ve yünlü, pamuklu, polyester kumaş boyama işlemleri sonrası oluşan atık sudan bu işlemle % 80'den fazla KOİ ve % 90'dan fazla renk giderimi sağlanabildiği rapor edilmiştir [15]. Hidrojen peroksit ile birlikte kobalt (II) ve askorbik asidin kullanıldığı sistemde azo, akridin, antrakinon, tiazin, trifenilmetan boyar maddelerinin (Acridine Orange, Azure B, Cibachrom Blue, Crystal violet, Reaktif Black 5) renginin % 90'nın üzerinde giderildiği rapor edilmiştir [16]. Aynı çalışmada yüksek aktivite saptanmasına rağmen reaksiyon sonucu ortamda kalan kobalt miktarının yüksek olduğu ve bunun giderimi için iyon değiştiricilerin veya metal bağlayıcı komplekslerin kullanılması gerektiği bildirilmiştir.

#### 2.2.1.2. Ozonlama

Ozonlama aromatik hidrokarbonlar, pestisitler, fenoller ve klorlu hidrokarbonların yıkımında [17, 18], boyar madde ve KOİ gideriminde kullanılmaktadır [18]. Boyar madde içeren atık suya uygulanacak olan ozon dozajı toplam renge ve KOİ'ye bağlıdır. Bu uygulamada çamur oluşumu gözlenmemektedir [19] ve toksik metabolitler oluşmamaktadır [20]. Bu metot özellikle çift bağlı boyar madde gideriminde etkilidir [11]. Boyar maddedeki kromofor gruplar genellikle konjuge çift bağlı organik bileşiklerdir. Bunların kırılmasıyla daha küçük moleküller oluşur ve boyar madde renksiz hale gelmektedir [21]. Temel dezavantajı gaz halde uygulanması ve uygulamada atık suyun hacminin arttırılamamasıdır. Ayrıca yarılanma ömrünün kısa olması (20 dakika), ortamın pH'sından, sıcaklığından, tuz konsantrasyonundan etkilenmesi ve maliyetinin yüksek olması diğer dezavantajlarıdır [18]. Alkali ortamlarda ozon hızla parçalandığından, ortam pH'sının sürekli izlenmesi gerekmektedir [11]. Bu uygulamada en iyi sonuç, ozonun radyasyonla [22] veya membran filtrasyon tekniğiyle birlikte

uygulanmasından elde edilmektedir [23]. Boyama işlemleri esnasında kullanılan iyon tutuculardan dolayı ozonlama işleminin renk giderimi üzerindeki etkisinin azaldığı belirlenmiştir [24].

#### 2.2.1.3. Fotokimyasal işlemler

Bu metotla boyar madde  $H_2O_2$  varlığında U.V. ile birlikte karbondioksit ve suya parçalanmaktadır [21, 25]. Parçalanma sonucu yüksek konsantrasyonda hidroksil radikalleri üretilmektedir. U.V.  $H_2O_2$  gibi aktif molekülleri kullanır ve boyar madde giderim hızı U.V. ışınının yoğunluğuna, ortamın pH'sına ve boyar maddenin yapısına bağlıdır [11]. Renk giderimi işleminin süresi ortamda bulunan metallere, inorganik asitlere, organik aldehitlere ve organik asitlere bağlıdır [25].

#### 2.2.1.4. Sodyum hipoklorit ( $NaOCl$ )

Bu metotta; kullanılan kimyasaldaki klor boyar maddedeki amino gruplarına atak yapmaktadır. Reaksiyon başladığında azo bağlarının kırılması hızlanmaktadır. Bu metot dispers boyar maddeler için uygun değildir. Renk giderimindeki artış ortamdaki klor konsantrasyonuna bağlıdır. Yöntemde klorun kullanılmasından ve fazla klorun atık suda kalmasından dolayı çok sık kullanılan bir yöntem değildir [11]. Ayrıca reaksiyon sonucu karsinojenik ve toksik aromatik aminlerin oluşumu yöntemin kullanışını sınırlamaktadır.

#### 2.2.1.5. Elektrokimyasal işlemler

Boyar madde gideriminde alternatif bir yöntem olarak gelişmektedir. Yapılan çalışmalar kimyasal maddenin çok az yada hiç harcanmadığını ve çamurun oluşmadığını göstermektedir. Parçalanma sonrasında herhangi bir toksik madde oluşmamaktadır. Bu metodun kullanılması ile ekonomik olarak boyar madde giderimi yanında rekalsitran kirleticilerin parçalanabildiği bildirilmiştir [26, 27].

## 2.2.2. Fiziksel Arıtım

### 2.2.2.1. Adsorbsiyon

Kirleticilerin gideriminde kullanılan metotlar arasında oldukça stabil olmasından dolayı son yıllarda çok çalışılan ve ekonomik olan bir tekniktir [28]. Renk giderimi iki mekanizma ile gerçekleşmektedir; (1) adsorbsiyon ve (2) iyon değiştirme [11]. Bu metot boyar madde/sorbent ilişkisinden, sorbentin yüzey alanı, partikül büyüklüğü, sıcaklık, pH ve temas süresi gibi birçok fizikokimyasal faktörden etkilenmektedir [29, 30, 31].

### 2.2.2.2. Aktif karbon

Boyar maddelerin adsorbsiyonunda çok sık kullanılan yöntemdir [32]. Katyonik, mordant, ve asit boyar maddelerin gideriminde oldukça etkili olurken dispers, direkt, vat, pigment ve reaktif boyar maddelerin gideriminde daha az etkilidir [13, 33]. Aktif karbonun performansı kaynağına ve atıksuyun karakterine bağlıdır. Çok yüksek hacimlerde yüklemelerde başarılıdır ve rejenerasyonu kolaydır. Ancak rejenerasyondan sonra performansı azalmaktadır ve bu azalma daha önceden belirlenememektedir. En büyük dezavantajı yüksek maliyetli olması ve rejenerasyon esnasında adsorbanın yaklaşık % 10-15'inin kaybedilmesidir. Reaktif boyar maddelerle yapılan bir çalışmada Reaktif Yellow'un yüksek oranlarda giderilmesine rağmen Reaktif Black 5 ve Reaktif Red için uygun bir adsorban olmadığı ve boyar maddenin yapısına bağlı olarak verimin değiştiği rapor edilmiştir [34].

### 2.2.2.3. Odun cipsi

Asit boyar maddelerin gideriminde oldukça etkilidirler ancak kullanımındaki güçlükler, uzun bekleme sürelerine ihtiyaç duyulması dezavantajıdır [35, 36]. İşlemden sonra boyar madde içeren odun cipsleri yakılarak enerji eldesinde kullanılabilir [37].

#### 2.2.2.4. Uçucu kül ve kömür

Adsorbsiyon hızı, uçucu kül konsantrasyonunun dolayısıyla adsorbsiyon için uygun olan yüzey alanının artması ile artmaktadır. Kömür ile birlikte kullanıldığında adsorbsiyon hızının arttığı bilinmektedir [38].

#### 2.2.2.5. Membran filtrasyon

Bu metot atıkların arıtımında, konsantre edilmesinde, en önemlisi sürekli şekilde boyar maddeleri atık sudan ayırabilmesi ile karakterizedir [18, 39]. En büyük dezavantajı oldukça yüksek yatırım maliyetinin olmasıdır. Sistemde atık suyun membrandan dışarı çıkabilmesi için kimyasal potansiyel, basınç, elektrik gibi zorlayıcı kuvvetler uygulanmaktadır [40]. Ayrıca sistemin atıksudan KOİ gideriminde de etkili olduğu rapor edilmiştir [41].

#### 2.2.2.6. İyon değiştiriciler

Boyar madde içeren atık suların arıtımında boyar maddelerin çok farklı kimyasal yapıya sahip olmalarından dolayı geniş ölçüde kullanılamamaktadır [11]. Hem katyonik hem de anyonik boyar maddeleri içeren atıksularda kullanılmaktadır. Bu yöntemin avantajı rejenerasyon ve geri kazanımda adsorban kaybının olmamasıdır. Temel dezavantajı ise maliyetidir. Rejenerasyonda kullanılan organik soventlerin pahalı oluşu ve dispers boyar maddelerin gideriminde etkisiz oluşu bu metodun kullanımını sınırlamaktadır [39].

#### 2.2.2.7. Radyasyon

Radyasyonla etkili bir şekilde organik maddelerin giderilebilmesi için uygun miktarda çözünmüş oksijen gereklidir. İşlem esnasında çözünmüş oksijen hızla tüketilir ve ortama yeniden oksijen sağlanması gereklidir. Bazı boyar maddelerin ve



fenolik bileşiklerin oksitlenebilmesini sağlayan bu yöntem yalnızca laboratuvar ölçeğinde etkili olabilmektedir [42].

### 2.2.3. Biyolojik Arıtım

#### 2.2.3.1. Bakteriyel kültürler

Birçok bakteri türünün ve karışık kültürlerinin boyar madde giderimi üzerine etkileri incelenmiştir. Özellikle diazo grubu taşıyan boyar maddelerin yaklaşık 15 günlük periyotta giderildiği bildirilmiştir [43]. Nigam ve Marchant [44], Nigam ve ark. [45] karışık boyar madde içeren atık suların bir destek materyaline fikse edilmiş veya serbest anaerobik bakteriler tarafından 24-30 saatte giderildiğini göstermişlerdir. Ogawa ve Yatome [46], mikrobiyal sistemlerin bir fermentasyon işlemine gerek duyduklarını, ancak yüksek hacimde atık suların gideriminde uygun olmadıklarını bildirmişlerdir.

Bakterilerin azo boyar maddelerin renk giderimi ve mineralizasyonu üzerine etkinliklerinin araştırıldığı çalışmalarda anaerobik ortamların renk gideriminde, aerobik ortamların mineralizasyonda daha başarılı olduğu belirlenmiştir. Anaerobik koşullarda, azo boyar maddelerdeki azo bağı indirgenip kopmakta ve azo boyar maddeler aromatik aminlere dönüşmektedir. Aromatik aminlerin, mutajenik ve karsinojenik etkili oldukları insanlarda idrar kesesi kanserine, farelerin sindirim kanalı epitel hücre çekirdeklerinde de yapı bozukluklarına yol açtıkları saptanmıştır [47, 48, 49].

Mordant yellow 3 boyar maddesinin azo bağının anaerobik şartlarda indirgenmesi sonucunda aromatik amin yapılarına dönüştüğünü (6-aminonaftalen-2 sülfonat ve 5-aminosalisilat), ardından aerobik şartlarda hidrosilasyon ve halka açılması ile mineralize edildiği rapor edilmiştir [50]. Azo boyar maddelerin anaerobik parçalanma ürünleri olan aromatik aminlerin anaerobik koşullarda daha ileri parçalanmaya uğramadığı belirtilmektedir. Birçok aromatik aminin, aerobik koşullarda tamamen parçalanabildiği bilinmektedir. Azo boyar maddelerin biyolojik parçalanmalarında anaerobik-aerobik kombine sistemlerin gerektiği ve böylece azo

boyar maddelerin biyolojik olarak tamamının en son ürünlere dönüşerek giderilebileceği rapor edilmiştir [50].

Üç farklı boyar maddenin (C.I. Acid Yellow 17, C.I. Basic Blue 3, Basic Red 2) anaerobik-aerobik parçalanmasının araştırıldığı bir çalışmada, anaerobik şartlarda Acid Yellow 17'nin % 20; Basic Blue 3'ün % 72; Basic Red 2'nin de % 78'inin giderildiğini rapor edilmiştir. Çalışmada ayrıca anaerobik-aerobik sistemlerde, anaerobik işlemin renk ve KOİ (Kimyasal Oksijen İhtitacı) gideriminde ve aerobik işlemin ise boyar maddelerin parçalanmasında etkin olduğu saptanmıştır [51].

Tan ve ark. [52], iki azo boyar maddenin (4-fenilazofenol (4-PAP) ve Mordant Yellow 10 4-sülfofenilazo-salisilik asit:MY10) kesikli sistemlerde biyolojik parçalanabilirliği üzerine çalışmışlar, boyar maddelerin anaerobik yıkımları sonucu 4-aminofenol(4-AP), anilinin ile 5-aminosalisilat (5-ASA) ve sülfanilikasite (SA) dönüştüğünü bildirmişlerdir. Bir sonraki aşamada anaerobik çamur oksijenlendirilmiş ve fakültatif aerobik bakterilerle, oksijen varlığında, oluşan bu aromatik yapıların daha ileri parçalanmaya uğradığı rapor edilmiştir.

Zhen ve ark. [53], boyar madde içeren atık suların anaerobik-aerobik işlemlerde ortamdaki baskın bakteri türleri ile arıtımını çalışmışlardır. Araştırmacılar, boyar maddelerin renk giderim verimlerinin % 90 üzerinde olduğunu rapor etmişlerdir. Reaktif Black KNB, Reaktif Red HE-3B ve Reaktif Yellow 3-RS'nin renklerinin etkin bir şekilde giderildiğini ve başlıca biyolojik parçalanma ürünlerinin fenilamin tipi maddeler olduğunu bildirmişlerdir. Çalışma sonucunda, azo boyar maddelerin renklerinin biyolojik parçalanma sonucu giderilmesinin, azo bağı ve kromofor grupların boyar maddelerden ayrılması ile oluştuğu saptanmıştır.

O'Neill ve ark. [54], Procion Red H-E7B boyar maddesinin anaerobik-aerobik koşullar altında parçalanmasını araştırmışlar, yürütülen biyolojik parçalanma sürecinde, belirli bir süre sonra ortamda aerobik koşullar sağlanarak biyolojik parçalanmaya devam edilmiştir. Procion Red H-E7B boyar maddesinin renginin %

68'nin anaerobik ortamda giderildiği; aerobik koşullarda ise renk gideriminin gözlenemediği belirtilmiştir.

Anaerobik şartlar altında, birçok bakteri türü azo bağlarını açıp iki aromatik amin oluşturarak boyaları indirgemektedir [55]. Biyolojik indirgenme çalışmalarının çoğu anaerobik prosten sonra ancak aerobik bir proses kullanılırsa renk gideriminin tam olarak gerçekleşebileceğini göstermektedir.

Ogawa ve ark. [46], aerobik şartlarda *Pseudomonas cepacia* 13NA ile azo boyalarının çoklu döner disk biyoreaktörlerde biyolojik indirgenmesini çalışmışlardır. Çalışmada model atık su 10 ppm p-aminoazobenzen içerirken renk giderimi yaklaşık 100. saatte başlamıştır. Sisteme 2. ve 3. reaktörler eklenerek sürenin azaltılması ve giderim veriminin artırılması amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda % 75-80 oranında renk giderim verimi elde edilmiştir.

Haugh ve ark. [50], bir bakteri kültürü karışımı ile sülfonlanmış azo boyası Mordant Yellow 3'ün mineralizasyonunu çalışmışlardır. Çalışmada bir anaerobik-aerobik reaktör kullanılmış ve glikoz konsantrasyonu ile boya konsantrasyonunun renk giderim verimine etkileri araştırılmıştır. Anaerobik aşamada boyar maddeden aromatik aminler (6-aminonaftalen-2-sülfonat ve 5-aminosalisilat) oluşurken aerobik aşamada bu aminler farklı bakteriyel kültürler tarafından mineralize edilmiştir.

Ganish ve ark. [56], azo boyası Reaktif Black 5 ve üç azo boyasının karışımı olan Navy 106'nın aerobik ve anaerobik şartlarda giderimini çalışmışlardır. Aerobik şartlarda Reaktif Black 5 boyasının vinil sülfon grubu, boyanın hidrolize olmuş formundan daha kolay uzaklaştırılmıştır. Navy 106'nın sorpsiyonu ve aerobik renk indirgenmesi reaktördeki biyokütle artışı ile artırılmıştır. Aerobik şartlarda toplam organik karbon (TOC) ve KOİ azaltılırken anaerobik şartlarda bu daha az gerçekleşmiştir. Aerobik şartlarda boya giderimi ilk olarak sorpsiyon ile gerçekleşmiştir. Boya giderimi 15. günde % 92'ye ulaşmıştır.

Carliell ve ark. [57], anaerobik şartlar altında reaktif bir azo boyası olan Reaktif Red 141'in mikrobiyal renk giderimini çalışmışlardır. Anaerobik şartlar altında azo boyalarının mikrobiyal solunumunda terminal elektron alıcısı gibi kullanılabileceği ve indirgenmiş flavin nükleotidleri tekrar oksitleyerek renk giderimini ve indirgenme sağladığı bulunmuştur. Çalışmada 100 mg/L boya kullanılmış ve karbon kaynağı eklenmediğinde belirgin bir renk giderimi sağlanamadığı saptanmıştır. Ortamda nitratın olması renk giderimini inhibe ederken sülfat varlığı belirgin bir etki göstermemiştir. 100 mg/L'nin üzerindeki boya konsantrasyonunun ise mikrobiyal popülasyona toksik etki gösterdiği bildirilmiştir.

Keck ve ark. [58], *Sphingomomas* türü BN6'nın naftalen sülfonik asit indirgenme yolunda redox mediatörleri ile azo boyaların indirgenmesini çalışmışlardır. Bu indirgenme yolunda sülfonlanmış azo boyası Amaranth kullanılmış ve 1,2-dihidroksi naftalen redox mediatörü gibi davranarak anaerobik indirgenme gerçekleştirilmiştir. Azo boyalarının anaerobik indirgenmesinde azo bağının açılması ilk basamaktır ve genellikle çözünebilir sitoplazmik enzimlerle gerçekleştiği rapor edilmiştir. Bununla birlikte sentetik elektron taşıyıcılarının ortama eklenmesi birçok anaerobik ve fakültatif anaerobik bakteriler için azo boyalarının indirgenme oranını arttırmıştır.

Razo-Flores ve ark. [59], azo boyalarının methanojenik şartlarda biyolojik indirgenmesini çalışmışlardır. Azo boyası olarak Mordant Orange I ve Azodisalisilat seçilmiş ve sürekli UASB reaktörle indirgenme ve renk giderimi araştırılmıştır. Mordant Orange I'de azo bağ açılması ile 5- aminosalisilik asit ve 1,4-fenilendiamin oluşmuştur. Kesikli çalışmalarla Azodisalisilat mineralize edilmiştir. Çalışmalarda 100 mg/L Mordant Orange I ve 75 mg/L Azodisalisilat azo boyar maddesi kullanılmış ve 295 mg/L-gün ile 225 mg/L-gün azo boya yükleme oranlarında Mordant Orange I için azo boya uzaklaştırma >% 99, Azodisalisilat için % 98,80 bulunmuş, aromatik amin uzaklaştırma ise sırası ile % 29,1 ve % 0,8 olarak saptanmıştır.

Donlon ve ark. [60], sürekli akışlı anaerobik reaktörde azo boyası Mordant Orange I'in detoksifikasyon ve kısmen mineralizasyonunu çalışmışlardır. Kesikli toksisite analizleri, anaerobik granüler çamurda metanojenik aktivite süresince azo boyalarının bağ açılması ile oluşan ürünlerinin azo boyalarında çok daha fazla toksik olduğunu göstermiştir. Çalışmada 217 günlük bekleme süresinde azo boyalar aromatik aminlere (1-4-fenilendiamin ve 5-aminosalisilik asit) dönüştürülmüştür. Reaktörde ko-substrat olarak glukoz kullanılmış ve 189. günün sonunda çıkış suyunda 5-aminosalisilik asit düzeyi saptanamayacak kadar azaltılmıştır. Mordant Orange I yükleme hızı 1mmol/L-gün ve 0,57 mmol/L-gün olan reaktörlerde azo boyar madde giderimi 1. reaktörde % 95,1 ve 2. reaktörde % 91,8 olarak saptanmıştır.

O'Neill ve ark. [61], anaerobik-aerobik arıtım sistemi ile azo boyalarının tekstil atıksuyu benzeri kullanılarak indirgenmesini çalışmışlardır. Çalışmada reaktif azo boyası olarak Procion Red H-E7B kullanılmıştır. Anaerobik arıtımda belirgin bir renk giderimi gözlenirken, yapılan solunum-inhibisyon testleri anaerobik çıkışında atık su toksisitesinin arttığını göstermiştir. Anaerobik procesten aerobik procese giren bu toksik bileşikler yüksek polariteye sahip bileşiklere dönüştürülmüş ve HPLC ile analiz edilmiştir. Çalışma süresince anaerobik indirgenme % 63,9, aerobik indirgenme % 11,1 ve toplam indirgenme % 75 olarak saptanmıştır.

Rajaguru ve ark. [62], tekstil atıksuları ile kontamine olmuş topraktan izole ettikleri karışık bakteriyel kültür içeren anaerobik-aerobik arıtım prosesi ile azo boyalarının biyolojik indirgenmesini araştırmışlardır. Çalışmada sülfonlanmış azo boyaları Orange G, Amido Black 10B, Direct Red 4BS ve Congo Red kullanılmıştır. Anaerobik şartlarda ko-substrat olarak glukoz kullanılmış ve azo boyaları bakteriyel biyokütle tarafından aminlere indirgenmiştir. Aminler bir sonraki basamak olan aerobik şartlarda tamamen mineralize olmuşlardır. Maksimum indirgenme oranları; Orange G için 60,9 mg/L-gün (16,99 mg/g glukoz ile), Amido Black 10B için 571,3 mg/L-gün (14,46 mg/g glukoz ile) , Direct Red 4BS için 112,5 mg/L-gün (32,02 mg/g glukoz ile) ve Congo Red için 134,9 mg/L-gün (38,9 mg/g glukoz ile) olarak saptanmıştır.

Chinwetkitvanich ve ark [63], reaktif boya banyosu atıksularının iki basamaklı UASB sistemi ile anaerobik renk giderimini çalışmışlardır. Reaktörün hidrolik bekleme süresi 12 saat sabit tutulmuş ve siyah boyanın denendiği çalışmada nişasta konsantrasyonu 500, 1000, 1500 mg/L konsantrasyonlarda renk giderim verimleri sırasıyla % 67, % 71 ve % 69 olarak saptanmıştır. Kırmızı ve mavi boyalar ile yapılan çalışmada nişasta konsantrasyonu 0, 200, 500 mg/L alınmış ve verimler kırmızı boyada; % 36, % 57, % 56 mavi boyada; % 48, % 52 ve % 56 olarak saptanmıştır. Deneysel çalışmaların sonucunda sülfat indirgeyen bakterilerin organik karbon içeriğini arttırdığı fakat renk gideriminde önemli bir rol oynamadığı saptanmıştır. Asit oluşturan bakteriler renk giderim prosesinde çok küçük bir rol alırken, metan üreten bakterilerin renk gideriminden sorumlu tek mikroorganizma olmadığı bildirilmiştir.

Walker ve Weatherley [64], asit antrokinon boyalarının biyosorpsiyonu ve biyolojik indirgenmesini çalışmışlardır. Çalışmada seçilen antrokinon boya Tectilon Blue (TB4R)'nun kesikli sistemde aerobik indirgenmesi için üç bakteri türünün (*Bacillus gordonae*, *Bacillus benzeovorans* ve *Pseudomonas putida*) karışımı kullanılmıştır. Araştırmada her üç tür de boyayı başarılı bir şekilde renksizleştirmiş ve giderim Michaelis-Menten kinetiğine göre gerçekleşmiştir. Yirmi dört saatlik sürede boyar madde biyokütle üzerinde biyosorpsiyona uğramış ve boyanın % 19'u bakteriler tarafından kullanım sonucu giderilmiştir. Çalışma çalkalamalı şartlar altında gerçekleştirilmiş ve 25 °C ile pH 7,0 değerleri kullanılmıştır. Boya konsantrasyonu 250 mg/L olarak sabitlenmiştir.

Kapdan ve ark. [65], tekstil atıksularının karışık bir bakteriyel kültür ile renk giderimini çalışmışlardır. Çalışmada; Drimaren Orange K-GL, Everzol Red RBN ve Everdirect Supra Yellow PG boyarmaddeleri kullanılmıştır. Boyar madde karışımı konsantrasyonu 200 mg/L olarak seçildiğinde 24 saatte tamamen renk giderimi sağlanmış ve en uygun ko-substrat olarak glikoz seçilmiştir.

Panswad ve Luangdilok [66], farklı çevresel şartlar altında gerçekleştirdikleri çalışmada farklı moleküler yapılarıdaki reaktif boyaların renk giderimini araştırmışlardır. Anaerobik sistemle kanserojenik ara ürünler oluştuğundan ileri arıtım sağlamak için bir aerobik-anaerobik SBR sistem kullanılmıştır. Karbon kaynağı olarak sisteme verilen glikoz ve asetik asidin toplam yükü 1000 mg/L KOİ'ye eşitlenmiştir. Boya konsantrasyonu 20 mg/L seçilmiş ve biazonin, vinilsülfonil, antrokinon, vinilsülfonil, antrokinon monoklorotriazin ve oksazin yapılarındaki Remazol Black B, Remazol Blue R, Cibacron Blue CR ve Procion Blue H-EGN reaktif boyaları kullanılmıştır. İlk üç gün içerisinde boya indirgenmesi sırasıyla % 63, % 64, % 66 olarak bulunmuştur.

Panswad ve ark. [67], anaerobik-aerobik kesikli reaktörde fosfat ve glikojen biriktiren organizmalarla azo reaktif boyaların renk giderimini çalışmışlardır. Çalışmada çamur yaşı 8 gün olarak alınmış ve anaerobik+aerobik+çöktürme süreleri 18+5+1 saat olarak belirtilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda (KOİ olarak) nutrient broth ve sodyum asetat kullanılan araştırmada 10 mg/L Remazol Black B boya konsantrasyonunda 500 mg/L nutrient broth içeren ve sodyum asetat içermeyen ortamda maksimum renk giderimi sağlanmıştır. Bu ortamda renk giderim verimleri anaerobik reaktörde % 70,8 aerobik reaktörde % 8,0 ve toplamda % 73,3 olarak saptanmıştır.

#### 2.2.3.2. Fungal renk giderimi

Beyaz çürükçül funguslar ile renk giderim çalışmaları 1980'li yılların başlarında başlamıştır. Lignin içeren kağıt ve kağıt hamuru atık sularının renginin *Phanerochaete chrysosporium* ve *Tinctoporia* sp. tarafından giderilebildiği rapor edilmiştir [68,69]. Bu güne kadar *P. chrysosporium*'un kağıt fabrikaları ve çeşitli boyar maddelerin rengini giderebildiği bildirilmiştir [8, 70-77]. *P. chrysosporium*'a ek olarak *Trametes versicolor* [8, 9], *Coriolus versicolor* [78, 79] ve *Funalia trogii* [80] gibi diğer beyaz çürükçül fungusların boyar maddelerin rengini giderebildikleri rapor edilmiştir. Beyaz çürükçül funguslar dışında *Aspergillus niger* [81, 82], *Rhizopus arrhizus* [83, 84]; *Rhizopus oryzae* [85, 86] gibi diğer fungus türlerinin de renk giderimi ve biyosorbsiyon üzerine etkileri araştırılmıştır.

Fungal renk giderimi çalışmalarını fungusun yaşam durumuna göre iki gruba ayırabiliriz [87]. Bunlardan birincisi biyolojik yıkımı ve biyosorbsiyonu gerçekleştiren canlı hücrelerle ve ikincisi adsorbsiyonda kullanılan ölü hücrelerle (fungal biyokütle) yapılan çalışmalardır. Bunun yanında funguslardan elde edilen enzimlerle de boyar madde giderim çalışmaları yapılmaktadır.

**Fungal Renk Giderimini Etkileyen Faktörler :** Funguslarla yapılan çalışmalarda renk giderimi işlemleri çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Bu anlamda etkileri ikiye ayırmak mümkündür. Bunlardan birincisi boyar madde içeren atık suyun (pH, sıcaklık, boyar madde yükü gibi) karakteridir. Diğeri ise fungal büyüme ortamı ile ilgili olan özelliklerdir.

**Fungal Büyüme Ortamı :** Farklı proseslerden çıkan birbirinden farklı atıklarda fungusların yeterli arıtımı sağlaması için fungusun gelişebilmesi için gerekli optimum şartların sağlanması gereklidir. Böylece atık sularda arıtım yapacak fungusun maksimum verim alınabilecektir [88].

**Besiyeri :** Funguslar biyosorbent olarak kullanılacaklarında genellikle boyar madde veya atık su içermeyen ortamlarda yetiştirilirler. Zhou ve Banks [84] humik asidin *R. arrhizus* tarafından biyosorbsiyonu ile ilgili çalışmada 4 farklı besi ortamını denemişlerdir. Bunlar arasında potato dextrose agar'da yetiştirilmiş fungusun biyosorbsiyon kapasitesi maksimum bulunmuştur.

Funguslar boyar madde içeren atık sularda gelişebilirler ve boyar maddeleri biyosorbsiyonla girdikleri gibi biyolojik yıkımla da giderebilirler. Boyar madde içeren ortamlarda yapılan çalışmalar genellikle boyar maddenin yapısına göre uygun karbon, azot kaynakları ve diğer besin elementlerinin bulunmasına yöneliktir.

**Karbon Kaynağı :** Pamuk ağartma işleminde en uygun karbon kaynağının glikoz, nişasta, maltoz ve sellobiyozun olduğu sükroz, ksilan, metanol ve ksilozunda yeterli verimin sağlanmadığı bulunmuş ve glikozun 5 g/L konsantrasyonunun en etkili konsantrasyon olduğu rapor edilmiştir [89]. *Coriolus* sp. No. 20 tarafından



melanoidin'in renk gideriminde en uygun karbon kaynakları glikoz ve sorbozdur [90]. *A. niger* ile yapılan çalışmada sükrozun % 69 ve melasın % 45 renk giderimi sağladığı bildirilmiştir [91]. Belsare ve Prasad [92] sükroz, glikoz, selüloz ve kağıt hamurunun sırası ile % 60, % 48, % 35 ve % 20 renk giderimi sağladığı rapor edilmiştir.

**Azot Kaynağı :** *Aspergillus sojae B-10* ile yapılan renk giderimi çalışmasında ortama eklenen 1.8 g/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 'ün en yüksek renk giderimini sağlayan ortam olduğu rapor edilmiştir. Fakat Vasdev ve arkadaşlarının [93] *Cyathus bulleri* ile yapmış oldukları çalışmada azot kaynağının etkili olmadığı bildirilmiştir. Zhang ve ark. [89]  $\text{NH}_4^+$  ilavesi yapılan ortamlardaki renk gideriminin  $\text{NH}_4^+$  ilavesi yapılmayanlara göre oldukça düşük olduğu saptamışlardır. Yüksek azot içeren boyalı plaklarda renk gideriminin inhibe olduğu rapor edilmiştir [73].

Bunun yanında fungal çalışmalarda boyar madde gideriminden sorumlu olan enzimlerin sentezinin fungusun sekonder metabolik fazında sentezlendiği ve bu sentezin karbon veya azot sınırlaması getirilen ortamlarda arttığı bilinmektedir [76, 77, 94].

**pH :** Fungusları gelişebilmesi için en önemli kriterlerden birisidir. Funguslar genellikle asidik pH değerlerinde gelişirler (pH 4-5). Farklı çalışmalarda fungal türe bağlı olarak optimum pH değerinin değiştiği belirlenmiştir. *Aspergillus niger* için pH 5,0, üç farklı deniz fungusu için 4,5, *S. commune* için 4-5 optimum pH değerleri olarak rapor edilmiştir [91, 95]. Funguslar farklı boyar maddelerin gideriminde farklı optimum pH değerlerinde çalışırlar. Basic Blue 9 giderimi için pH 6,0 ve Acid Blue 29 giderimi için pH 4.0 optimum pH olarak bulunmuştur [81, 82].

**Oksijen :** Fungusların üreme ve gelişmeleri için gereken oksijen genellikle inkübasyon ortamının çalkalanması veya havalandırılması ile elde edilmektedir. Yapılan çalışmalarda çalkalamalı şartların renk gideriminde etkili olduğunu göstermektedir [96]. Ligninin yıkımında ortamın oksijenlenmesinin lignin yıkımını arttırdığı gibi renk giderimini de arttırmıştır [92]. *T. villosa* ile renk giderim

çalışmasında renk giderim hızının arttırılmasında çalkalamalı şartların gerekli olduğu rapor edilmiştir [97].

**Sıcaklık** : Funguslar farklı optimal sıcaklıklarda gelişirler. Ancak çoğunluğu 25, 30, 35 °C arasında gelişmektedir. *Coriolus* sp. No. 20 nin 35 °C de [90], Fungus F29'un 27 °C de [89], *P. chrysosporium*'un ise 39 °C'deki gelişimleri diğer sıcaklıklardan daha fazladır.

### 2.2.3.3. Canlı hücrelerle yapılan çalışmalar

Farklı fungus türlerinin canlı hücreleriyle yapılan çalışmalarda mekanizma biyolojik yıkım, biyosorbsiyon ve enzimatik temellere dayanmaktadır (Tablo 2.1). Remazol grubu boyar maddeler (50 mg/L) *Aspergillus foetidus* tarafından biyosorbsiyonla % 68-99 (2 günde) oranında giderilmiştir [98]. Kraft ağartma işlemleri sonucu oluşan atığın rengi *P. chrysosporium*'dan elde edilen lignin peroksidaz tarafından giderildiği rapor edilmiştir [71]. Benzer enzimin kullanıldığı bir diğer çalışmada İndigo karmin, reaktif blue 15 ve birçok asit boyar maddenin (40-50 mg/L) 9 günde yıkıldığı saptanmıştır [8].

Mou ve ark. [96] boyar madde içeren çözeltiye yaş hücreleri eklediklerinde (*Myrothecium verrucaria*) ilk birkaç dakikada % 50 den daha fazla boyanın giderildiğini ve dengeye 10 saat içinde geldiğini bulmuşlardır. Boyar maddenin hücreye bağlandıktan sonra aşamalı olarak yıkılması için gerekli olan zaman boyar maddenin molekül yapısına bağlı olarak değişmiştir. Adsorbsiyon ile renk giderimi daima sınırlı olmaktadır [79]. *T. versicolor* miselleri toplam rengin ancak % 5-10'nunu [99], *Aspergillus niger*'in miselleri ise % 10-25'ini giderebilecek adsorbsiyonu gerçekleştirmiştir [91]. Boussaid [100] kağıt endüstrisi atık sularının renginin *Sagenomella striatispora* tarafından % 12 sinin adsorbsiyon ile giderildiğini rapor etmiştir. Melas ortamında yetiştirilmiş *Candida tropicalis*'in Reaktif boyar maddeleri (Red, Black, Blue) etkili bir şekilde giderebildiği ve uygun pH'nın 3,00 olduğu rapor edilmiştir [101].

**Çizelge 2.1. Fungusların canlı hücreleri kullanılarak yapılan çalışmalar**

Mikroorganizma	Boyar madde	mg/L	% giderim/zaman	Referans
<i>Aspergillus niger</i>	Basic blue 9	50	1,17* (2 gün)	[82]
<i>A. niger</i>	Acid blue 29	50	6,63* (30 saat)	[81]
<i>Botrytis cinerea</i>	Reaktif blue 19		13*	[86]
	Sulfur black 1		49,7*	
<i>Candida rugosa</i> (maya)	Reaktif black 5		31*	
	Reaktif Blue 19		8*	
<i>Tremella fuciformis</i>	Reaktif black 5		92*	
	Reaktif Blue 19		41*	
<i>Myrethecum</i>	Orange II	200	70 (5 saat)	[102]
<i>verrucaria</i>	10B blue	200	86 (5 saat)	
	RS red	200	95 (5 saat)	
<i>P. chrysosporium</i> (ligninaz enzimi)	İndigo karmin	40-50	29,8 (9 gün)	[8]
	Reaktif blue 15	40-50	75,6(9 gün)	
	Acid violet 7	40-50	26,9 (9 gün)	
	Reaktif black 5	40-50	11,3 (9 gün)	
	Acid green 27	40-50	0,2 (9 gün)	
	Acid blue 25	40-50	55,6 (9 gün)	
<i>P. chrysosporium</i>	Yağ Fb. Atık.		70 (10 gün)	[103]
<i>P. chrysosporium</i>	Congo red	500	70 (2 gün) sıvıda	[73]
		500	90 (2 gün) katıda	
<i>Pycnopus</i> <i>cinnabarinus</i>	Pigment fb. atığı		90 (3 gün)	[104]
<i>Funalia trogii</i>	Yağ Fb. Atık.	% 30	38 (9 gün) çalkalamalı 31 (6 gün) statik	[80]
<i>P. chrysosporium</i>	PAH	-	47-95	[105]

\*: adsorbe olan veya giderilen mg boya / g hücre

#### 2.2.3.4. Ölü hücrelerle yapılan çalışmalar

Ölü hücreler için mekanizma adsorbsiyondur. Zhou ve Banks [83] *Rhizopus arrhisus* misellerinin humik asidi adsorbe ederken adsorbsiyonun bifazik olduğunu ve ilk aşamada metabolik enerjiye bağlı olmadan hızlı ve ikinci aşamanın ise metabolik enerjiye bağlı olarak yavaş gerçekleştiğini rapor etmişlerdir. İnfrared spektrum sonuçlarından hücre duvarı ile humik asit arasında kimyasal bir reaksiyonun oluşmadığı fiziksel adsorbsiyonun gerçekleştiği bulunmuştur. Humik asit fungusun hücre duvarının yapısal bileşenlerinden olan kitin/kitosana adsorbe olmaktadır (84, 106). Gallagher ve ark. [85], Reaktif Brilliant Red'in *Rhizopus oryzae*'nin heterojen karakterli misellerine Freundlich ve Lagmiur izoterm modellerine uygun olarak adsorbe olduğunu rapor etmiştir.

NADH ile renk giderimi çalışmasında; NADH'nun azo boyar maddelerin renk gideriminde ve parçalanmasında etkili olduğu belirtilmiştir. Mekanizma azo gruplarının protonlanması ve sonuçta azo bağının kırılarak aromatik amin oluşumuna neden olması şeklinde açıklanmıştır [107]. Bu çalışma ile insan vücuduna giren boyar maddelerin yıkılmaları sonucunda karsinogenik amin oluşumuna neden olabilecekleri gösterilmiştir.

Ölü hücrelerle yapılan çalışmalarda mekanizma adsorbsiyon ve iyon değişimi gibi fizikokimyasal ilişkileri içeren biyosorbsiyon temeline dayanmaktadır (Çizelge 2.2). Yapılan çalışmalarda fungus besi ortamında yetiştirildikten sonra renk giderim çalışmalarında kullanılmadan önce ısı ile öldürülmektedir. Bu şekilde bir adsorban gibi değerlendirilen fungusun metabolik faaliyetlerinin ve enzimlerinin aktif olması engellenmiş olmaktadır.

#### 2.2.3.5. Enzimlerle yapılan çalışmalar

Canlı hücreler için temel mekanizma biyolojik yıkımdır çünkü hücreler lignini ve boyar maddeleri parçalayabilen lakkaz [109, 110], mangan peroksidaz [77, 111, 112], lignin peroksidaz [74, 113, 117] enzimlerini hücre dışına sentez

edebilmektedirler [40, 95, 115]. Bu tür bir enzimatik atak molekülün hücre içine alınmasına gerek olmaksızın parçalayabildiğinden etkili olmaktadır. Bununla beraber bu enzimlerin sentezleri fungus türleri arasında farklılık gösterdiğinden boyar maddelerin yıkımlarının da fungus türleri arasında farklı olmasına neden olmaktadır.

**Çizelge 2.2.** Fungusların ölü hücreleri ile yapılan çalışmalar

Kültür	Boyar madde adı	Kons. (mg/L)	Biyosorpsiyon mg boya/g KM	Referans
<i>Aspergillus niger</i>	Basic blue 9	50	10,49-18,54* (2 gün) **	[82]
<i>A. niger</i>	Acid blue 29	50	1,44-13,82* (30 saat) **	[81]
<i>Botrytis cinerea</i>	Reaktif blue 19		42	[86]
	Sulfur black 1		360	
<i>Candida rugosa</i> (maya)	Reaktif black 5		31	
	Reaktif Blue 19		8	
<i>Tremella fuciformis</i>	Reaktif black 5		79	
	Reaktif Blue 19		35	
<i>P. chrysosporium</i>	Congo red	500	90* (2 gün)**	[73]
			sıvıda 31 (6 gün) statik	
<i>Rhizopus oryzae</i>	Reaktif Brillant Red	250	37,2 (4 hafta)**	[85]
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Remazol Orange		200	[108]
	Remazol Blue		150	
	Cibacron Red		100	

\*: % renk giderimi; \*\* Temas süresi

*P. chrysosporium*'dan elde edilen peroksidazların boyar madde yıkımında anahtar rolü olduğu bildirilmesine karşın [75, 77, 116], Olikka ve ark. [74] MnP'nin boyar madde yıkımının başlangıç aşamasında rol almadığını rapor etmişlerdir.

Benzer sonuç Young ve Yu [8] tarafından rapor edilmiş 8 sentetik boyar maddenin renginin *Trametes versicolor*'dan elde edilen LiP tarafından giderildiğini ancak MnP'in renk giderimi üzerine etkisinin olmadığı bildirilmiştir.

Zhang ve ark. [89] tanımlanmamış bir fungustan (F29) izole edilen MnP'in pamuk ağartma işlemlerinden kaynaklanan atık suyun rengini gidermesine karşın ortamda LiP aktivitesine rastlanmadığını rapor etmişlerdir. *Trametes versicolor*'un sentezlediği en önemli enzim olan lakkaz enziminin azo, anthraquinone ve indigo boyar maddelerin rengini giderdiği bildirilmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda enzimatik renk gideriminin gerçekleşebilmesinin boyar maddenin yapısına bağlı olduğu gösterilmiştir. *Pycnoporus cinnabarinus*'dan elde edilen lakkaz enzimi ile yapılan çalışmada Chicago Sky Blue 6B nin bu enzimle parçalandığı ve ortamda iki farklı ara ürün oluştuğu saptanmıştır [110]. *T. hirsuta*'dan elde edilen lakkaz enzimi ile yapılan bir çalışmada, enzimin fungustan çok daha başarılı olduğu bildirilmiştir [117]. *Aspergillus niger*'den elde edilen lakkaz enziminin fenol gruplarına bağlı metil grubu içeren boyar maddeleri kolaylıkla yıkabildiği bildirilmiştir [118]. *Irpex lacteus* ile yapılan bir başka çalışmada, antrakinin boyar madde Remazol Brilliant Blue R'nin renginin fungustan elde edilen kültür özütüyle giderildiği ve enzimin mangan peroksidaz olduğu rapor edilmiştir [119].

Yapılan literatür araştırmalarında boyar madde gideriminde, boyar maddenin yapısının, kullanılan mikroorganizmanın türünün ve ortam şartlarının önemli olduğu görülmektedir. Bu çalışmada beyaz çürükçül funguslardan *F. troglia* ile Türkiye'de en çok kullanılan boyar maddelerden biri olan Reaktif Black 5'in [14] giderimi çalışılmış, çalışmada boyar madde gideriminde en etkili ortam koşullarının, sıcaklığın, pH'nın, statik ve çalkalamalı koşullarda maksimum boyar madde gideriminin bulunmasına çalışılmıştır.

### 3. MATERYAL ve METOT

#### 3.1. MATERYAL

##### 3.1.1. Fungusların Devamlılığının Sağlanması

Çalışmada kullanılan beyaz çürükçül funguslar (*Phanerochaete chrysosporium*, *Funalia trogii*, *Pleurotus florida*, *Pl. eryngii* ve *Pl. sapidus*) Mersin Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarından elde edilmiş, funguslar her 20 günde bir Potato Dextrose Agar (Oxoid) besiyerine aşılanmış ve 30 °C'de 7 gün inkübe edilmişlerdir (Sanyo MIR 152). Stok kültürler çalışmada kullanılabilecek kadar + 4,0 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

##### 3.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

###### 3.1.2.1. Besiyerinin İçeriği

Çalışmada stok bazal ortam olarak tanımlanan besiyerinin bir modifikasyonu (prekültür ortamı) kullanılmıştır (Çizelge 3.1) [120]. Çalışmada ortam pH'sının ayarlanması için 0.1 M sodyum fosfat tamponu kullanılmış ve çalışma farklı sıcaklıklarda (20; 25; 30; 35 °C) yapılmıştır.

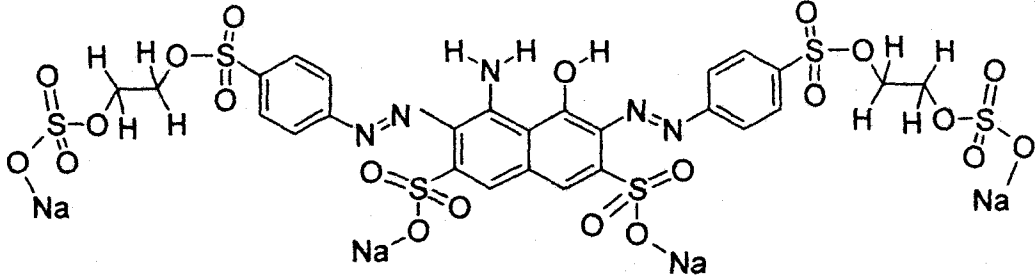
**Çizelge 3.1. Prekültür Ortamı**

Kullanılan Kimyasallar	Miktar (g/L)
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / NH <sub>4</sub> Cl / Üre*	0,05
Glikoz	5,0
MnSO <sub>4</sub>	0,025
FeSO <sub>4</sub>	0,025
pH (Fosfat Tamponu)	5,0

\* Statik koşullarda etkisi incelenecek olan azot kaynağı kullanılmıştır.

### 3.1.2.2. Çalışmada kullanılan boyar madde

Çalışmada Türkiye’de tekstil fabrikalarında en fazla kullanılan [14] dört sülfon grubu taşıyan ve bir diazo boyar madde olan Reaktif Black 5 (Remazol Black B, Everzol Black B, CI 20505 ) kullanılmıştır (Şekil 3.1).



Molekül ağırlığı=1023,82; Formülü= C<sub>26</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>Na<sub>4</sub>O<sub>21</sub>S<sub>6</sub>

Molekül Bileşimi= C %30,50 H %2,07 N %6,84 Na %8,98 O %32,82 S %18,79

Şekil 3.1. Reaktif Black 5 (Remazol black B)'nin kimyasal yapısı [121]

### 3.1.2.3. Fungusların aşılınması

Çalışmada kullanılan funguslar SDA besiyerinde petri kabının yüzeyini örtecek şekilde yetiştirilmiştir. Yaklaşık 1 cm<sup>2</sup> olacak şekilde kesilen 5 adet fungus içeren agar parçası prekültür besiyerine aktarılmış (30 mL ortam) ve statik koşullarda 30 °C’de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır [122, 123]. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra yetişen fungus miselleri bir araya toplanmış ve steril izotonik serum (% 0,9 NaCl) ile yıkanmıştır. Böylece prekültürden gelmesi muhtemel karbon ve azot kaynağından arındırılmıştır. Yıkanan fungus miselleri steril koşullarda politron homojenizatörde (IKA DI 25, 18 mm çaplı) 13500 rpm’de 30 saniye parçalanmış ve çalışmanın yapılacağı besiyerine (Çizelge 3.2) 1 mL/30 mL misel süspansiyonu olacak şekilde aşılınmıştır [124, 125].



**Çizelge 3.2.** Boyar madde içeren inkübasyon ortamı

Kullanılan Kimyasallar	Miktar (g/L)
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / NH <sub>4</sub> Cl / Üre**	*
Glikoz	1,8**
Boyar Madde	0,015
pH	***

\* Statik koşullarda farklı konsantrasyonlarda eklenmiştir.

\*\* Çalkalamalı koşullarda ortama eklenmemiştir.

\*\*\* Statik koşullarda 4,78; 5,00; 5,50; 6,00'a ve çalkalamalı koşullarda 4,78'e ayarlanmıştır.

### 3.2. METOT

Çalışmada boyar maddenin *F. trogii* ile inkübasyonu boyunca pH, renk, Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ), toplam karbonhidrat, protein, kuru misel ağırlığı (KMA) ve enzim (lakkaz ve peroksidaz) analizleri yapılmıştır. Analizler çalışma ortamlarından elde edilen örneklerin 5000 rpm'de 10 dk satrifüjlenmesinin (Hettich Micro 22R) ardından elde edilen dökeltide (süpernetan) 3 tekrarlı yapılmıştır.

#### 3.2.1. pH ve Renk Analizleri

pH analizleri Hanna instruments 8521 ile yapılmıştır. Renk Analizleri HACK DR/2010 marka spektrofotometrede boyar maddenin maksimum absorpsiyon gösterdiği dalga boyundaki ( $\lambda = 597$  nm) absorbans azalışıyla saptanmış [7] ve boyar maddenin distile su kullanılarak hazırlanmış standart eğrisinden hesaplanmıştır. Renk giderimi % olarak aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$\text{Boyar madde giderimi (\%)} = \frac{[OD_1 - OD_2]}{OD_1} \times 100$$

OD<sub>1</sub> : Ortama eklenen boyar maddenin absorbansı ( $\lambda = 597$  nm)

OD<sub>2</sub> : Birim zamanda ortamda ölçülen boyar maddenin absorbansı ( $\lambda = 597$  nm)

### 3.2.2. Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ) Analizleri

HACK DR 2010 COD reaktörü ve spektrofotometresi ile standart metotlara uygun olarak yapılmıştır [127, 128, 129].

#### Gerekli Kimyasallar

##### a- Parçalama solüsyonu

500 mL distile suda 103 °C de 2 saat kurutulmuş 10,216 g  $K_2Cr_2O_7$  çözülür. Üzerine 167 mL konsantre sülfirik asit, 33,3 g  $HgSO_4$  eklenir ve soğutulur. Çözelti 1000 mL'ye tamamlanır.

##### b- Sülfirik Asit Ayıracı

Sülfirik asitin kg başına 5,5 g  $Ag_2SO_4$  çözünür, çözünmesi için birkaç gün beklenir.

##### c- Sülfamik Asit

Nitrit girişimini engellemek için kullanılır (10 g sülfamik asit / mg  $NO_2^-$ -N).

##### d- Potasyum bifitalat solüsyonu ( $HOOC_6H_4COOK$ )

Standart eğri hazırlamak için Potasyum bifitalat'tan (120 °C de sabit tartıma getirilmiş) 425 mg alınır ve 1000 mL distile suda çözülür.

#### Çizelge3.3. Kolorimetrik KOİ tayininde kullanılan hacimler

Tüp(mm)	Örnek (mL)	A solüsyonu(mL)	B solüsyonu(mL)	Son Hacim(mL)
16 x 100	2,5	1,5	3,5	7,5

#### Deneyin Yapılışı

- 1- Tüplere Tablo 1'de yazılı miktarlarda kimyasallar eklenmiştir.
- 2- Kapakları kapatılarak hızlıca karıştırılır ve 150 °C'de ısıtılmış COD reaktörüne yerleştirilmiştir.
- 3- 2 saat kaynamaya bırakılmıştır.

- 4- 2 saat sonunda ısıtıcıdan çıkarılır ve oda sıcaklığına gelene kadar bekletilmiştir.
- 5- 600 nm de distile suya karşı hazırlanmış köre karşı okunur, potasyum bifitalat ile hazırlanmış standart eğriden hesaplanmıştır.

### 3.2.3. Toplam Karbonhidrat Tayini

Yöntem, basit şekerleri, oligosakkaritler, polisakkaritlerin sülfirik asit varlığında fenol ile reaksiyona girerek turuncu-sarı renk vermesi esasına dayanmaktadır [130, 131, 132].

#### Gerekli Kimyasallar

##### a- Fenol Çözeltisi

5 g fenol 100 mL ye tamamlanır.

##### b- Konsantre Sülfirik Asit (%98)

#### Deneyin Yapılışı

1 mL örnek üzerine 1 mL fenol çözeltisi eklenerek hızla karıştırılmıştır. Üzerine 5 mL konsantre sülfirik asit eklenmiştir. Hızla karıştırılır ve 30 dk beklenmiştir. 488 nm'de distile su ile hazırlanmış köre karşı okunur ve glikoz ile çıkarılmış standart eğriden hesaplanmıştır.

### 3.2.4. Protein Tayini [133]

#### Gerekli Kimyasallar

##### A Solüsyonu

100 mL distile suda 0,2 g sodyum-potasyum tartarat ile 10 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  çözülür.

### B Solüsyonu

100 mL distile suda 2 g sodyum-potasyum tartarat ile 1 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  çözülür.

### C solüsyonu

Folin-Ciocolteu'nun 1 mL si 15 mL distile su ile seyreltilir.

### Deneyin yapılışı

1. 1 mL örnek 50 °C de su banyosuna alınır ve 10 dakika beklenmiştir.
2. Üzerine 0,9 mL A solüsyonu eklenir ve 50 °C de su banyosunda 10 dakika beklenmiştir.
3. Süre sonunda tüpler su banyosunda çıkarılır ve oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur.
4. Üzerine 0,1 mL B solüsyonu eklenir, karıştırılır ve 10 dakika beklenmiştir.
5. Üzerine 3 mL C solüsyonu eklenir, karıştırılır ve 50 °C de su banyosunda 10 dakika inkübe edilmiştir.
6. Süre sonunda tüpler su banyosunda çıkarılır ve oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur.
7. Distile su ile hazırlanmış köre karşı 650 nm'de okunmuştur.
8. Örneklerdeki protein miktarı Bovine Serum Albumine (BSA) ile çıkarılmış standart eğriden hesaplanmıştır.

### 3.2.5. Kuru Misel Ağırlığı (KMA) Tayini

Tayini yapılacak ortam önceden darası alınmış (103-105 °C de 2 saat kurutulmuş) filtre kağıdından (Filtrak no: 389, A<sub>1</sub>) süzüldükten sonra 103 °C'de 2 saat pastör fırınında (Nüve FN 500) kurutulmuş, yarım saat desikatörde bekletilmiş ve ardından tartılmıştır (A<sub>2</sub>). Aradaki fark (A<sub>2</sub>-A<sub>1</sub>) KMA olarak kaydedilmiştir.

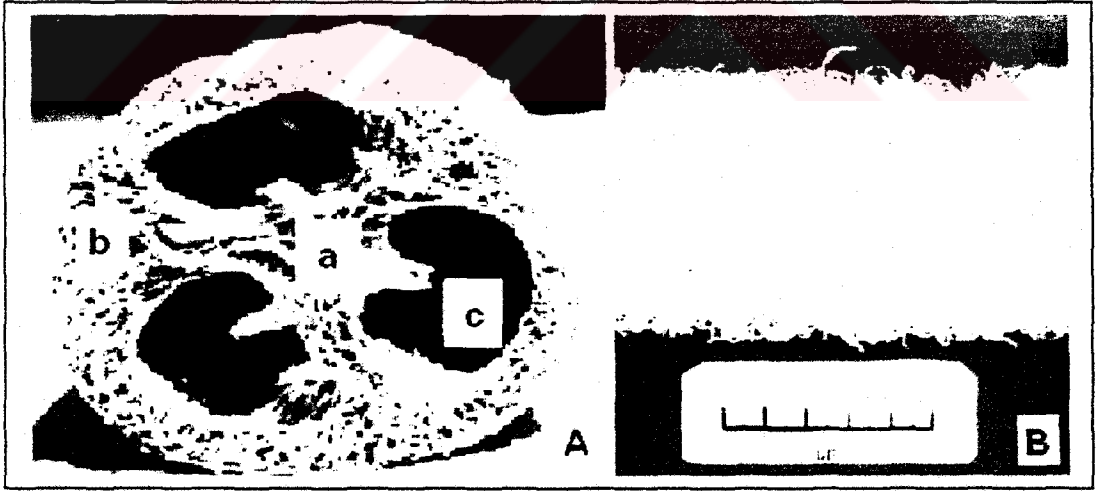
$$\underline{KMA = A_2 - A_1}$$

Tutuklama materyali içeren ortamlarda KMA tayini, önceden darası alınmış tutuklama materyalinin ağırlığı da ( $A_3$ ) son tartımdan çıkartılarak hesaplanmıştır.

$$\underline{KMA = A_2 - (A_3 + A_1)}$$

### 3.2.6. Tutuklama Materyali *Luffa cylindrica*'nın (Lif) Hazırlanışı

Çalışmada tutuklama materyali olarak kullanılan ve ticari olarak satılan *Luffa cylindrica* (*L. aegyptiaca*, lif), tohumlarından ayrıldıktan sonra üzerinde taşıdığı organiklerin uzaklaştırılması için 3 defa 30 dakika distile su ile kaynatılarak temizlenmiştir. Lifin göbük kısmı (Şekil 3.1; a) kesilerek ayrılmıştır. Ardından, kalan yan yüz (Şekil 3.1; b; periferal yüz) kübik şekilde ( $1,0 \times 1,0 \times 1,0 \text{ cm}^3$ ) kesilmiş ve tekrar distile su ile yıkanmıştır. Parçalar, suları süzildükten sonra  $103^\circ\text{C}$ 'de 2 saat kurutulmuş, 30 dakika desikatörde bekletilmiş ve ardından tartılmıştır ( $A_3$ ). Tartımın ardından 250 mL lik erlenlere eklenerek üzerine 0,05 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,05 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 20,00 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  içeren 100 mL pH 4,78 fosfat tamponu eklenmiştir. Bu ortam çalışmada kullanılmak üzere  $121^\circ\text{C}$ , 1 atm basıçta 15 dakika steril edilmiştir.



Şekil 3.2. Tutuklama materyali olarak kullanılan *Luffa cylindrica*'nın enine kesiti (A) (a: merkez, b: periferal yüz, c: boşluk) [134] ve tutuklamada kullanılan periferal yüzü (B) [135]

### 3.2.7. Fenoloksidaz (Lakkaz ve Peroksidaz) Aktivitelerinin Ölçümü

Bağıl Lakkaz ( $O_2$ :p-difenol oksido-redüktaz, EC.1.10.32) aktivitesinin saptanmasında, guaikol (Sigma) substrat olarak kullanılmış ve bunun oksidasyonu sonucu ortaya çıkan kinonlara bağlı olarak oluşan renk spektrofotometrede (HACK DR/2010) ölçülmüştür [136, 137]. Lakkaz aktivitesi ölçümünde ; 10  $\mu$ m guaikol / 5mL sodyum fosfat tamponu (0,1 M) içerecek şekilde hazırlanmış guaikol çözeltisinin 4 mL'sine 1mL kültür süpernatantı eklenerek 30 °C'de 60 dakika inkübe edilmiştir. Oluşan rengin ölçümü 465 nm dalga boyunda yapılmış ve bağıl lakkaz aktivitesi, inkübasyon karışımının optik yoğunluğunda 1,0 birim artışa neden olan enzim aktivitesi (CU) olarak tanımlanmıştır.

Peroksidaz (oksidoredüktaz, E.C.1.11.1.7) aktivitesi bağıl lakkaz aktivitesine benzer şekilde ölçülmüş, sadece guaikol çözeltisine 1,5  $\mu$ L  $H_2O_2$  eklenmiştir. Bağıl peroksidaz aktivitesi, inkübasyon karışımının optik yoğunluğunda 1,0 birim artışa neden olan enzim aktivitesi (CU) olarak tanımlanmıştır [136, 137].

#### 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Beyaz çürükçül funguslarla renk giderim çalışmaları; canlı fungal hücrelerle (biyolojik yıkım ve biyolojik absorpsiyon), ölü hücrelerle (adsorpsiyon) ve funguslardan elde edilen hücre dışı enzimlerle yapılmaktadır. 1980'li yılların başlarından itibaren başlayan renk giderim çalışmaları günümüze kadar hızla artmıştır. Eaton ve ark. [68] kağıt ve kağıt hamuru atıklarının renginin *Phanerochaete chrysosporium* ve *Tinctopona sp.* tarafından giderildiğini rapor etmişlerdir. Renk giderim çalışmalarında çoğunlukla *P. chrysosporium* kullanılmıştır [73, 76, 77, 138]. *P. chrysosporium* dışında *Trametes versicolor* [139, 140], *Coriolus versicolor* [78, 79] ve *Funalia trogii* [80, 141] gibi beyaz çürükçül fungusların da renk gideriminde etkili oldukları rapor edilmiştir.

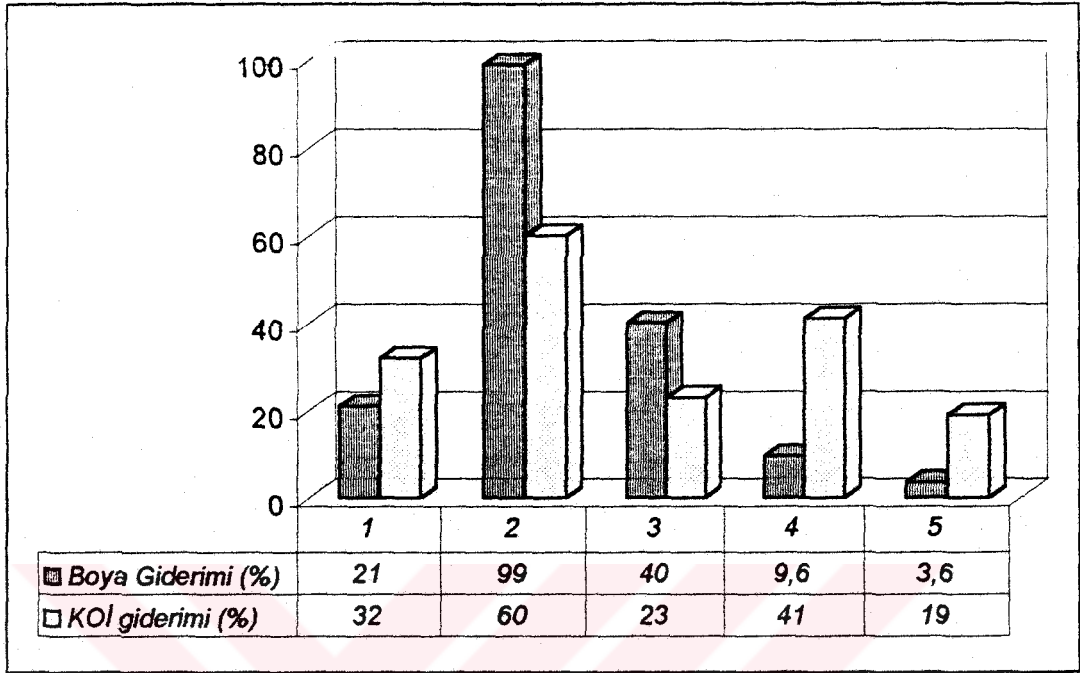
Beyaz çürükçül fungusların; atıkları mineralize edebilme özellikleri, üreme, gelişme ve enzim sentezleme yetenekleri türden türe farklılık gösterdiği gibi fungusun bulunduğu çevresel faktörlere (ortam sıcaklığı, pH'sı, ortamın karbon ve azot içeriği vb.) bağlı olarak da değişebilmektedir. Bu nedenle çalışmalarda kullanılan atığın gideriminde en uygun fungusun seçilmesi yanında en ideal pH, sıcaklık, karbon ve azot türünün ve konsantrasyonunun da saptanması gerekmektedir [142].

Bu çalışmada beyaz çürükçül funguslardan *Funalia trogii*'nin bir diazo boyar madde olan Remazol Black 5 (Reaktif black 5)'in renk giderimindeki etkinliğinin ve renk gideriminde en ideal ortam şartlarının (en ideal pH, sıcaklık, karbon kaynağı, azot kaynağı, azot kaynağı konsantrasyonu, statik ve çalkalamalı koşullarda renk giderim kapasitesi) bulunmasına çalışılmıştır.

##### 4.1. ÇALIŞMADA KULLANILACAK FUNGUSUN SAPTANMASI

Dört sülfon grubu taşıyan bir diazo boyar madde olan Remazol Black B'nin (Reaktif black 5, RB5) renk gideriminde kullanılacak fungusun saptanması için ön çalışma olarak beş farklı beyaz çürükçül fungusun (*Phanerochaete chrysosporium*, *Funalia trogii*, *Pleurotus florida*, *Pl. eryngii*, *Pl. sapidus*) renk giderim etkinliği

araştırılmıştır. Statik koşullarda yapılan çalışmada ortam pH'sı 5.0'e ve sıcaklığı 30 °C'ye ayarlanmıştır. İnkübasyon boyar maddenin % 99'unun giderildiği güne kadar (21 gün) sürdürülmüştür.



Şekil 4.1. Fungusların Renk ve KOİ giderimleri (pH 5,00; 30 °C; 150 mg/L boyar madde; 21 gün) (1. *P. chrysosporium* 2. *F. trogii* 3. *Pl. florida* 4. *Pl. eryngii* 5. *Pl. sapidus*)

*Phanerochaete chrysosporium*, *Funalia trogii*, *Pleurotus florida*, *Pl. eryngii* ve *Pl. sapidus*'un 150 mg/L boyar madde içeren ortamların rengini 21 günde %3,6-%99 ve KOİ yi ise % 19-% 60 oranında giderebildikleri saptanmıştır (Şekil 4. 1). En yüksek renk ve KOİ giderimine (%99-%60) *F. trogii* aşlanmış kültürlerde rastlanmıştır. Fungusların benzer ortam şartlarında inkübe edilmelerine rağmen KOİ ve renk giderimlerinde farklılık gösterdikleri belirlenmiştir. Bu durum, fungusların fizyolojik açıdan farklı olmalarından kaynaklanmaktadır [143-146]. Özsoy [147] tarafından yapılan Drimarene X3LR ve Remazol Brilliant Blue R boyar maddelerin renginin beyaz çürükçül funguslarla giderim çalışmasında, *F. trogii*'nin renk gideriminde *P. chrysosporium*'dan daha etkili olduğu bildirilmiştir. Bu sonuç, çalışılan 5 fungus türü arasında yer alan *F. trogii*'nin renk gideriminde *P. chrysosporium*'dan daha başarılı bulunmasını destekler görünmektedir.



Çalışmanın daha sonraki aşamalarında *Funalia trogii*'nin Remazol Black 5 (Reaktif black 5)'in giderimindeki etkinliğinin, boyar maddenin gideriminde en ideal pH, sıcaklık, karbon kaynağı, azot kaynağı ve azot kaynağı konsantrasyonunun, ayrıca saptanan ideal şartlarda en yüksek renk giderim kapasitesinin bulunmasına çalışılmıştır.

#### 4.2. STATİK KOŞULLARDA *F. TROGII* İLE REAKTİF BLACK 5'İN RENK GİDERİMİ ÜZERİNE ORTAM ŞARTLARININ ETKİSİ

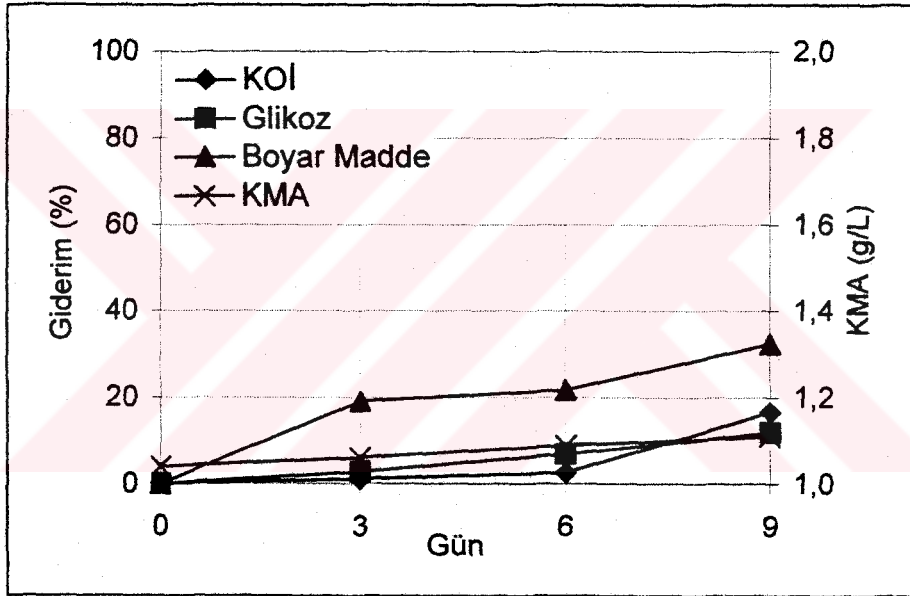
Çalışmada Bölüm 3.2.3'de bildirildiği gibi hazırlanan *Funalia trogii*'nin boyar madde içeren kültür ortamlarında inkübasyonun başlangıcında yapılan şeker analizlerinde glikoz miktarı yaklaşık 155,0 – 182,0 mg/L olarak bulunmuştur. Literatürlerde, boyar madde içeren ortamlarda glikoz konsantrasyonunun 100-300 mg/L aralığında tutulmasının renk giderimi açısından en uygun konsantrasyonu sağlayacağı [148] ve ortamdaki glikoz miktarının 0,1 g/L'den 0,3; 0,5; 0,7; 1,0; 3,0; 5,0; 7,0 g/L'ye çıkarılmasının renk giderim verimini arttırmadığı rapor edilmiştir [147]. Bu nedenle pH ve sıcaklık çalışmalarında ortama glikoz eklemesi yapılmamış, başlangıç boyar madde konsantrasyonu spektrofotometrik tayinlerde kolaylık sağlanması amacıyla yaklaşık 15,0 mg/L'de sabit tutulmuştur. Yapılan ön çalışmalarda 15,0 mg/L konsantrasyonda boyar maddenin renginin 9 günlük inkübasyon süresi sonunda % 90'nının giderildiği saptanmış ve statik çalışmalarda inkübasyon süresi en fazla 9 gün olarak belirlenmiştir.

##### 4.2.1. Sıcaklığın Renk Giderimi Üzerine Etkisi

*Funalia trogii*'nin 1,0 mL misel süspansiyonu yaklaşık 15,0 mg/L boyar madde içeren ve fosfat tamponu ile pH'sı 5,0'e ayarlanmış 30 mL inkübasyon ortamlarına aşılanmıştır. Sıcaklığın renk giderimi üzerine etkisinin bulunabilmesi amacıyla hazırlanan kültürler dört farklı sıcaklıkta (20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C ± 1 °C) ve statik koşullarda inkübe edilmişlerdir. Renk giderimi yanında KOİ, glikoz giderimi (%) ve KMA (g/L) değişimleri 9 gün boyunca üçer gün aralıkla izlenmiştir. Inkübasyonun başlangıcında (fungusun ortamlara aşılanmasından sonra) yapılan

analizlere KOİ'nin  $322,80 \pm 15,48$  mg/L, glikozun  $168,25 \pm 12,18$  mg/L ve kuru misel ağırlığının  $1,000 \pm 0,021$  g/L olduğu saptanmıştır.

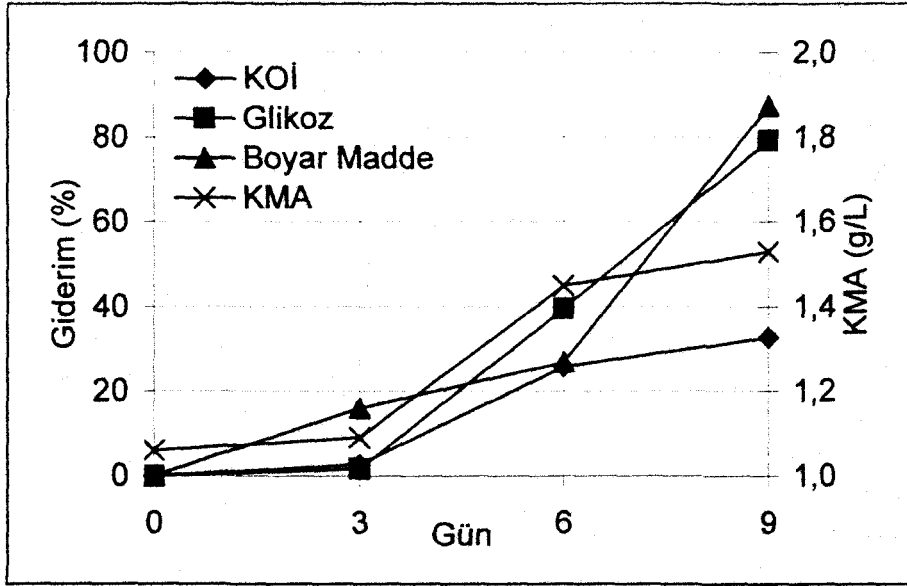
Sıcaklığın  $20$  °C'ye ayarlandığı ortamda inkübasyonun 3. gününde KOİ ve glikozda çok düşük düzeyde giderim saptanmıştır (% 1,17 ve % 2,85). İnkübasyonun sonunda KOİ ve glikoz giderimi sırası ile % 16,71 ve % 12,00' ye ulaşmıştır. Yapılan analizler, inkübasyonun 3. gününden sonra boyar maddenin renginin diğer günlere oranla hızla giderildiği (% 19,07); 6. günde % 21,84 ünün ve 9. günde % 32,43 ünün giderildiğini göstermiştir. Fungusun  $20$  °C'de inkübe edilen ortamlarda yavaş geliştiği ve inkübasyon sonunda kuru ağırlığını ancak  $1,11$  g/L'ye arttırdığı saptanmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *Funalia trogii*'nin  $20$  °C'de RB5 içeren ortamda KOİ, glikoz, renk giderimi (%) ve KMA değişimi (g/L)

Sıcaklığın  $25$  °C'ye ayarlandığı ortamda inkübasyonun 3. gününde ortamdaki KOİ ve glikozun yaklaşık olarak % 2,73 ve % 1,65'nin giderildiği saptanmıştır. İnkübasyon sonunda KOİ giderimi % 32,73 ve glikoz giderimi ise % 79,12'e ulaşmıştır. Yapılan boyar madde analizlerinde rengin 3. ve 6. günlerde sırası ile % 15,96 ve % 26,79'u giderilmiştir. Renk gideriminin 9. günde hızla arttığı ve % 87,37'ye ulaştığı saptanmıştır (Şekil 4.3). KMA analizleri  $25$  °C'de inkübe edilen

fungusun ortama 3 günde adapte olduğunu, 3. ve 6. günler arasında hızla ürediğini ve 6. günden sonra durağan faza girdiğini göstermiştir.

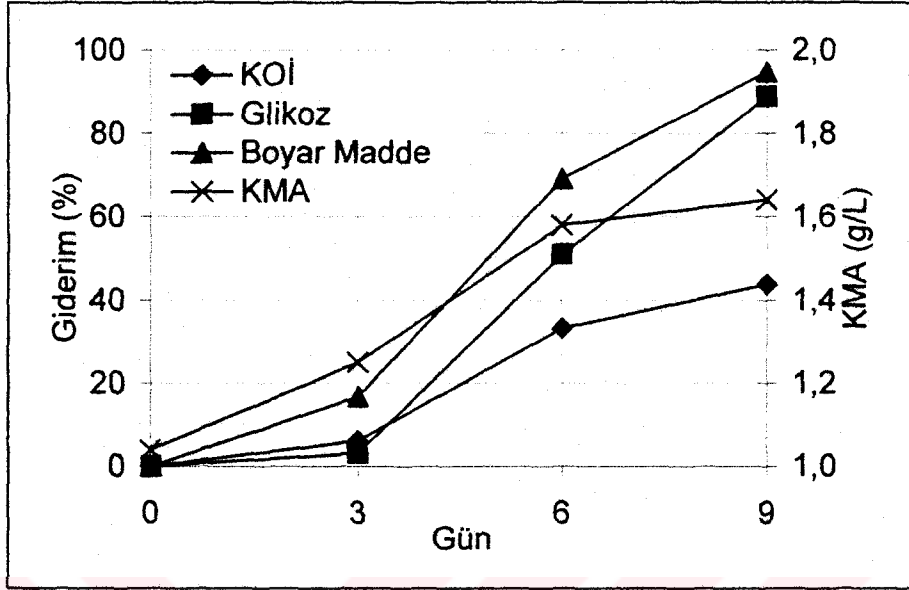


Şekil 4.3. *Funalia trogii*'nin 25 °C'de RB5 içeren ortamda KOİ, glikoz, renk giderimi (%) ve KMA değişimi (g/L)

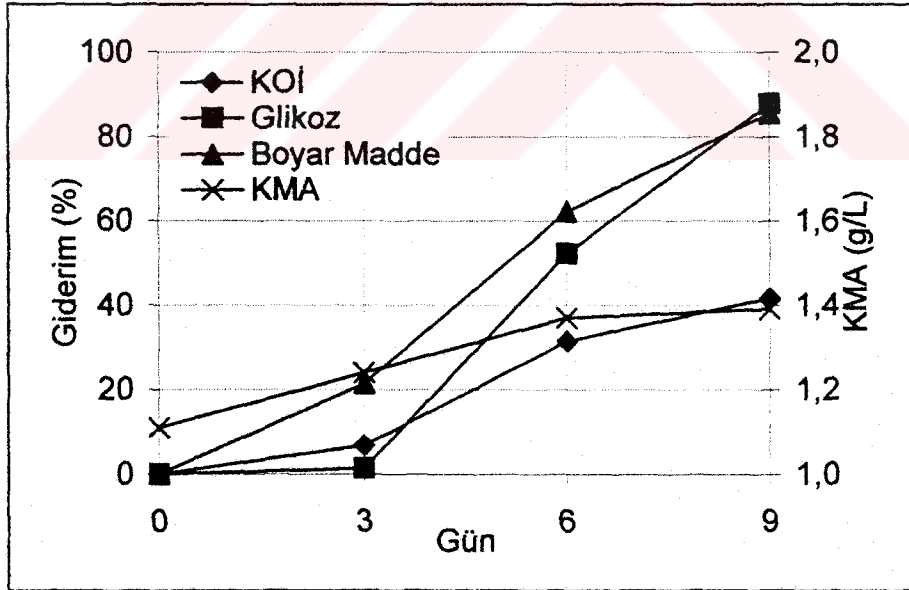
Sıcaklığın 30 °C'ye ayarlandığı ortamda inkübasyonun 3. gününde KOİ ve glikoz giderimi % 6,16 ve % 3,10 olarak gerçekleşirken, bu oran 6. günde % 33,11 ve % 50,93'e ulaşmıştır. İnkübasyon sonunda KOİ'nin % 43,83'ü, glikozun % 88,81'inin giderildiği saptanmıştır. Yapılan boyar madde analizlerinde, rengin 3. günde % 16,80, 6. günde % 69,15 giderildiği tespit edilmiş ve 9. günde giderim % 94,77'ye ulaşmıştır (Şekil 4.4). KMA sonuçları fungusun ortama inkübasyonun 3. gününden önce adapte olduğu ve 6. gününden sonra fungusun durağan faza girdiğini göstermektedir.

Sıcaklığın 35 °C'ye ayarlandığı ortamlarda 3. günde KOİ'nin % 6,73'ü, 6. günde % 31,41'i ve 9. günde % 41,67'si giderilmiştir. Ortamda günlere bağlı glikoz giderimi KOİ giderimine benzer şekilde en yüksek 6. günde gerçekleşmiştir. İnkübasyonun 3., 6., ve 9. günlerinde glikozun sırasıyla % 1,29, % 57,71 ve % 89,14 oranlarında giderildiği saptanmıştır. En hızlı boyar madde giderimi 6. günde gerçekleşmiş ve ortama eklenen boyar maddenin % 62,14'ü giderilmiştir.

İnkübasyon sonunda renk giderimi % 85,58'e ulaşmıştır (Şekil 4.5). KMA sonuçları fungusun ortama 3 günden önce adapte olduğunu, ağırlığını 6. güne kadar arttırdığını ve inkübasyon sonunda 1,39 g/L'ye ulaştığı göstermektedir.



Şekil 4.4. *Funalia trogii*'nin 30 °C'de RB5 içeren ortamda KOİ, Glikoz, Renk giderimi (%) ve KMA değişimi (g/L)

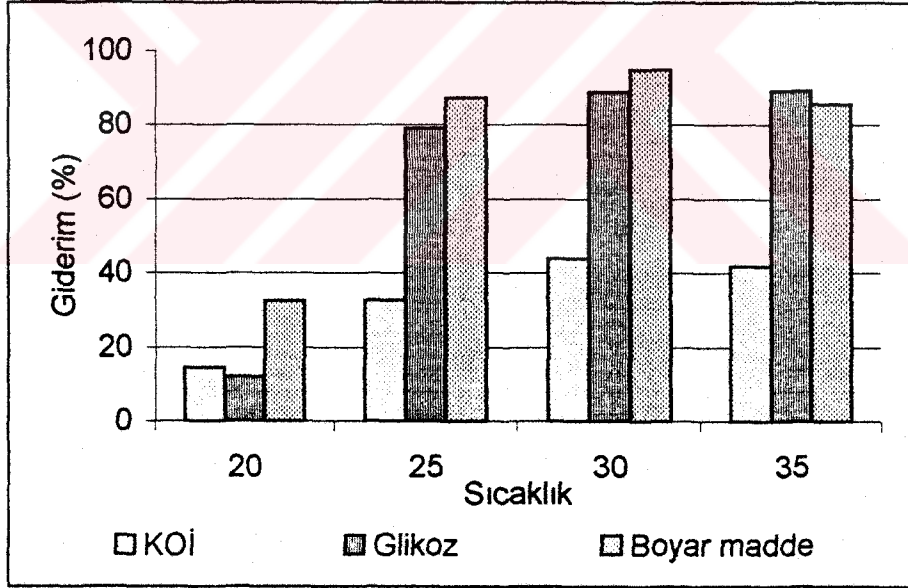


Şekil 4.5. *Funalia trogii*'nin 35 °C'de RB5 içeren ortamda KOİ, Glikoz, Renk giderimi (%) ve KMA değişimi (g/L)

Fosfat tamponu ile pH sı 5,00'e ayarlanan ve farklı sıcaklıklarda inkübe edilen fungus aşılınmış ortamda pH'nın inkübasyon sonuna kadar değişmediği gözlenmiştir.

Reaktif Black 5'in *Funalia trogii* tarafından giderimi üzerine sıcaklığın etkisinin incelendiği bu çalışmada, farklı sıcaklıklara ait renk gideriminin 30 °C > 25 °C ≥ 35 °C > 20 °C şeklinde sıralandığı (Şekil 4.6) ve en yüksek renk gideriminin 30 °C'de gerçekleştiği bulunmuştur.

Azo boyar madde Orange II ile yapılan bir başka çalışmada ise odun çürükçül fungus F29'un boyar maddenin rengini giderdiği en uygun sıcaklık 27 ve 30 °C olarak bildirilmiştir [149]. Astrazon Red FBL'nin *Funalia trogii* ile renk giderim çalışmasında 30 °C'nin renk giderimi için en uygun sıcaklık olduğu rapor edilmiştir [141]. Bu çalışmada da benzer bulguların elde edilmesi kullanılan fungus (*F. trogii*) için en ideal sıcaklığın 30 °C olduğunu göstermektedir.

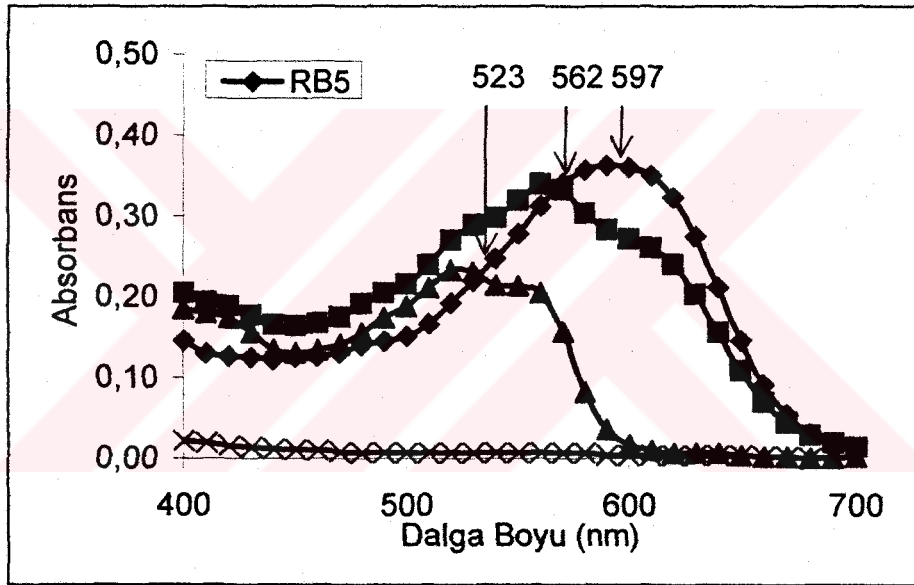


Şekil 4.6. Farklı sıcaklıklarda RB5 içeren ortamda KOİ, Glukoz ve Renk giderimi (%)

Çalışma boyunca ortamlarda yapılan spektrofotometrik analizler reaktif black 5'in renk giderimi esnasında maksimum absorpsiyon gösterdiği dalga boyunun değiştiği ve zamana bağlı olarak 597 nm'den 562 nm'ye ve ardından 532 nm'ye

kaydığı saptanmıştır (şekil 4.7). Benzer sonuç çeşitli araştırmalarda da rapor edilmiştir.

*P. chrysosporium* ile kristal violet'in biyolojik yıkımında boyar maddenin maksimum absorbsiyon gösterdiği dalga boyu (571 nm) boyar madde yıkımının başlaması ile 541 nm'ye kaymıştır [150]. Metilen mavisinin *C. versicolor* ile renk giderimi çalışmasında ise renk gideriminin başlaması ile dalga boyunun 664 nm'den 632, 615, 602 ve 599 nm'ye kaydığı rapor edilmiştir [123]. Reaktif black 5 ve beyaz urukul funguslardan *Geotrichum* CCM1 1019 ile yapılan bir çalışmada inkübasyon boyunca boyar maddenin maksimum absorbsiyon gösterdiği dalga boyu 591 nm'den 510 nm'ye kaydığı bildirilmiştir [151].



şekil 4.7. Reaktif Black 5'in *F. trogii* ile inkübasyonu boyunca maksimum absorbsiyon gösterdiği dalga boyunda oluşan kaymalar.

Çalışmada Reaktif black 5'in renk gideriminde değişen dalga boyuyla birlikte ortam renginin de değiştiği saptanmıştır. Ortam renginin lacivert-siyahtan kırmızıya döndüğü ve ardından rengin tümüyle giderildiği belirlenmiştir. Boyar maddelerle (metilen mavisi, Azure B, poly B-411 ve Remazol brillant blue R) yapılan renk giderim çalışmalarında da benzer bulgular rapor edilmiştir [123, 152, 153, 154]. *Trametes versicolor*'la yapılan renk giderimi çalışmasında Reaktif Black 5'in

maksimum absorbans gösterdiği dalga boyunda kaymaların saptandığı ve renginin de değiştiği bildirilmiştir [155]. Poly R-478'in renk giderimi çalışmasında poliüretan köpüğe tutuklanmış *P. chrysosporium* BKM-F-1767 kültürlerinin ortam rengini birkaç günde koyu kırmızıdan sarı-turuncuya çevirdiği rapor edilmiştir [156].

Çalışılan tüm sıcaklıklarda yapılan makroskobik ve mikroskobik incelemede boyar maddenin fungus yüzeyine adsorbe olmadığı gözlenmiştir. İndigo boyar maddenin *Phellinus gilvus*, *Pleurotus sajor caju*, *Pycnoporus sanguineus*, ve *P. chrysosporium* ile renk gideriminde, boyar maddenin fungal misellere adsorbe olduğu ve bir süre sonra misellerin renginin eski hallerine döndüğü bildirilmiştir [157]. Benzer sonuç Perez ve ark. [158] tarafından da rapor edilmiş, misel üzerine adsorbe olan renk verici maddelerin LiP ve MnP aktivitesinin artması ile giderildiği bildirilmiştir. Fu ve Viraraghavan [159], *Aspergillus niger*'i farklı metotlarla ön işleme tutmuşmuşlar ve boyar maddelerin adsorbsiyonunu incelemişlerdir. Çalışma sonucunda Basic Blue 9'un karboksil ve amino; Acid Blue 29'un amino; Disperse Red 1'in amino gruplarına ve lipit fraksiyonuna; Congo red'in ise amino, karboksil, fosfat gruplarına ve lipit fraksiyonuna bağlandığı gösterilmiştir. *F. trogii* ile yapılan bir başka çalışmada yapılan makroskobik incelemede Astrazon Red FBL'nin fungal misellere adsorbe olduğu ve bunun renk gideriminde başlangıç evresini oluşturduğu rapor edilmiştir [141].

Sıcaklığın *F. trogii*'nin Reaktif Black 5'in renk giderimi üzerine etkisinin incelendiği bu bölümde en uygun sıcaklık 30 °C olarak saptanmış ve çalışmanın ileri aşamalarında ortam sıcaklığı 30 °C'ye ayarlanmıştır. Sıcaklık yanında başlangıç pH'sının da fungal gelişme ve renk giderimi üzerine etkili olduğundan en uygun pH'nın bulunmasına çalışılmıştır.

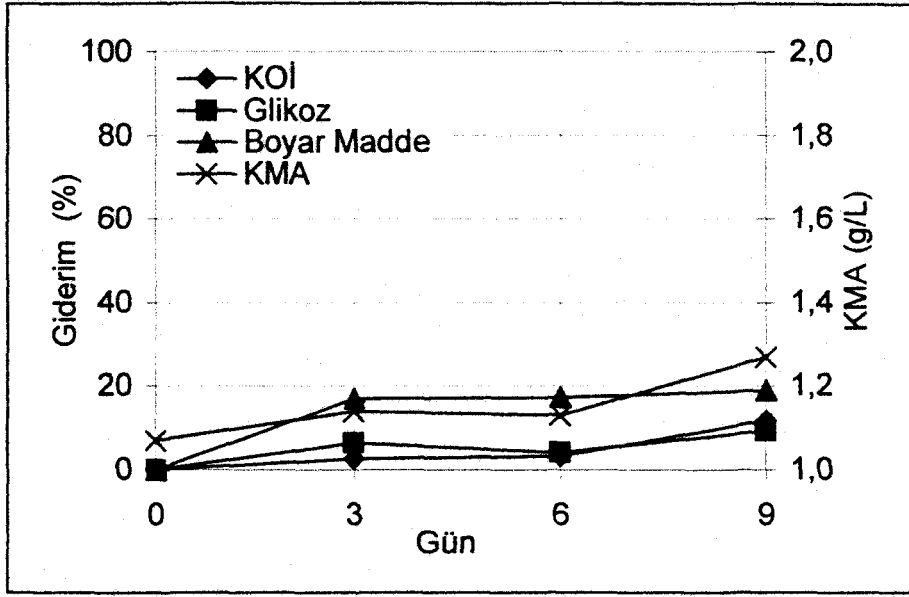
#### 4.2.2. Başlangıç pH'sının Renk Giderimi Üzerine Etkisi

Statik koşullarda yapılan çalışmada, başlangıç pH'sının renk giderimi üzerine etkisinin bulunabilmesi amacıyla çalışma dört farklı pH'da (pH 6,00; 5,50; 5,00; 4,78) gerçekleştirilmiştir. Ortam sıcaklığı, en yüksek renk gideriminin saptandığı sıcaklık olan 30 °C'ye ayarlanmıştır. Yaklaşık  $15,26 \pm 0,291$  mg/L boyar madde içeren ortamlarda, renk giderimi yanında KOİ ve glikoz giderimi (%) ile KMA değişimleri (g/L) 9 gün boyunca üçer gün aralıkla izlenmiştir. Ortamlarda inkübasyonun başlangıcında (fungus ortama aşılandıktan sonra) yapılan analizlerde  $316,75 \pm 24,39$  mg/L KOİ ve  $166,50 \pm 10,15$  mg/L glikoz saptanmıştır.

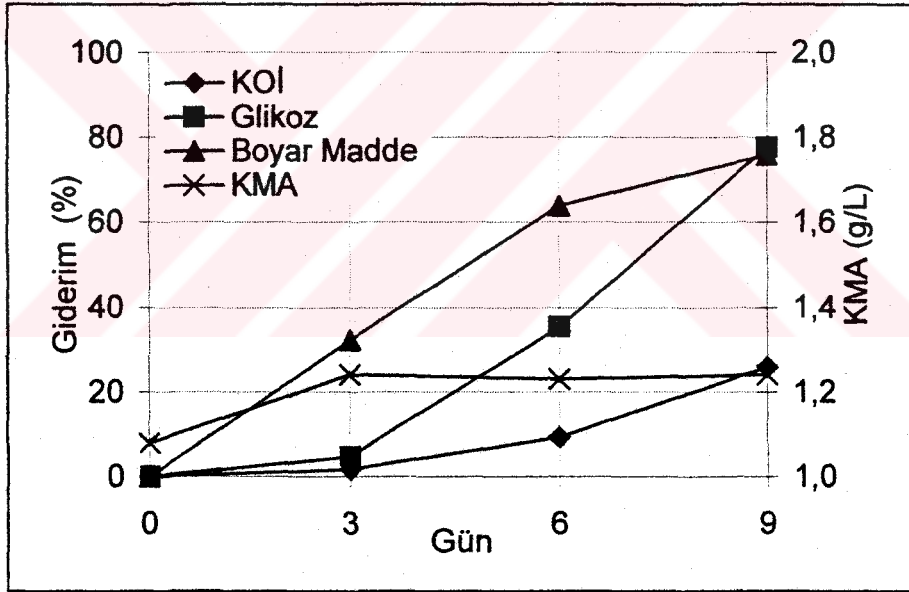
Fosfat tamponu ile pH'sı 6,00'ya ayarlanmış ortamlarda inkübasyon sonunda kadar yapılan KOİ ve glikoz analizlerinde sırasıyla % 11,75 ve % 9,41 giderim sağlandığı saptanmıştır. Boyar maddenin rengi inkübasyonun ilk üç gününde diğer günlere oranla hızla giderildiği (% 16,97) belirlenmiş ve inkübasyonun sonuna kadar renk gideriminde belirgin bir artış olmamıştır (% 18,93). Kuru misel ağırlığı analizleri; pH 6,00'da boyar madde içeren ortamlarda fungusun gelişiminin yavaş olduğunu göstermiş, 1,07 g/L ağırlıkta aşılana fungusun inkübasyon sonunda 1,27 g/L'ye ulaştığı saptanmıştır (Şekil 4.8).

Fosfat tamponu ile pH'sı 5,50'e ayarlanan ortamlardaki KOİ ve glikoz gideriminin, inkübasyonun 3. gününden sonra hızla arttığı ve 9. günün sonunda sırasıyla % 25,77 ve % 77,65 olarak gerçekleştiği saptanmıştır. Ortamlara eklenen boyar maddenin renginin, 3. gününde % 32,29'unun giderimi sağlanırken giderim 6. günde % 63,75'e ve 9. günde %75,90'a ulaşmıştır. Bu ortamlarda fungus, gelişimini inkübasyonun ilk 3 gününde tamamlamış ve inkübasyon sonuna kadar değişmeden kalmıştır (Şekil 4.9).





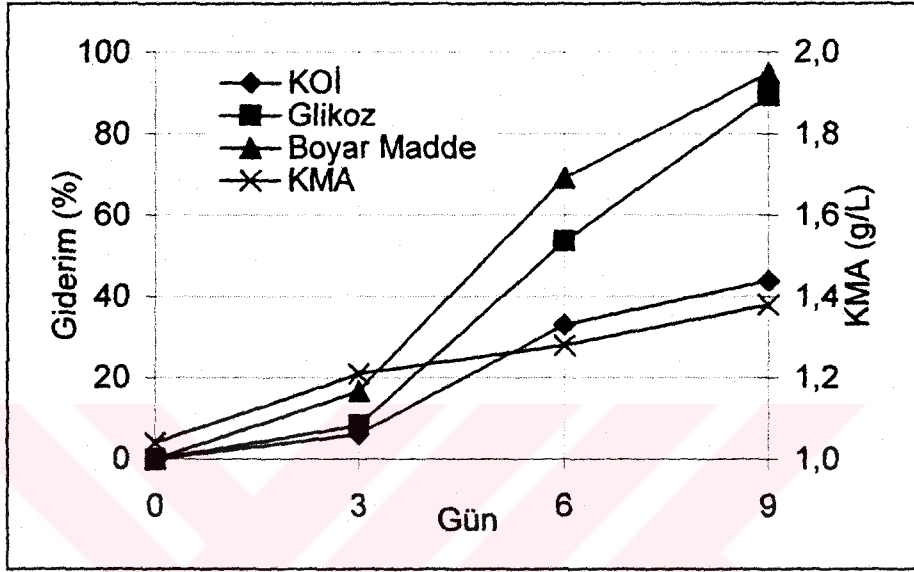
Şekil 4.8. *Funalia trogii*'nin pH 6,00'da RB5 içeren ortamda KOİ, Glikoz, Renk giderimi (%) ve KMA değişimi (g/L)



Şekil 4.9. *Funalia trogii*'nin pH 5,50'de RB5 içeren ortamda KOİ, Glikoz, Renk giderimi (%) ve KMA değişimi (g/L)

Fosfat tamponu ile pH'sı 5,00'e ayarlanan ortamlarda inkübasyonun 3. gününde; KOİ % 6,17, glikoz ise % 8,24 oranında giderilmiştir. İnkübasyonun 6. gününde KOİ ve glikoz gideriminin hızla arttığı (sırasıyla % 33,12 ve % 53,53) belirlenmiştir. İnkübasyon sonunda fungusun, KOİ de % 43,83 giderim sağladığı ve

ortamdaki glikozun % 89,41'ini kullandığı saptanmıştır. Ortama eklenen 15,30 mg/L konsantrasyondaki boyar maddenin renginin 3. günde ancak % 16,8'i giderilirken bu oran 6. ve 9. günlerde % 69,15 ve % 94,77'yi bulmuştur. Fungus, aşılması takip eden günlerde üremeye başlamış ve bu pH'da 3. günde saptanan ağırlık artışı aşılandığı andaki KMA'dan yüksek bulunmuş ve bu sonuç fungusun 3. günden önce adaptasyonunu tamamladığını göstermiştir (Şekil 4.10).

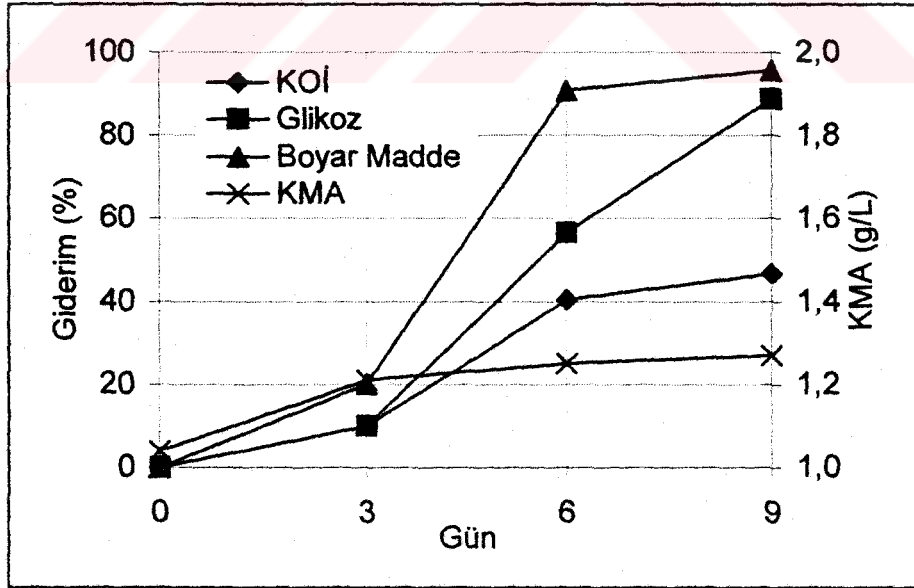


Şekil 4.10. *Funalia trogiï*'nin pH 5,0'da RB5 içeren ortamda KOİ, Glikoz, Renk giderimi (%) ve KMA değişimi (g/L)

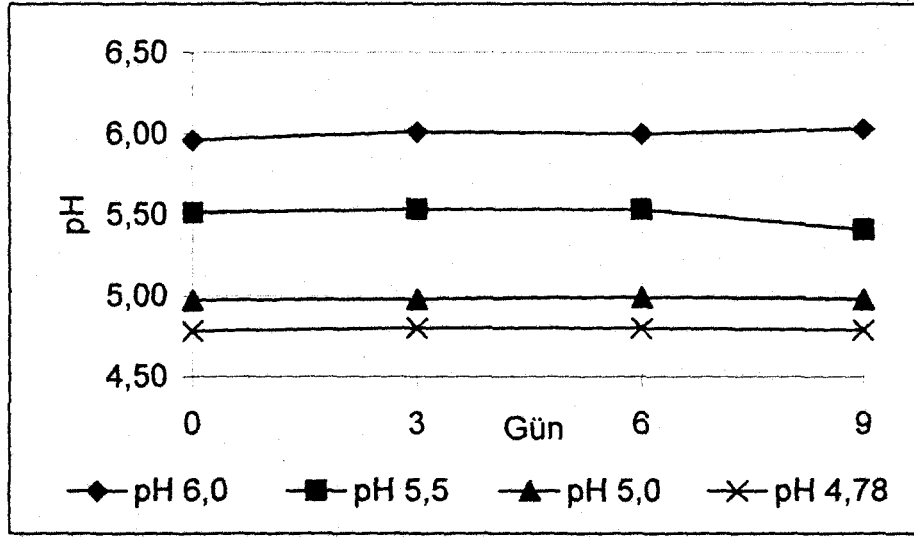
Fosfat tamponu ile pH'sı 4,78'e ayarlanan ortamlarda, inkübasyonun 3. gününde KOİ ve glikoz giderim oranları benzer bulunmuştur (sırasıyla %10,03 ve % 10,00). İnkübasyonun 6. gününde KOİ ve glikoz giderim hızının arttığı (sırasıyla % 40,44 ve % 56,47), inkübasyon sonunda fungusun KOİ'de % 46,71 giderim sağladığı ve ortamdaki glikozun % 88,82'sini kullandığı saptanmıştır. Ortama eklenen boyar maddenin 3. günde % 20,19'unun, 6. günde % 90,78'inin ve 9. günlerde %95,63'ünün giderildiği bulunmuştur. Bu ortamda 3 günlük inkübasyon sonucunda kuru misel ağırlığı 1,21 g/L'ye yükselmiş ve inkübasyon sonunda ağırlık 1,27 g/L'ye ulaşmıştır (Şekil 4.11).

Bu çalışmada farklı başlangıç pH'larına sahip ortamlarda yapılan pH analizleri, ortam pH'larının inkübasyon boyunca değişmediğini göstermiştir (Şekil 4.12).

Literatürlerde funguslarla yapılan çalışmalarda başlangıç pH'sının asitliğe kayması ile renk gideriminin meydana geldiği bildirilmektedir. Kalsiyum aljinata tutuklanmış fungusla yapılan bir çalışmada ortam pH'sının 5,00'e ayarlanmasına rağmen inkübasyon boyunca pH'nın 4,00 ve ardından 3,00'e düştüğü [160], Reaktif black 5'in kullanıldığı bir başka çalışmada pH'nın *Geotrichum*'un inkübasyonu boyunca 7,00'den 5,3'e düştüğü bildirilmiştir [151]. Çalışmalarda ortamın pH'sının asitliğe kayması, besin maddelerinin (karbon ve azot kaynakları vb.) fungal parçalanmaları sonucu oluşan organik asitlerden kaynaklandığı rapor edilmektedir [160, 161]. Ortam pH'larının asitliğe kaydığı çalışmalar incelendiğinde kullanılan karbon ve azot kaynaklarının bu çalışmada kullanılan konsantrasyonun oldukça üzerinde olduğu (yaklaşık 10 g/L) görülmektedir. Yüksek miktarda olan karbon kaynağının fungus tarafından kullanılması ile ortam pH'sının asitliğe kayması beklenen bir sonuç olarak görülmektedir. Bunun yanında farklı türdeki boyar maddelerin bakterilerle renk giderimi çalışmasında tamponlu ve tamponsuz ortamların etkisi incelenmiştir. Çalışmalarında ortamlara en yüksek 10 mg/L konsantrasyonda glikoz eklemişlerdir. Çalışma sonucunda tamponsuz ortamlarda pH'nın asitliğe kaydığı, fosfat tamponunun kullanıldığı ortamlarda pH'nın daha stabil olduğu ve pH kontrolü için uygun bir tampon olduğu bildirilmiştir [162].



Şekil 4.11. *Funalia trogii*'nin pH 4,78'de RB5 içeren ortamda KOİ, Glikoz, Renk giderimi (%) ve KMA değişimi (g/L)

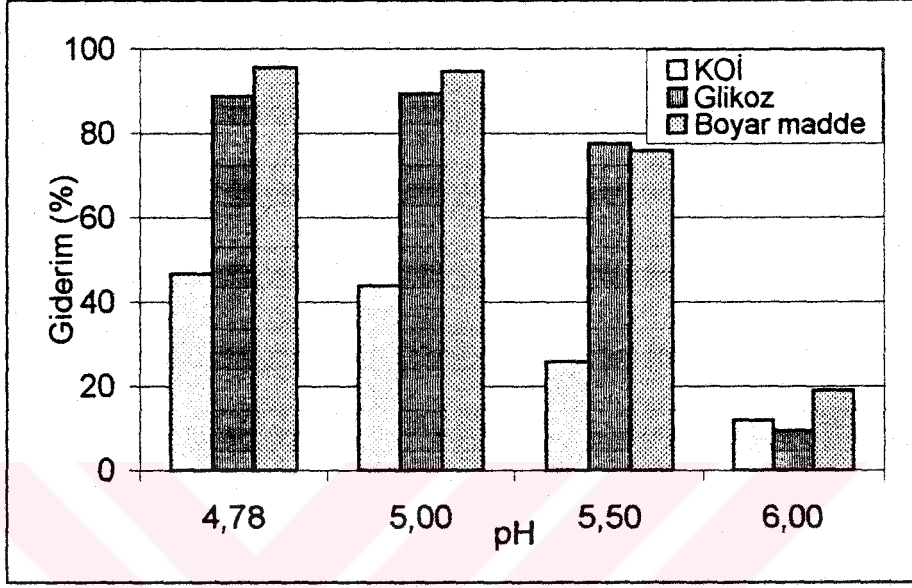


Şekil 4.12. Farklı başlangıç pH'larında günlere bağlı pH değişimi

Farklı başlangıç pH'larında yapılan çalışmalarda inkübasyon sonunda en yüksek KOİ, glikoz ve renk gideriminin pH 5,00 ve 4,78'de gerçekleştiği (% 94,77 ve % 95,63) saptanmıştır (Şekil 4.13). Ancak 6 günlük inkübasyon süresi sonunda başlangıç pH'sının pH 5,00 olduğu ortamlarda % 69,15, başlangıç pH'sının 4,78 olduğu ortamlarda ise % 90,78 renk giderimi sağlanması Reaktif Black 5'in renk gideriminde en ideal başlangıç pH değerinin 4,78 olduğunu göstermektedir.

Literatürler doğaya zararlı rekalsitrant (biyolojik parçalanmaya dirençli) ve/veya antropojenik (doğaya yabancı insan yapısı) maddelerin fungal yıkımlarının asidik pH'da gerçekleştiğini göstermektedir. *Trametes versicolor*'dan elde edilen LiP'in Reaktif Black 5'in renginin giderilmesinde optimum pH 4,90 olarak bulunmuş, asidik ortamların renk gideriminde daha etkili olduğu rapor edilmiştir [8]. *Aspergillus niger* ile yapılan melas atık sularının renk giderimi çalışmasında, başlangıç pH'sının renk giderimi üzerine etkili olduğu ve en uygun pH'nın 5,00 olduğu rapor edilmiştir [91]. Beyaz çürükçül fungus F29 ile pamuklu kumaşların yıkama ünitelerinden kaynaklanan renkli atık suların renginin giderilmesinde optimum pH 4,0-5,0 bulunmuştur [89]. Direk Black 22'nin *Aspergillus ficuum* ile renk giderimi çalışmada optimum pH 4,0 ve sıcaklık ise 33 °C olarak rapor edilmiştir [126]. Bir beyaz çürükçül fungus türü olan *Trametes modesta*'dan elde

edilen lakkaz enzimi ile birçok boyar maddenin renk giderim çalışması yapılmış ve araştırma bulgularında Reaktif Black 5'in de içinde bulunduğu dört farklı boyar maddenin (Acid Blue 74, Acid Blue 225, Reactive Blue 221) renk gideriminde en uygun pH'nın 4,5-5,0 arasında olduğu gösterilmiştir [163]. Bu kaynaklar bu çalışmada elde edilen optimum pH değerini destekler görünmektedir.



Şekil 4.13. Farklı pH'larda KOİ, Glukoz ve Renk giderimi (%)

Literatürlerde, fungusların aşılандıkları ortamlarda tamponları karbon ve enerji kaynağı olarak kullandıkları rapor edilmektedir. Nagel ve arkadaşlarının [164] sitrik asit tamponunun fungal gelişme üzerine etkisini inceledikleri çalışmada; ortamdaki glüközün tükenmesi ile tamponun karbon kaynağı olarak kullanıldığı saptanmıştır. Yapılan diğer bir çalışmada, tartarat tamponunun glüköz açlığı başladığında fungus tarafından karbon kaynağı olarak kullanıldığı rapor edilmiştir. Aynı çalışmada tamponun kullanılmasından dolayı boyar maddelerin renginin giderilemediği bildirilmiştir [165]. Literatür bilgileri organik tamponların ortamda karbon açlığı başladığında karbon kaynağı olarak kullanıldığını göstermektedir. Çalışmada kullandığımız fosfat tamponunun pH'sının inkübasyon süresi boyunca sabit kalması kullanılan tamponun fungus tarafından kullanılmadığını göstermiştir.

#### 4.2.3. *Funalia trogii* ile Reaktif Black 5'in Renk Giderimi Üzerine Farklı Karbon Ve Azot Kaynaklarının Etkisi

Beyaz çürükçül funguslarla kirleticilerin yıkımları üzerine yapılan birçok araştırma, fungusların kirleticilerin yıkımlarından sorumlu enzimlerini (ligninolitik enzimler) sentezleyebilmeleri ve boyar maddenin rengini giderebilmeleri için inkübasyon ortamlarının karbon ve azot oranının sınırlı bir düzeyde tutulması gerektiğini göstermektedir [123, 165]. Bazı araştırmacılar ortama eklenen karbon kaynağının renk giderim verimini arttırdığını rapor etmişlerdir [166]. Bununla beraber, Drimarene X3LR ve Remazol Brillant Blue R boyar maddelerin renginin giderilmesinde ortama karbon ve enerji kaynağı olarak eklenen glikozun artan konsantrasyonlarının (0,1-7,0 g/L) renk giderim veriminde etkin olmadığı bildirilmiştir [147]. Bunun yanında, Kapdan ve Kargı [167] tarafından yapılan renk giderimi çalışmasında *Coriolus versicolor* için en uygun glikoz konsantrasyonunun 10 g/L olduğunu, konsantrasyonun daha aşağıya çekilmesiyle renk gideriminin önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir. Bu farklı sonuçlar boyar maddenin renginin gideriminde, sıcaklık ve pH'nın yanı sıra ortamdaki karbon ve azot kaynağı konsantrasyonunun da önemli bir faktör olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, Reaktif Black 5'in *F.trogii* tarafından renginin gideriminde en uygun karbon kaynağı, azot kaynağı ve azot kaynağı konsantrasyonunun bulunmasına çalışılmıştır.

Çalışmada karbon kaynağı olarak tüm funguslar tarafından kullanılabilen glikoz (monosakkarit), tekstil fabrikaları atık sularında bulunan nişasta (polisakkarit) ile şeker ve alkol fabrikaları atık sularında (melas ve vinas) bulunan sükroz (disakkarit, glikoz + fruktoz) kullanılmış ve kullanılan karbon kaynağı konsantrasyonu çalışmanın bu bölümünde sabit (1,8 g/L) tutulmuştur. Çalışmada azot kaynağı olarak yapısında iki adet azot taşıyan üre ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ); bir adet azot taşıyan amonyum klorür ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) ile bir adet azotun yanı sıra gelişme için gerekli fosforu da taşıyan amonyum dihidrojenfosfat ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ) kullanılmıştır. Azot kaynakları ortamlara dört farklı konsantrasyonda eklenmiştir (17,40; 5,11; 2,55; 0,50 mM). Çalışmada üç farklı karbon kaynağı kullanıldığından (glikoz, sükroz, nişasta),

fungus renk giderim etkisinin inceleneceği karbon kaynağının kullanıldığı prekültür ortamında yetiştirilmiştir.

Optimum sıcaklık (30 °C) ve pH'da (pH 4,78) yaklaşık 15 mg/L Reaktif Black 5 içeren ortamda renk giderimi 9 gün boyunca üçer gün aralıklarla izlenmiştir. Çalışmada kontrol grubu olarak karbon ve azot kaynağı eklenmeyen ortam kullanılmıştır.

4.2.3.1. Glikoz içeren ortamda farklı azot kaynaklarının renk giderimi üzerine etkisi

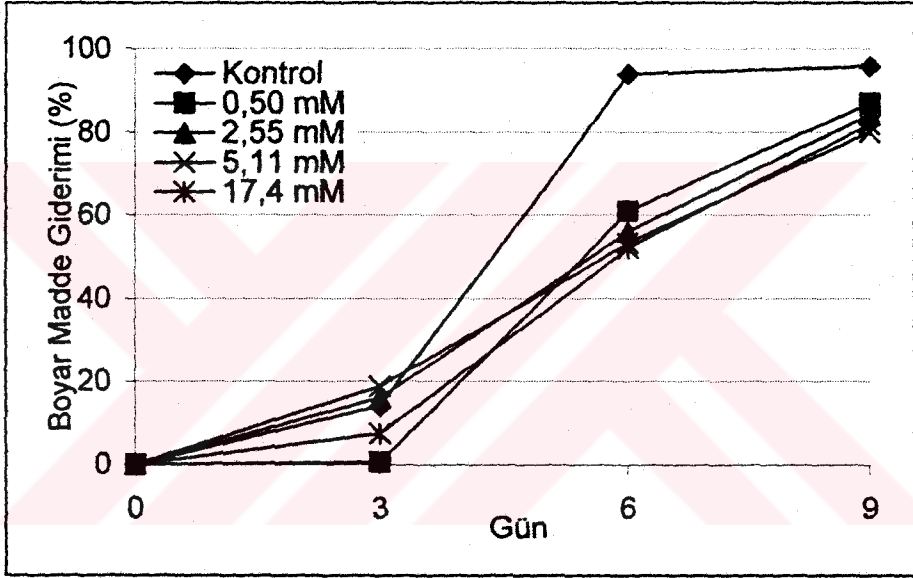
**Kontrol grubu:** Karbon kaynağı olarak glikozun kullanıldığı çalışmada, *Funalia trogii* glikoz (5 g/L) ile hazırlanmış prekültür ortamında 7 gün yetiştirilmiştir. Ardından fungus miselleri bir araya toplanmış, steril distile su ile yıkanmış ve politron homojenizatörde parçalandıktan sonra karbon ve azot kaynağı eklenmemiş pH'sı fosfat tamponu ile 4.78'e ayarlanmış ve boyar madde içeren (yaklaşık 15 mg/L) ortamlara aşlanmıştır (1 mL/30 mL misel süspansiyonu). Karbon kaynağı olarak glikozun kullanıldığı çalışmalarda karbon ve azot kaynağı eklenmemiş bu ortam kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Kontrol grubunda ortama eklenen boyar maddenin inkübasyonun 3. gününde % 14,10'unun giderildiği tespit edilmiştir. İnkübasyonun 6. gününde renk gideriminin hızla arttığı (% 93,85) ve inkübasyon sonunda % 95,73'e ulaştığı saptanmıştır.

**Farklı konsantrasyonlarda  $NH_4H_2PO_4$ 'ın renk giderimi üzerine etkisi:** Karbon kaynağı olarak sabit konsantrasyonda glikozun (1,8 g/L) kullanıldığı çalışmada dört farklı konsantrasyonda  $NH_4H_2PO_4$  (Amonyumdihidrojenfosfat)'ın renk giderimindeki etkinliği çalışılmıştır. İnkübasyonun 3. gününde 0,50; 2,55; 5.11; 17,40 mM konsantrasyonda  $NH_4H_2PO_4$  içeren ortamlarda renk giderimi sırası ile % 0,60; % 16,04; % 18,80; % 7,50 olarak saptanmıştır. İnkübasyonun 6. gününde  $NH_4H_2PO_4$  içeren tüm ortamlarda renk gideriminin % 50'nin üzerinde olduğu tespit edilmiştir. İnkübasyonun sonunda (9.gün) 0,50; 2,55; 5.11; 17,40 mM  $NH_4H_2PO_4$

içeren ortamlarda boyar madde giderimleri birbirine yakın olmakla beraber sırasıyla % 86,39; % 84,13; % 79,94 ve % 81,72 olarak gerçekleşmiştir.

Çalışmanın sonucunda *F. trogii*'nin en yüksek renk giderimini 0,50 mM  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  içeren ortamlarda gerçekleştirdiği (% 86,39) bulunmuştur. Azot kaynağı olarak  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 'ün kullanıldığı çalışmada tüm ortamlarda yaklaşık % 80 renk giderimi sağlanması, artan  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  konsantrasyonunun renk giderimi üzerine etkisinin olmadığını göstermektedir (Şekil 4.14). *F. trogii*'nin karbon ve azot kaynağı eklenmemiş kontrol grubunun renk gideriminde daha etkili olduğu (% 95,73) ve ortama  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  eklenmesinin renk giderimini azalttığı saptanmıştır.

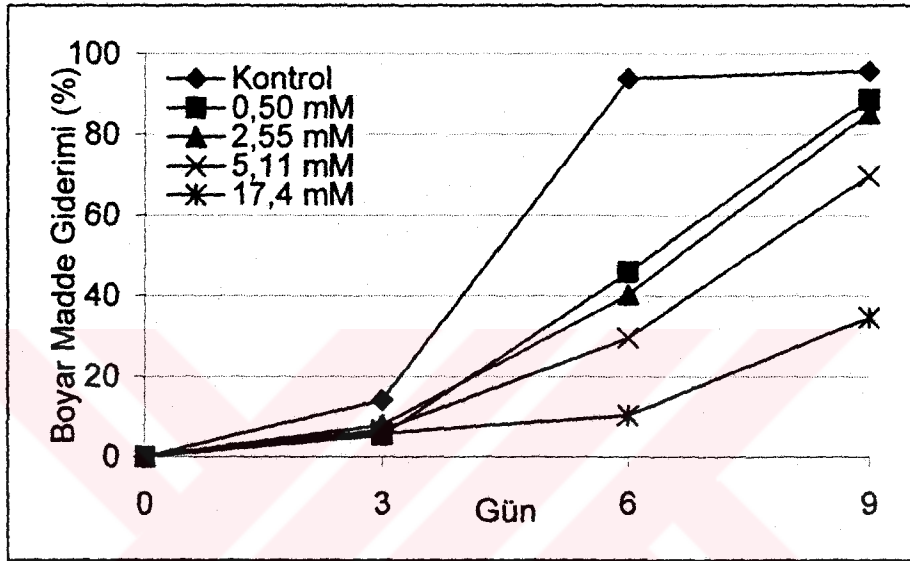


Şekil 4.14. Glikoz içeren ortamlarda *F. trogii*'nin renk giderim verimi (%) üzerine  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 'ın etkisi

**Farklı konsantrasyonlarda  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 'ün renk giderimi üzerine etkisi:** Karbon kaynağı olarak sabit konsantrasyonda glikozun (1,8 g/L) kullanıldığı çalışmada; dört farklı konsantrasyonda  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Amonyum klorür)'ün renk giderimindeki etkinliği çalışılmıştır. İnkübasyonun 3. gününde 0,50; 2,55; 5,11; 17,40 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  içeren ortamlarda renk giderimi sırası ile % 5,32; % 7,93; % 6,58; % 5,91 olarak saptanmıştır. İnkübasyonun 6. gününde 0,50 ve 2,55 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  içeren ortamlarda renk gideriminin hızla arttığı ve yaklaşık % 40'ın üzerinde boyar maddenin



giderildiği belirlenmiştir. İnkübasyonun sonunda 0,50 ve 2,55 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  içeren ortamlarda renk giderimi sırasıyla % 88,59 ve % 85,30 olarak gerçekleşirken 5.11 ve 17,40 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  içeren ortamlarda renk giderimi % 69,76 ve % 34,62'de kalmıştır. Çalışmanın sonucunda en yüksek renk gideriminin 0,50 ve 2,55 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  içeren ortamlarda gerçekleştiği (% 88,59 ve % 85,30) bulunmuştur. Bu sonuç ortama eklenen  $\text{NH}_4\text{Cl}$  konsantrasyonunun azaltılması ile renk gideriminin arttığını göstermektedir (Şekil 4.15).

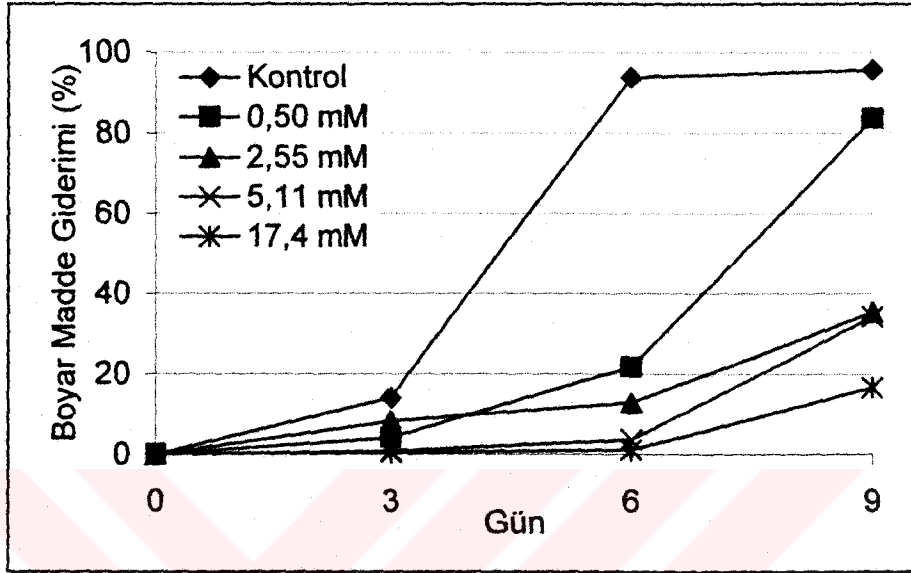


Şekil 4.15. Glikoz içeren ortamlarda *F. troglia*'nin renk giderim verimi (%) üzerine  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 'ün etkisi

$\text{NH}_4\text{Cl}$  içeren ortamların renk giderimi karbon ve azot kaynağı eklenmemiş kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, ortama  $\text{NH}_4\text{Cl}$  eklenmesinin renk giderimini azalttığını göstermektedir.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  içeren ortamların renk giderimi üzerine etkisi  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  ile karşılaştırıldığında; 0,50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  içeren ortamların (% 88,39) 0,50 mM  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  içeren ortamlarla (% 86,39) yaklaşık aynı etkinliğe sahip olduğunu göstermektedir.

**Farklı Konsantrasyonlarda  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ 'nun Renk giderimi Üzerine Etkisi:** Karbon kaynağı olarak sabit konsantrasyonda glikozun (1,8 g/L) kullanıldığı çalışmada dört farklı konsantrasyonda ürenin renk giderimindeki etkinliği çalışılmıştır. İnkübasyonun 3. gününde 0,50; 2,55; 5.11; 17,40 mM konsantrasyonda üre içeren

ortamlarda renk gideriminin sırası ile % 4,08; % 8,30; % 0,80; % 0,40 oranlarında gerçekleştiği saptanmıştır. İnkübasyonun sonunda 0,50 mM üre içeren ortamlarda renk giderimi % 83,59 olarak gerçekleşirken 2,55; 5,11 ve 17,40 mM üre içeren ortamlarda boyar maddenin sırasıyla % 35,42; % 34,28 ve % 16,73'ünün giderildiği saptanmıştır (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Glikoz içeren ortamlarda *F. troglia*'nin renk giderim verimi (%) üzerine ürenin etkisi

Çalışmanın sonucunda en yüksek renk gideriminin 0,50 mM üre içeren ortamlarda gerçekleştiği (% 83,59) bulunmuştur. Bu sonuç; azot kaynağı olarak kullanılan üre konsantrasyonundaki artışın renk gideriminde olumsuz etki yaptığını göstermektedir. Üre içeren ortamların renk giderimi karbon ve azot kaynağı eklenmemiş kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, elde edilen sonuçlar ortama üre eklenmesinin renk giderimini azalttığını göstermektedir.

Farklı azot kaynaklarının farklı konsantrasyonlarının karbon kaynağı olarak glikoz içeren ortamlarında;

(i) kullanılan her bir azot kaynağı kendi içinde değerlendirildiğinde azot kaynağı konsantrasyonunun azalması ile renk gideriminin artması, en uygun konsantrasyonun 0,5 mM azot kaynağı içeren ortamlar olduğunu göstermektedir.

(ii) kullanılan azot kaynakları kendi aralarında değerlendirildiğinde  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 'ın kullanıldığı deneylerde çalışılan tüm konsantrasyonlarda % 80'nin üzerinde verimin sağlanması azot kaynağı olarak  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 'ın  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ve üreden daha etkili olduğu sonucunu vermektedir.

(iii) 0,50 mM azot kaynağı içeren ortamlarda 9. günün sonunda % 83-88 renk giderimi sağlanmasına karşın, karbon ve azot kaynağı eklenmemiş kontrol grubunda 6 günün sonunda renk gideriminin % 95'e ulaşması ortamlara 0,50 mM ve üzerinde  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  ilave edilmesinin renk giderimini azalttığını göstermektedir.

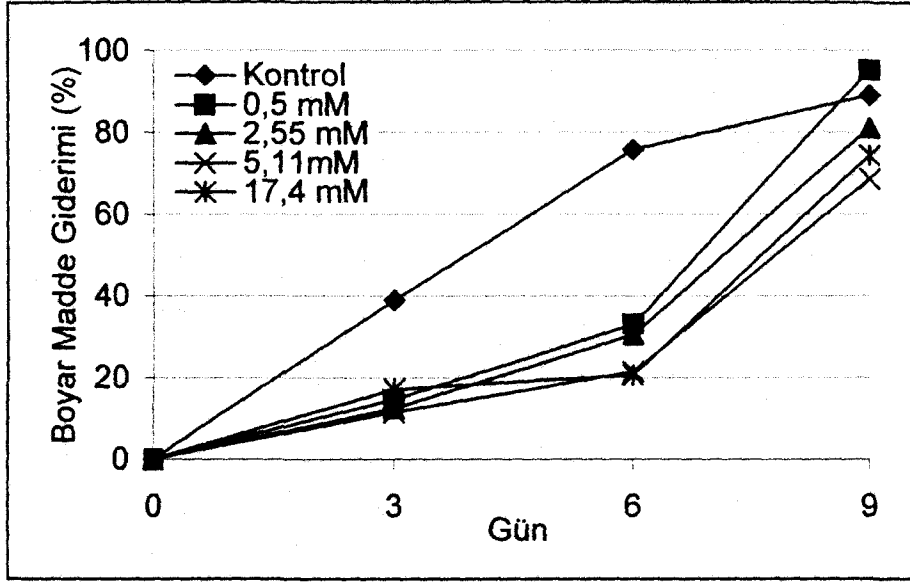
4.2.3.2. Sükroz içeren ortamlarda farklı azot kaynaklarının renk giderimi üzerine etkisi

**Kontrol grubu :** Karbon kaynağı olarak sükrozun kullanıldığı çalışmada, *Funalia trogii* sükroz (5 g/L) ile hazırlanmış prekültür ortamında 7 gün yetiştirilmiştir. Ardından fungus miselleri biraraya toplanmış, steril distile su ile yıkanmış ve politron homojenizatörde parçalandıktan sonra pH sı fosfat tamponu ile 4,78'e ayarlanmış, karbon ve azot kaynağı eklenmemiş boyar madde içeren (yaklaşık 15,0 mg/L) ortamlara aşılanmıştır (1 mL/30 mL misel süspansiyonu). Karbon kaynağı olarak sükrozun kullanıldığı çalışmalarda karbon ve azot kaynağı eklenmemiş bu ortam kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Kontrol grubunda, ortama eklenen boyar maddenin inkübasyonun 3. gününde % 39'unun giderildiği bulunmuştur. Inkübasyonun 6. gününde renk gideriminin arttığı (% 75,80) ve inkübasyon sonunda % 88,98'e ulaştığı saptanmıştır.

**Farklı konsantrasyonlarda  $NH_4H_2PO_4$ 'ın renk giderimi üzerine etkisi :** Karbon kaynağı olarak sükrozun (1,8 g/L) kullanıldığı çalışmada dört farklı konsantrasyonda  $NH_4H_2PO_4$  (Amonyumdihidrojenfosfat)'ın renk giderimindeki etkinliği çalışılmıştır. Inkübasyonun 3. gününde  $NH_4H_2PO_4$ 'ın tüm konsantrasyonlarında renk gideriminin % 10'nun üzerinde gerçekleştiği saptanmıştır. Inkübasyonun 6. gününde 0,50 ve 2,55 mM  $NH_4H_2PO_4$  içeren ortamlarda renk gideriminin sırasıyla % 33,01; % 30,50; 5,11 ve 17,40 mM  $NH_4H_2PO_4$  içeren ortamlarda ise % 21,40; % 20,71 olduğu bulunmuştur. Inkübasyonun sonunda (9.gün) 0,50; 2,55; 5.11; 17,40 mM  $NH_4H_2PO_4$  içeren ortamlarda renk giderimi sırasıyla % 95,08; % 81,02; % 68,50 ve % 74,35 e ulaşmıştır (Şekil 4.17).

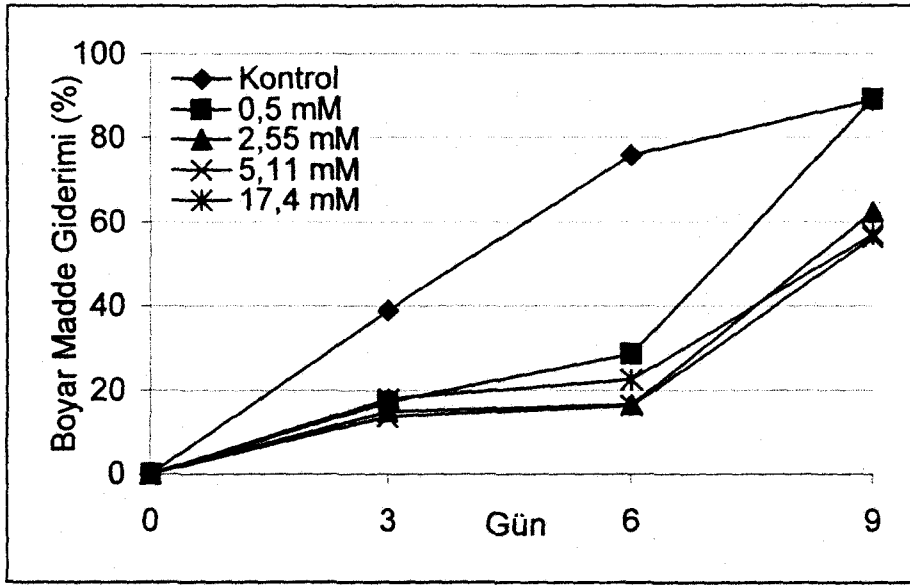
Çalışmanın sonucunda en yüksek renk gideriminin 0,50 mM  $NH_4H_2PO_4$  içeren ortamlarda gerçekleştiği (% 95,08) bulunmuştur. Bu sonuç kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 0,50 mM  $NH_4H_2PO_4$  içeren ortamların daha etkili olduğunu göstermektedir.



**Şekil 4.17.** Sükroz içeren ortamda *F. troglia*'nin renk giderim verimi (%) üzerine  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 'ın etkisi

**Farklı konsantrasyonlarda  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 'ün renk giderimi üzerine etkisi :** Karbon kaynağı olarak sabit konsantrasyonda sükrozun (1,8 g/L) kullanıldığı çalışmada dört farklı konsantrasyonda  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Amonyum klorür)ün renk giderimindeki etkinliği çalışılmıştır. İnkübasyonun 3. gününde 0,50; 2,55; 5,11 ve 17,40 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  içeren ortamlarda renk giderimi sırası ile % 17,22; % 14,98; % 13,74; % 17,96 olarak saptanmıştır. İnkübasyonun sonunda 0,50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  içeren ortamlarda renk giderimi % 89,15 e ulaşırken 2,55; 5,11 ve 17,40 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  içeren ortamlarda renk giderimi % 62,41; % 56,29 ve % 57,03 olarak gerçekleşmiştir.

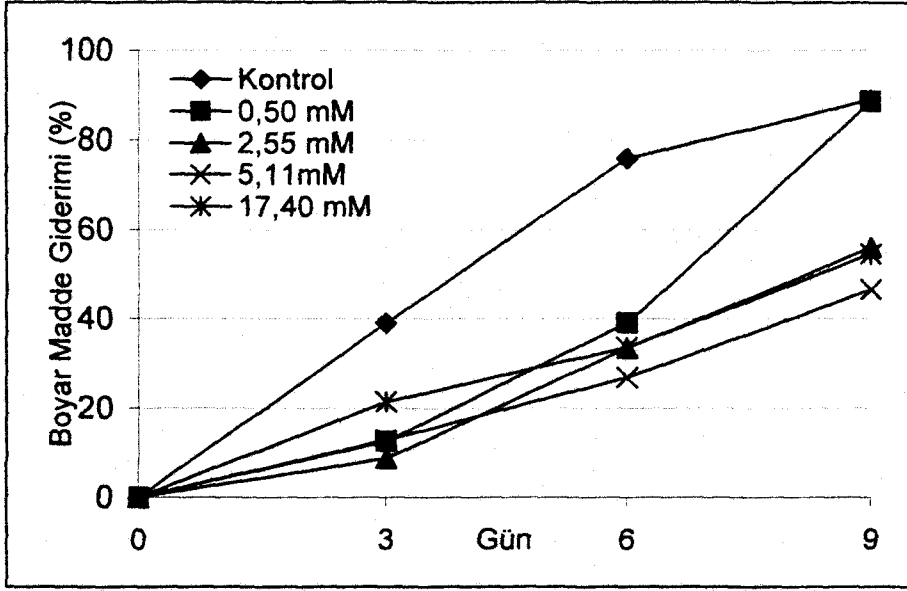
Çalışmanın sonucunda en yüksek renk gideriminin 0,50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  içeren ortamlarda gerçekleştiği (% 89,15) ve bu konsantrasyonun üzerindeki konsantrasyonlarda renk gideriminin azaldığı saptanmıştır. Bu sonuç kontrol grubu ile benzerlik göstermekte, ayrıca karbon kaynağı olarak sükrozun, azot kaynağı olarak  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 'nin kullanıldığı ortamlarda kullanılması gereken  $\text{NH}_4\text{Cl}$  konsantrasyonunun en fazla 0,50 mM olması gerektiğini göstermektedir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Sükroz içeren ortamda *F. troglit*'nin renk giderim verimi (%) üzerine  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 'ün etkisi

**Farklı konsantrasyonlarda  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ 'nun renk giderimi üzerine etkisi :** Karbon kaynağı olarak sükrozun (1,8 g/L) kullanıldığı çalışmada dört farklı üre konsantrasyonunda renk giderimindeki etkinliği çalışılmıştır. İnkübasyonun 3. gününde 0,50; 2,55; 5,11 ve 17,40 mM konsantrasyonda üre içeren ortamlarda renk gideriminin sırası ile % 12,57; % 8,75; % 12,91 ve % 21,48 olarak gerçekleştiği saptanmıştır. İnkübasyonun 6. gününde ise giderim % 26,93- 39,08 seviyelerinde gerçekleşmiştir. İnkübasyonun sonunda 2,55; 5,11 ve 17,40 mM üre içeren ortamlarda boyar maddenin sırasıyla % 55,98; % 46,56 ve % 54,46 ve en yüksek renk gideriminin 0,50 mM üre içeren ortamlarda % 88,61 olarak gerçekleştiği saptanmıştır. (Şekil 4.19).

Çalışma sonucunda kontrol grubunda ve 0,50 mM üre içeren ortamlarda benzer sonuçlar bulunmuştur. Üre konsantrasyonunun 0,50 mM'in üzerinde olduğu ortamlarda renk gideriminin azaldığı saptanmıştır. Bu sonuç renk gideriminde karbon kaynağı olarak sükrozun, azot kaynağı olarak ürenin kullanıldığı ortamlara en fazla 0,50 mM konsantrasyonu sağlayacak şekilde ürenin eklenmesi gerektiğini göstermektedir.



**Şekil 4.19.** Sükroz içeren ortamda *F. troglia*'nin renk giderim verimi (%) üzerine ürenin etkisi

Farklı azot kaynaklarının farklı konsantrasyonlarının kullanıldığı karbon kaynağı olarak sükroz içeren ortamlarında;

(i) kullanılan azot kaynakları kendi içinde değerlendirildiğinde azot kaynağı konsantrasyonunun azalması ile renk gideriminin artması, en uygun konsantrasyonun 0,5 mM azot kaynağı içeren ortamlar olduğunu göstermektedir.

(ii) kullanılan azot kaynakları kendi aralarında değerlendirildiğinde  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  in kullanıldığı deneylerde % 95 renk giderimi sağlanması en uygun azot kaynağının  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  olduğunu göstermektedir.

(iii) kontrol grubunda saptanan boyar madde giderim veriminin 0,50 mM  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  içeren ortamdaki daha düşük bulunması sükroz içeren ortamlarda kullanılması gereken konsantrasyonun 0,50 mM olduğunu göstermektedir.

Adosında ve ark. [122], *Phanerochaete chrysosporium* ile yaptıkları tekstil azo boyar maddelerinin yıkımı çalışmasında karbon kaynağı olarak sükroz kullanmışlar (1, 5, 10 g/L) ve sükrozun 5 g/L konsantrasyonunun en uygun konsantrasyon olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca çalışmada fungusun yetiştirildiği prekültür

ortamının önemli olduğu ve etkisi araştırılan kimyasalların prekültüre eklenmesinin adaptasyon süresini azalttığı ve biyolojik yıkımı arttırdığı rapor edilmiştir.

Bu çalışmada prekültür ortamına sükröz eklenerek fungusun sükrözlü ortama adaptasyonu sağlanmıştır. Tekstil fabrikalarında farklı kimyasal yapıya sahip boyar maddeler olduğundan prekültür ortamına reaktif black 5 eklenmemiş, bu şekilde fungusun boyar madde ile ilk defa karşılaştığında renk giderimindeki verimi ortaya konmaya çalışılmıştır.



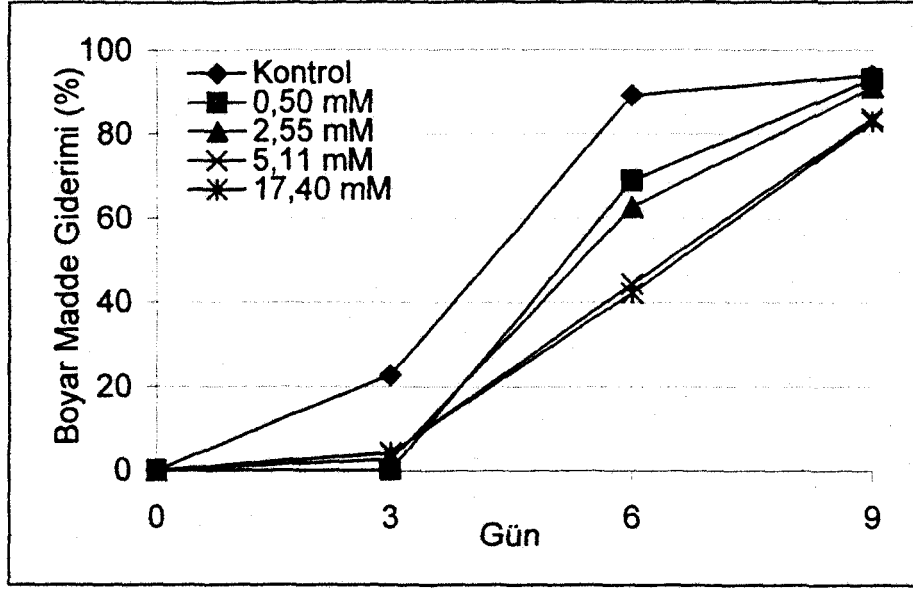


4.2.3.3. Nişasta içeren ortamlarda farklı azot kaynaklarının renk giderimi üzerine etkisi

**Kontrol grubu :** Karbon kaynağı olarak nişastanın kullanıldığı çalışmada, *Funalia trogii* nişasta (5,0 g/L) ile hazırlanmış prekültür ortamında 7 gün yetiştirilmiştir. Ardından fungus miselleri biraraya toplanmış, steril distile su ile yıkanmış ve politron homojenizatörde parçalandıktan sonra karbon ve azot kaynağı içermeyen pH sı fosfat tamponu ile 4,78 e ayarlanmış boyar madde içeren (yaklaşık 15,0 mg/L) ortamlara aşılanmıştır (1 mL/30 mL misel süspansiyonu). Karbon kaynağı olarak nişastanın kullanıldığı çalışmalarda karbon ve azot kaynağı eklenmemiş bu ortam kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Kontrol grubunda günlere bağlı olarak yapılan boyar madde analizinde inkübasyonun 3., 6., 9. günlerinde boyar maddenin sırası ile % 22,67; % 85,13; % 94,05 ünün giderildiği saptanmıştır.

**Farklı konsantrasyonlarda  $NH_4H_2PO_4$ 'ın renk giderimi üzerine etkisi :** Karbon kaynağı olarak sabit konsantrasyonda nişastanın (1,8 g/L) kullanıldığı çalışmada dört farklı konsantrasyonda  $NH_4H_2PO_4$  (Amonyumdihidrojenfosfat) ın renk giderimindeki etkinliği çalışılmıştır. Inkübasyonun 3. gününde 0,50; 2,55; 5,11; 17,40 mM konsantrasyonlarda  $NH_4H_2PO_4$  içeren ortamlarda renk giderimi sırası ile % 0,00; % 2,63; % 4,12; % 4,29 olarak saptanmıştır. Inkübasyonun 6. gününde en yüksek renk gideriminin 0,50 ve 2,55 mM  $NH_4H_2PO_4$  içeren ortamlarda % 60'ın üzerinde gerçekleştiği bulunmuştur. Inkübasyonun sonunda (9.gün) renk giderimi 0,50 ve 2,55 mM  $NH_4H_2PO_4$  içeren ortamlarda sırasıyla % 93,12 ve % 91,15; 5,11 ve 17,40 mM  $NH_4H_2PO_4$  içeren ortamlarda ise sırasıyla % 83,85 ve % 83,16 ya ulaşmıştır (Şekil 4.20).

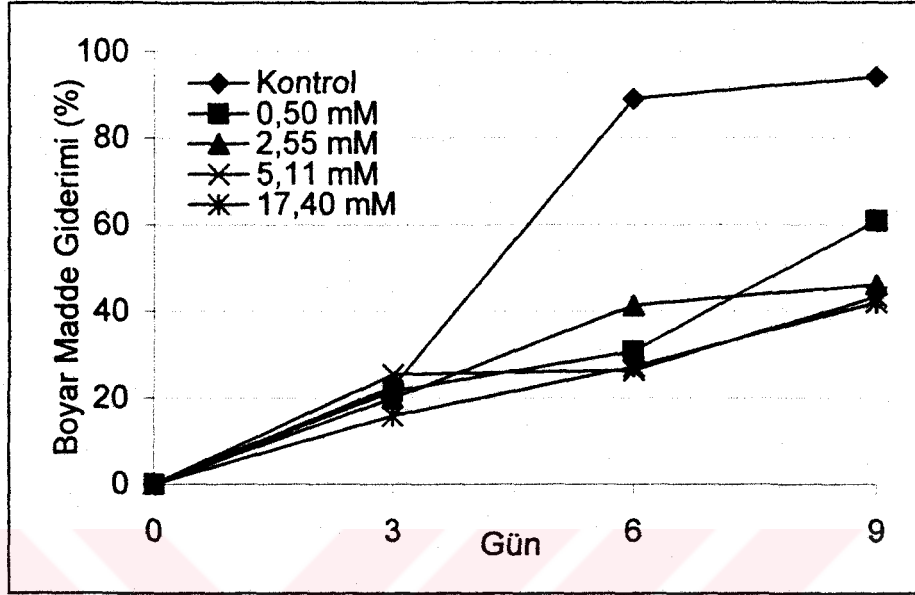


**Şekil 4.20.** Nişasta içeren ortamlarda *F. troglia*'nin renk giderim verimi (%) üzerine  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 'ın etkisi

Çalışmanın sonucunda en yüksek renk gideriminin 0,50 ve 2,55 mM  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  içeren ortamlarda gerçekleştiği (% 93,12 ve % 91,15) bulunmuştur. Karbon ve azot kaynağı eklenmemiş kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, renk gideriminin 0,50 ve 2,55 mM  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  içeren ortamlarla benzer olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç; karbon kaynağı olarak nişastanın, azot kaynağı olarak  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  kullanıldığı ortamlarda maksimum renk giderimi için ortamda bulunması gereken  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  konsantrasyonunun en fazla 2,55 mM olması gerektiğini göstermektedir.

**Farklı konsantrasyonlarda  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 'ün renk giderimi üzerine etkisi :** Karbon kaynağı olarak sabit konsantrasyonda sükrözün (1,8 g/L) kullanıldığı çalışmada dört farklı konsantrasyonda  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Amonyum klorür)ün renk giderimindeki etkinliği çalışılmıştır. İnkübasyonun 3. gününde 0,50; 2,55; 5,11; 17,40 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  içeren ortamlarda renk giderimi sırası ile % 21,58; % 20,00; % 25,38; % 15,76 olarak saptanmıştır. İnkübasyonun 6. gününde en yüksek renk gideriminin 2,55 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  içeren ortamlarda % 41,39 olarak gerçekleştiği saptanmıştır.

İnkübasyonun sonunda 2,55; 5,11 ve 17,40 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  içeren ortamlarda renk gideriminin sırası ile % 46,12; % 43,25 ve % 41,98 olduğu en yüksek giderim 0,50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  içeren ortamlarda % 60,79 olarak gerçekleştiği bulunmuştur (Şekil 4.21).

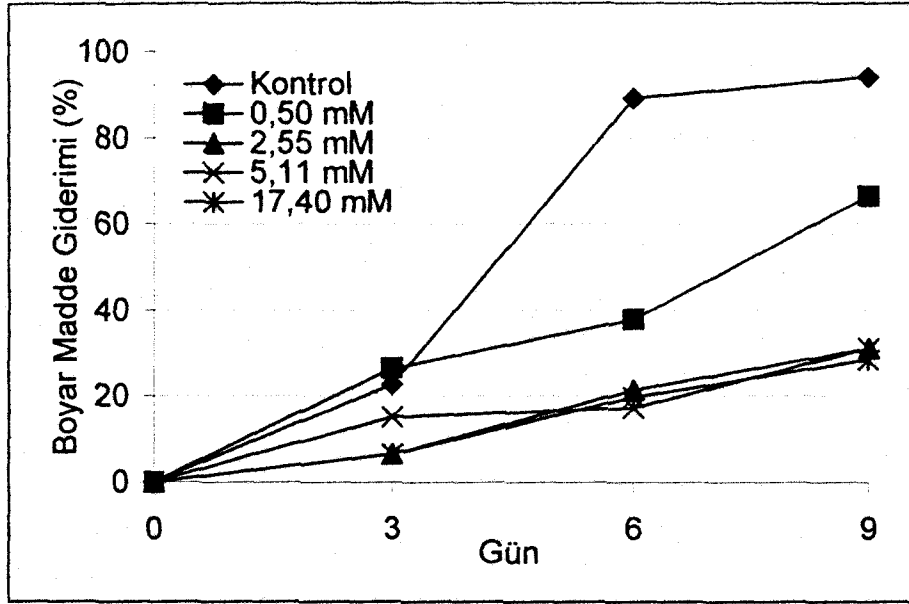


Şekil 4.21. Nişasta içeren ortamlarda *F. troglia*'nin renk giderim verimi (%) üzerine  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 'ün etkisi

Çalışmanın sonucunda en yüksek renk giderimi 0,50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  içeren ortamlarda gerçekleştiği ve 0,50 mM'ın üzerindeki  $\text{NH}_4\text{Cl}$  konsantrasyonlarında renk gideriminin azaldığı saptanmıştır. Bu bulgu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (%94,05) renk gideriminin kontrol grubunda daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu sonuç karbon kaynağı olarak nişastanın kullanıldığı ortamlarda  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 'ün renk giderimi için uygun azot kaynağı olmadığını göstermektedir.

**Farklı konsantrasyonlarda  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ 'nun renk giderimi üzerine etkisi :** Karbon kaynağı olarak sabit konsantrasyonda nişastanın (1,8 g/L) kullanıldığı çalışmada dört farklı konsantrasyonda ürenin renk giderimindeki etkinliği çalışılmıştır. İnkübasyonun 3. gününde 0,50; 2,55; 5,11; 17,40 mM konsantrasyonda üre içeren ortamlarda renk gideriminin sırası ile % 26,49; % 6,51; % 15,11; % 6,6 olarak gerçekleştiği saptanmıştır. İnkübasyonun sonunda 0,50 mM üre içeren ortamlarda

renk giderimi % 66,46 olarak gerçekleşirken 2,55; 5,11 ve 17,40 mM üre içeren ortamlarda renk giderimi % 31,10; % 31,10 ve % 28,32 ye ulaşmıştır (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. Nişasta içeren ortamlarda *F. troglia*'nin renk giderim verimi (%) üzerine ürenin etkisi

Çalışma sonucunda kontrol grubunda % 94,05 oranında boyar madde giderilirken, üre içeren ortamlar içinde en yüksek renk giderimi 0,50 mM üre içeren ortamlarda % 66,46 olarak bulunmuş, bu konsantrasyonunun üzerindeki konsantrasyonlarda renk gideriminin azaldığı saptanmıştır. Bu sonuç renk gideriminde karbon kaynağı olarak nişastanın kullanıldığı ortamlarda azot kaynağı olarak ürenin kullanılmasının uygun olmadığını göstermektedir.

Farklı azot kaynaklarının farklı konsantrasyonlarının kullanıldığı karbon kaynağı olarak nişasta içeren ortamlarında;

(i) kullanılan azot kaynakları kendi içinde değerlendirildiğinde azot kaynağı konsantrasyonunun azalması ile renk gideriminin artması, en uygun konsantrasyonun 0,5 mM azot kaynağı içeren ortamlar olduğunu göstermektedir.

(ii) kullanılan azot kaynakları kendi aralarında değerlendirildiğinde en yüksek giderimin  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  in kullanıldığı deneylerde elde edilmiş olması, bu ortamın en uygun azot kaynağının  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  olduğunu göstermektedir.

(iii) kontrol grubunda 6. günde saptanan boyar madde giderim veriminin diğer ortamlardan yüksek bulunması nişasta içeren ortamlarda azot eklenmesinin verimi düşüreceği fikrini vermektedir.

Karbon kaynağı (glikoz, sükroz, nişasta), azot kaynağı ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ) ve azot kaynağı konsantrasyonunun (0,50; 2,51; 5,11; 17,04 mM) Reaktif Black 5'in (15,0 mg/L) renk giderimi üzerine etkisinin incelendiği bu bölümde, azot kaynağı eklenen tüm ortamlarda, 0,50 mM azot kaynağı konsantrasyonunun etkili olduğu ve bu konsantrasyonun üzerinde renk gideriminin azaldığı bulunmuştur. Buna karşılık azot ve karbon kaynağı eklenmemiş kontrol gruplarında elde edilen renk gideriminin 0,50 mM azot kaynağı eklenen ortamlardan yüksek bulunması Reaktif black 5'in renk gideriminde ortama karbon ve azot kaynağı eklenmesinin renk giderimini inhibe ettiğini göstermektedir.

Kontrol grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde glikoz ve nişasta içeren prekültür ortamında yetiştirilen kültürlerin (% 95 ve % 94), sükrozda yetiştirilen kültürlerden (% 88) daha başarılı olduğu saptanmıştır. Glikozda ve nişastada yetiştirilen kültürlerin renk giderimleri birbirine yakın bulunmasına karşılık 6 günlük inkübasyonları sonrasında glikozda yetiştirilen kültürlerin % 93,85 nişastada yetiştirilen kültürlerin % 85,13 renk giderimi sağlaması en uygun karbon kaynağının glikoz olduğunu göstermektedir. Kontrol grubunda saptanan 100-200 mg/L şeker konsantrasyonunun boyar maddenin renk giderimi için yeterli düzeyde olduğu saptanmıştır. Benzer sonuç Swamy ve Ramsay [165] tarafından da rapor edilmiş, glikoz konsantrasyonunun 100-200 mg/L seviyesinde tutulmasının renk giderimini artırıcı etkisi olduğunu rapor etmişlerdir. Chen ve ark. [162] çeşitli tekstil boyar maddelerinin *Aeromonas hydrophila* ile renk giderimi çalışmasında glikozun konsantrasyonunun artması ile renk giderim veriminin düştüğü bildirilmişlerdir.

Novotny ve ark. [168] *Irpex lacteus* ve *Pleurotus ostreatus* ile yaptıkları çalışmada beş farklı boyar madde türünden mono ve diazo grubu taşıyan boyar maddelerin düşük azot kaynağı içeren ortamlarda (1,2 mM) renk giderimlerinin daha düşük olduğu bildirilmiştir. Benzer bulgu *T. versicolor* ve *P. chrysosporium* ile yapılan renk giderimi çalışmasında da rapor edilmiştir [8]. Ancak diğer çalışmalarda yüksek konsantrasyonda azot kaynağının renk giderim verimini azalttığı bildirilmiştir. *P. chrysosporium* ile farklı konsantrasyonlarda karbon ve azot kaynağının Congo Red'in renk giderimi üzerine yapılan çalışmada 50-500 ppm boyar madde konsantrasyonunun glikoz ve amonyum tartarat eklenmemiş ortamlarda eklenenlere göre daha etkili şekilde giderildiği ve yüksek azot konsantrasyonunun (12 mM) renk giderimini inhibe ettiği bildirilmiştir [73]. Bazı boyar maddelerin renk giderimleri için ise azot konsantrasyonunun belirli bir düzeyde olması gerektiği rapor edilmiştir [76]. Benzer bulgular *Trametes versicolor* ile yapılan çalışmalarda da rapor edilmiştir [65, 148, 165]. *Lentinus edodes* ile yapılan bir başka çalışmada ise Poly R-478, Remazol Brilliant Blue R, ve Orange II'nin renk gideriminde azot konsantrasyonunun 1-5 mM arasında olduğunu bildirmiştir [169]. Diana ve ark. (2002) tarafından lignin benzeri yapıların *Ceriporiopsis subvermispora* ile 10 mM azot kaynağı içeren ortamlarda % 10-22, 1 mM azot kaynağı içeren ortamlarda % 42-80 oranında yıkıldığı bildirilmiştir [170]. Düşük konsantrasyonda azot kaynağı içeren ortamlarda fungusun gelişimi için gerekli olan azotu boyar maddeden elde etmesi renk giderim verimini arttırmaktadır. Yüksek konsantrasyonda azot içeren ortamlarda ise azotun daha kolay elde edilebilir olması renk giderim verimini azaltmaktadır [57, 171].

Çalışmanın bu bölümünde Reaktif Black 5'in renk gideriminde ortama karbon ve azot kaynağı eklenmesinin giderim verimini azalttığı, karbon ve azot kaynağı eklenmemiş ortamları daha başarılı olduğu ve glikozda yetiştirilmiş kültürlerin (prekültürler) diğer karbon kaynaklarında yetiştirilmiş kültürlerden daha etkili oldukları bulunmuştur. Chen ve ark. [162] *A. hydrophila* ile Reactive Black 5'in renk gideriminde en uygun azot kaynağının maya özütü olduğu rapor edilmiştir. Ancak araştırmacılar endüstriyel ölçekte bir çalışmanın yapılabilmesi için daha ucuz azot kaynaklarının kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada karbon ve

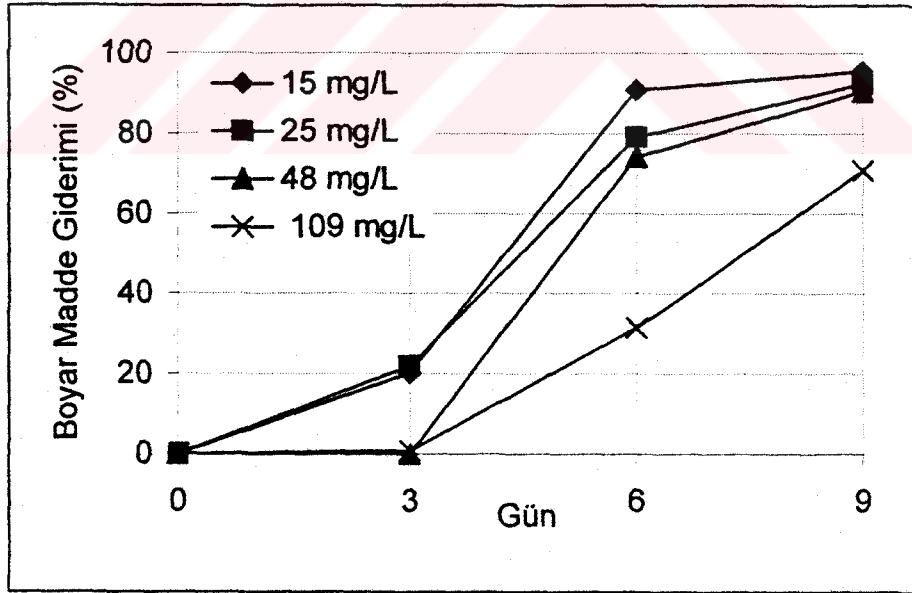
azot kaynağı eklemesi yapılmaksızın renk gideriminin sağlanması, geniş ölçekte yapılacak çalışmalarda maliyetin azaltılması açısından önemli bir bulgu olarak görünmektedir. Bu nedenle çalışmanın ileriki aşamalarında deneyler karbon ve azot kaynağı eklenmeden yapılmıştır.



#### 4.2.4. Reaktif Black 5'in *F. trogl*i Gelişimi Üzerine Etkisi ve Statik Koşullarda Maksimum Renk Gideriminin Bulunması

Statik koşullarda gerçekleştirilen çalışmada (i) maksimum renk gideriminin ve (ii) boyar maddenin fungus gelişimi üzerine etkisinin bulunabilmesi için dört farklı konsantrasyonda (15; 25; 48; 109 mg/L) boyar madde ile çalışılmıştır. Bu çalışmada kontrol grubu olarak boyar madde içermeyen ortam kullanılmıştır. Çalışmada ortam pH'sı 4,78'e ortam sıcaklığı 30 °C'ye ayarlanmış ve yaklaşık  $1,055 \pm 0,023$  g/L kuru ağırlıkta fungus ekilmiştir. Ortamda 9 günlük inkübasyon süresi boyunca üç gün aralıkla renk giderimi (%) ile KMA (g/L) ölçülmüştür.

İnkübasyonun 3. gününde, 15 ve 25 mg/L boyar madde içeren ortamlarda renk giderimi % 16,80 ve % 25,85 olarak gerçekleşirken, daha yüksek konsantrasyonlardaki ortamlarda giderim % 1'e ulaşmamıştır. İnkübasyonun sonunda en yüksek renk giderimi, 15, 25, 48 mg/L boyar madde içeren ortamda % 90'ın üzerinde gerçekleşirken, 109 mg/L boyar madde içeren ortamlarda % 70 olarak bulunmuştur (Şekil 4.23).

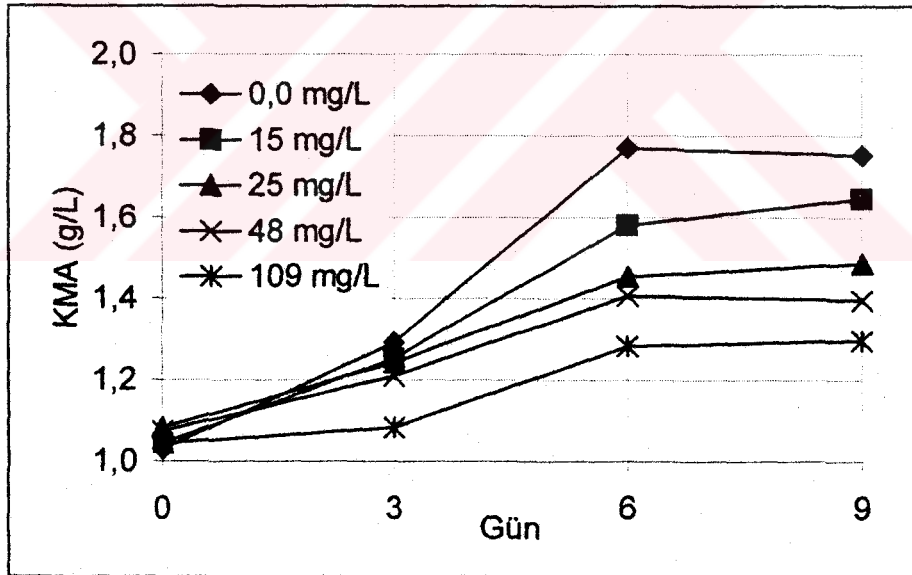


Şekil 4.23. Farklı konsantrasyonlarda boyar madde içeren ortamda renk giderimi



*Funalia trogii*'nin statik koşullarda yaklaşık 77,0 mg/L boyar maddenin rengini giderdiği bulunmuştur. Bu sonuç pH'nın 4,78 ve sıcaklığın 30 °C olduğu ortamlarda *F. trogii*'nin statik kültürleri tarafından en fazla 77,0 mg/L konsantrasyonda boyar maddenin renginin giderilebileceğini göstermektedir.

Farklı başlangıç boyar madde konsantrasyonlarında günlere bağlı olarak *Funalia trogii*'nin KMA değişimi incelenmiş ve Şekil 4.24'de gösterilmiştir. İnkübasyon boyunca 3 gün aralıklarla yapılan kuru misel ağırlığı (KMA) tayininde boyar madde konsantrasyonunun 109 mg/L olduğu ortamda adaptasyonun 3 günde, diğer konsantrasyonlarda 3 günden önce tamamladığı saptanmıştır. İnkübasyonun 6. gününden sonra tüm ortamlarda fungusun kuru ağırlığında artışın olmaması fungusun durağan faza girdiğini göstermektedir (Şekil 4.24). Başlangıç boyar madde konsantrasyonunun artması ile fungus kuru misel ağırlığının azalması boyar maddenin toksik etkili olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.24. Farklı konsantrasyonlarda boyar madde içeren ortamda KMA değişimi (g/L)

Boyar maddelerin funguslar üzerindeki toksik etkisi çeşitli araştırmacılar tarafından da rapor edilmiştir. Chagas ve ark. [178] tarafından Tartarazin'in 10 ppm konsantrasyonunun üzerindeki konsantrasyonlarda fungus üremesinin durduğu

bildirilmiştir. Benzer sonuç Dönmez ve ark. [101]. tarafından rapor edilmiş, Remazol blue, Reaktif Black ve Reaktif red'in artan konsantrasyonlarının *Candida tropicalis*'in gelişmesini inhibe ettiği bildirilmiştir. Trinitrotoluenin (TNT) *Gloeophyllum* türü fungus tarafından yıkımında ise 30 ppm TNT içeren ortamlarda kontrol grubuna göre daha yüksek biyokütle elde edilmiş, ancak 30 ppm'in üzerindeki konsantrasyonlarda KMA'nın azaldığı rapor edilmiştir [179]. Ramsay ve Nguyen [155] tarafından Amaranth ve Tropoeolin O toksik olmadığı, Reactive Blue 15, Congo Red ve Reactive Black 5'in kısmen toksik olduğu rapor edilmiştir. Aynı boyar maddelerin *Trametes versicolor* tarafından renkleri giderildikten sonra Congo Red'in toksisitesinin arttığı ancak diğer boyar maddelerin toksisitesinde değişiklik olmadığı bildirilmiştir. Gottlieb ve ark. [180] *Vibrio fischeri* ile yaptıkları toksisite çalışmasında Reactive Black 5'in anaerobik koşullarda parçalanması sonucunda toksisitenin arttığı, aerobik koşullarda ise toksisitenin azaldığı rapor edilmiştir. Aynı çalışmada boyar maddenin ve yıkım ürünlerinin genotoksik etkisinin olmadığı bildirilmiştir.

Boyar maddelerin özellikle azo boyar maddelerin funguslar dışında algler [172], bakteriler, balıklar ve insanlar [173, 174, 175, 176] üzerindeki olumsuz etkisi de bilinmektedir. Reaktif X-3B ile yapılan toksisite çalışmasında 4500 mg/L konsantrasyonun altında boyar maddenin tohum çimlenmesini % 10 oranında inhibe ettiği, bu konsantrasyonun üzerinde inhibisyonun doğrusal olarak arttığı rapor edilmiştir [177].

### 4.3. ÇALKALAMALI KÜLTÜRLERLE RENK GİDERİM ÇALIŞMALARI

*Funalia trogii*'nin statik kültürleri ile yapılan Reaktif Black 5'in renk giderimi çalışmasında en uygun pH'nin 4,78 ve sıcaklığın 30 °C; karbon ve azot kaynağının glikoz ve NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> olduğu bulunmuştur. Çalkalamalı kültürlerin renk giderimi üzerindeki etkinliğinin bulunabilmesi için, fungus 100 mL ve yaklaşık 15 mg/L boyar madde içeren ortama ekilmiş (3,3 mL/100 mL misel süspansiyonu) ve 30 °C'de ve çalkalamalı şartlarda (150 rpm) inkübasyona bırakılmıştır. Çalkalama hızı *Funalia trogii*'nin serbest miselleri ile yapılan çalışmalarda optimum şartlar olarak bildirilen 150 rpm'e ayarlanmıştır [80, 141].

Jarosz-Wilkolazka ve ark. [181] tarafından çalkalamalı şartlarda *Bjerkandera fumosa*, *Kuehneromyces mutabilis*, ve *Stropharia rugosa-annulata*'nın serbest hücreleriyle yaptıkları çalışmada azo ve antrakinon boyar maddelerinde yaklaşık % 100 renk giderimi sağlandığı bildirilmiştir. Benzer sonuç Swamy ve Ramsay [148] tarafından da rapor edilmiş, *Bjerkandera* sp. BOS55, *P. chryso sporium*, *T. versicolor*'un çalkalamalı kültürlerinin ortam rengini tamamen giderdikleri bildirilmiştir. Literatürlerde çalkalamalı şartların renk gideriminde daha etkili olduğu rapor edilmesine karşılık *F. trogii*'nin serbest miselleriyle çalkalamalı koşullarda yapılan çalışmada inkübasyon süresi sonunda (10 gün) boyar maddenin ancak % 10-12'sinin giderildiği ve fungal gelişimin oldukça yavaş olduğu saptanmıştır. Statik koşullarda aynı konsantrasyonda boyar madde içeren (15,0 mg/L) ortamlarda fungal gelişimin boyar madde içermeyen kontrol grubundan daha düşük bulunması (Bölüm 4.2.4) bu bulguyu destekler görünmektedir. Bu nedenle çalışmanın sonraki aşamalarında tutuklanmış fungusun çalkalamalı koşullarda misel yaşının renk giderimi üzerine etkisinin ve en yüksek renk giderim kapasitesinin bulunmasına çalışılmıştır.

#### 4.3.1. *Luffa cylindrica*'nın tutuklama materyali olarak kullanılması

Mikroorganizmalarla yapılan tutuklama işlemlerinde bugüne kadar agaroz, kalsiyum aljinat, poliüretan köpük, plastik kafesler ve paslanmaz çelik gibi birçok

materyal kullanılmıştır. Tutuklama özellikle sürekli sistemlerde sistemin daha etkin çalışmasını sağlamakta ve sistemden çıkış alınırken mikroorganizmaların yıkanmasını ve kaybını engellemektedir.

Hücrelerin tutuklanmasındaki amaç hücre yoğunluğunun artırılması, özellikle fungus gibi hifli mikroorganizmalarda veya bitkilerde sekonder metabolitlerin düzenli bir şekilde sentezine olanak verilmesi, sistemdeki kimyasalların toksik etkilerinin azalmasıdır [182]. Tutuklanmış hücrelerin kullanılacağı işlemlerde yer aldıkları ortamların stabilitesi de kolaylıkla sağlanabilmekte ve serbest hücrelerde elde edilen verimlerden daha yüksek verimler elde edilebilmektedir. Tutuklama amacı ile kullanılacak materyalin (i)- mikroorganizma ile substrat ve ürünle reaksiyona girmemesi, (ii)- toksik olmaması, (iii)- ucuz ve kolay bulunur olması, (iv)- mekanik zorlamalarda dayanıklı olması, (v)- kullanımının kolay olması, (vi)- uzun süreli çalışmalarda stabilitesini korumalı, (vii)- kullanıldıktan sonra doğaya atıldığında biyolojik olarak parçalanabilmelidir. Bunlara ek olarak büyük ölçekte kullanılır olmalıdır. Tutuklama amacı ile kullanılan materyaller bazı dezavantajlara sahiptir. Örneğin agaroz ve kalsiyum aljinatın kullanıldığı çalışmalarda kütle transferinde güçlükler yaşanmakta, işlemler sırasında jel parçalanmakta bu nedenle işletim maliyeti artmaktadır. Poliüretan köpük [183, 184], naylon [185] ve paslanmaz çelik gibi materyaller biyolojik olarak parçalanamayan materyallerdir ve işlem sonrasında atıldıkları çevrede problemlere neden olmaktadır.

Birçok tropikal ve subtropikal iklim bölgelerinde oldukça bol miktarda üretilen ve genelde banyo ve bulaşıқта kullanılan *Luffa cylindrica*'nın kurutulmuş meyvesi hücre tutuklamada kullanılabilir [134, 186]. Bunun yanında bitkisel kökenli materyal olan palmye gövde kını [187] bu amaçla kullanılabilir. Özellikle *Luffa cylindrica*'nın yüksek por yapısı, yüksek spesifik por hacmi, stabil fiziksel özellikleri, biyolojik olarak yıkılabilir oluşu kullanışlı bir materyal olduğunu göstermektedir. Poliüretan köpük ile *Luffa cylindrica*'nın kurutulmuş meyvesi ile yapılan bir çalışmada lifin tutuklama kapasitesinin poliüretan köpüğe benzer olduğu bu nedenle oldukça iyi bir tutuklama materyali olabileceği bildirilmiştir [188, 189].

Benzer tutuklama materyalinin kullanıldığı bir çalışmada *Aspergillus niger*'den polimetilgalakturonaz enzim üretiminin serbest hücrelere oranla 10 kat fazla sentez edildiği saptanmıştır [190].

Ayrıca bu materyal 2,9:1,4 oranında (%) lignin-sellüloz içeriğe sahiptir [191]. Yapısında bulunan lignin dayanıklılığı sağlamakta yapıyı mikrobiyal atağa karşı korumaktadır. Özellikle funguslarla yapılan ve karbon beslemesinin sınırlı tutulduğu çalışmalarda fungusun gelişimini sağlamaktadır. Bu şekilde ortama karbon kaynağı eklemesi yapılmayacak ve bundan dolayı oluşacak maliyet azalmış olacaktır.

Bu çalışmada *Luffa cylindrica*'nın kurutulmuş meyvesinin kullanılması ile hem *Funalia trogii*'nin tutuklanması hem de fungusun gelişebilmesi için karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılması sağlanmıştır. Çalışma boyunca lif içeren ortamlara karbon ve azot eklemesi yapılmamıştır. Bu çalışmada daha önce anlatılan avantajlarının yanı sıra doğada doğal olarak yetişebilen, ürün eldesi ve kullanımı kolay olan *Luffa*'nın kullanılması ve bunun yanında renk giderimi çalışmasının yapıldığı ortamın maliyeti karbon ve azot eklemesi yapılmadığından azaltılmış olmaktadır.

*F. trogii*'nin çalkalamalı şartlarda misel yaşının renk giderimindeki etkisinin bulunabilmesi amacıyla lifin bulunduğu ortama fungusun aşılmasını takip eden 0. ( $T_0$ ), 3. ( $T_3$ ) ve 6. ( $T_6$ ) günlerde boyar madde (yaklaşık 15 mg/L) eklenmiştir. *Funalia trogii*'nin prekültürde yetiştirilmiş 7 günlük miselleri *Luffa cylindrica* içeren ( $1,000 \pm 0,031$  g/L lif kuru ağırlığı) ortama aşılınmış (yaklaşık 0,738 g/L misel kuru ağırlığı) ve çalkalamalı şartlarda inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat aralıklarla boyar madde, KOİ, şeker, pH, KMA, protein ile lakkaz ve peroksidaz enzim aktiviteleri değişimi ölçülmüştür. Çalışmada kontrol grubu olarak boyar madde içermeyen fungus ile aşılınmış ortam kullanılmıştır.

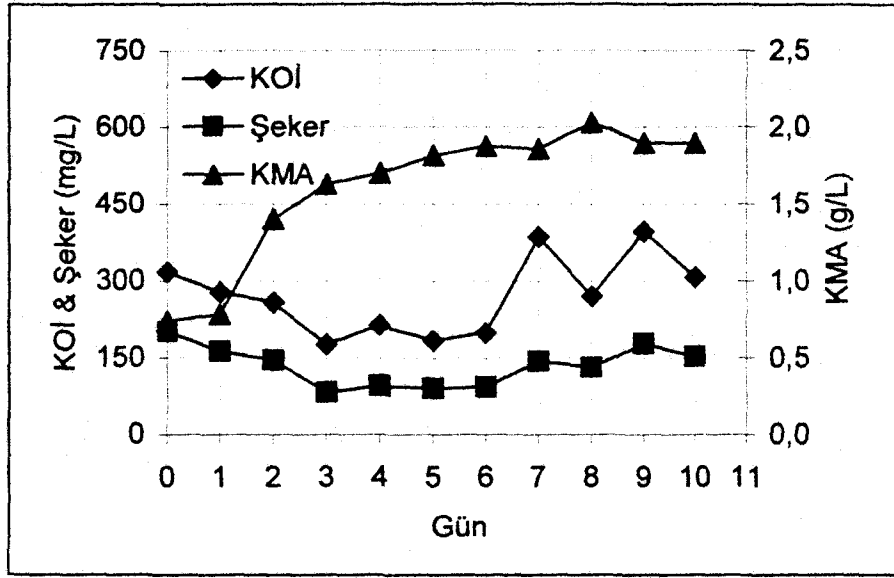
#### 4.3.2. Kontrol Grubu

Tutuklama materyali olarak lif içeren çalkalamalı koşullarda *F. trogii*'nin gelişiminin izlenebilmesi ve boyar madde içeren ortamlardaki gelişimiyle karşılaştırılabilmesi için kontrol olarak boyar madde içermeyen ortam kullanılmıştır.

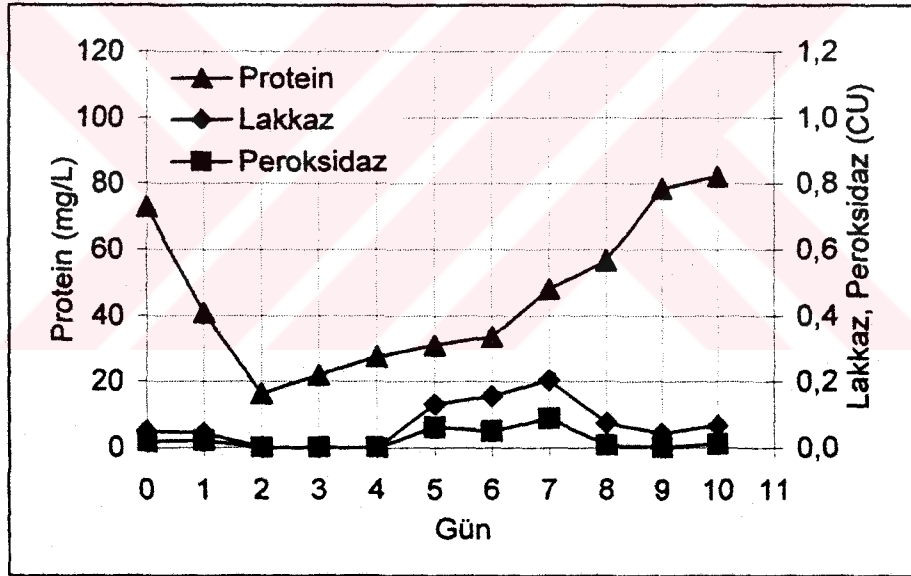
İnkübasyonun başlangıcında ortamdaki KOİ 317,0 mg/L ve şeker konsantrasyonu 201,7 mg/L olarak ölçülmüştür. Ortam pH sınırı 4,78'e ayarlanmasına karşın fungus aşılması ve boyar madde eklenmesinin ardından pH 4,88'e yükselmiş ve inkübasyon sonuna kadar değişmemiştir. KOİ ve şeker konsantrasyonlarının inkübasyonun 3. gününe kadar 176,30 ve 82,47 mg/L'ye düştüğü ve ardından birbirlerine paralel artışlar ve azalışlar gösterdiği saptanmıştır. İnkübasyonun 7. gününde KOİ ve şeker konsantrasyonunun arttığı ve bu günden sonra birbirlerine paralel artışlar ve azalışlar gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.25).

Fungus gelişiminin izlenmesi amacı ile yapılan KMA analizlerinde fungusun inkübasyonun ilk gününde ağırlığını arttırmadığı, 3.-4. güne kadar hızla geliştiğini göstermektedir. İnkübasyon sonunda fungusun kuru misel ağırlığı 1,8 g/L'ye ulaşmıştır (Şekil 4.25). Bu bulgu fungusun lif içeren ortama adaptasyonunu bir günde tamamladığını, inkübasyonun 5. gününe kadar hızla ürediğini ve ardından durağan faza girdiğini göstermektedir.

İnkübasyonun 2, 3 ve 4. gününde enzim aktivitesine rastlanmamıştır. Fungusun durağan faza girdiği 4. günden sonra enzim aktivitelerinde hızlı bir artış olmuş ve 7. günde lakkaz ve peroksidaz enzim aktivitesi en yüksek seviyesine ulaşmıştır (sırası ile 0,204 CU ve 0,088 CU). Fungusun politron homojenizatörde parçalanmasından dolayı yüksek olan protein konsantrasyonunun inkübasyonun 2. gününe kadar hızla azaldığı ardından inkübasyonun ilerleyen günlerinde arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.25. *Luffa cylindrica* ile tutuklanmış *F. trogii*'nin kültür ortamında KOİ, şeker (mg/L) ve KMA (g/L) değişimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı)



Şekil 4.26. *Luffa cylindrica* ile tutuklanmış *F. trogii* nin kültür ortamında Protein (mg/L) ve Lakkaz, Peroksidaz (CU) enzim aktiviteleri değişimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı)

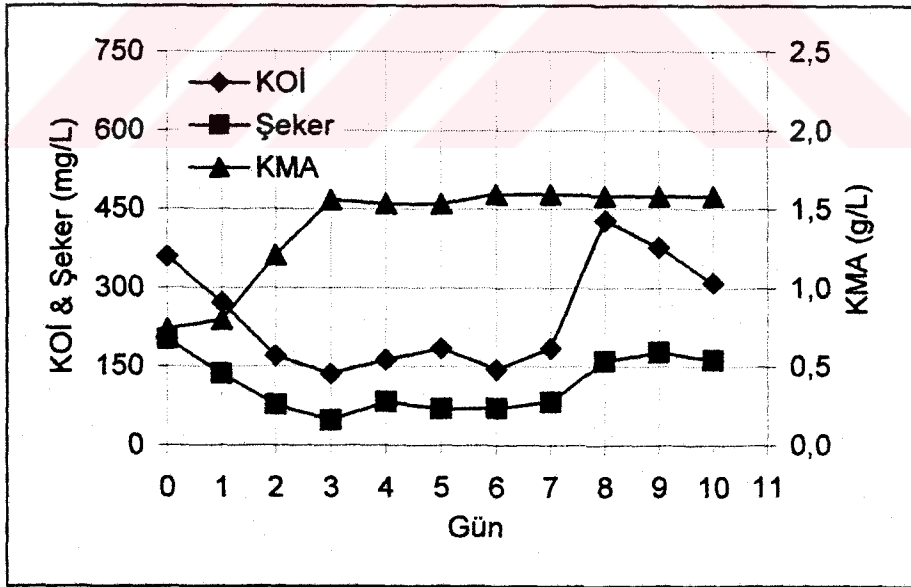
İnkübasyonun 3. gününe kadar şeker konsantrasyonunun 100 mg/L'nin altına düştüğü, ilerleyen günlerde salınımlar gösterdiği saptanmıştır. Ortamda şeker konsantrasyonunun artışına neden olan kaynak çalışmada tutuklama materyali olarak kullanılan lifdir. Ortamda şeker konsantrasyonunun 100 mg/L'nin altına düşmesi,

aynı zamanda enzim aktivitelerinin artmaya başlaması tutuklama materyalinin *F. trogii* tarafından karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmaya başlandığını göstermektedir.

#### 4.3.3. İnkübasyonun İlk Gününde Boyar Madde Eklenen Ortamlarda Renk Giderimi (0. Gün-T<sub>0</sub>)

İnkübasyonun başlangıcında ortamlardaki KOİ ve şeker konsantrasyonu 359,0 ve 201,7 mg/L olarak ölçülmüştür. Ortam pH sınır 4,78'e ayarlanmasına karşın fungus aşılması ve boyar madde eklenmesinin ardından pH 4,86'ya yükselmiş ve inkübasyon sonuna kadar değişmemiştir.

Fungusun aşılandığı ve boyar maddenin eklendiği ilk günden itibaren 3. güne kadar KOİ ve şeker azalmış, KOİ 136,04 mg/L'ye şeker 82,83 mg/L'ye düşmüştür. İnkübasyonun 3. gününden sonra KOİ ve şeker konsantrasyonunda birbirine paralel artışlar ve azalışlar saptanmıştır. En hızlı KOİ ve şeker artışı 7. günde gerçekleşmiş ve daha sonra inkübasyonun sonuna kadar azalış göstermiştir (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. Tutuklanmış *F. trogii*'nin inkübasyonun ilk gününde boyar madde eklenen ortamlardaki KOİ, şeker (mg/L) ve KMA (g/L) değişimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı)

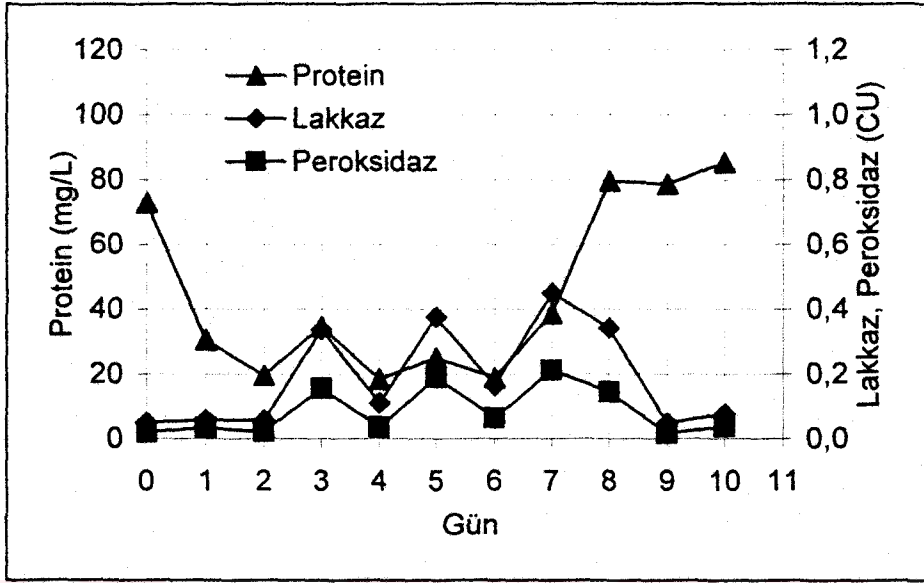


Boyar madde içeren ortama (~ 15,0 mg/L) yaklaşık 0,738 g/L kuru ağırlıkta fungus aşılansın, inkübasyonun 1. gününde fungus ağırlığı 0,797 g/L'ye, 2. gününde 1,205 g/L'ye ulaşmıştır. Bu sonuç fungusun inkübasyonun ilk gününde boyar madde içeren ortama adapte olduğunu ve ardından logaritmik üreme fazına geçtiğini göstermektedir. İnkübasyonun 3. gününde KMA 1,558 g olarak saptanmış ve inkübasyon sonuna kadar KMA artış hızı azalmıştır (Şekil 4.27). Fungus çalkalamalı şartlarda lif içeren ortamda üremesini 3 günde tamamlamış (1,558 g/L) ve inkübasyonun sonuna kadar yaklaşık aynı kalmıştır (1,581 g/L). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında adaptasyon sürelerinin aynı olduğu ancak boyar madde bulunan ortamda fungusun daha erken sekonder metabolizmaya girdiği belirlenmiştir. İnkübasyonun 3. gününde şeker konsantrasyonunun 100 mg/L'nin altına düşmesiyle fungusun sekonder metabolik faza girmesi ve benzer sonucun kontrol grubunda da saptanması sekonder metabolik faza girişte şeker konsantrasyonun önemli olduğunu göstermektedir.

Ligninolitik enzim aktivitesine (lakkaz ve peroksidaz) fungusun gelişmesinin durduğu 3. günde rastlanmıştır, en yüksek enzim aktivitesine 5. ve 7. günlerde (sırası ile 0,377 ve 0,450 CU) ulaşılmıştır. Prekültürde yetiştirilen fungusun parçalanarak ortamlara aşılansından dolayı ilk günde protein miktarı 72,88 mg/L olarak saptanmıştır. İnkübasyonun 2. gününe kadar protein miktarı hızla azalmış inkübasyonun 6. gününden sonra enzim sentezine bağlı olarak artışlar olmuştur (Şekil 4.28).

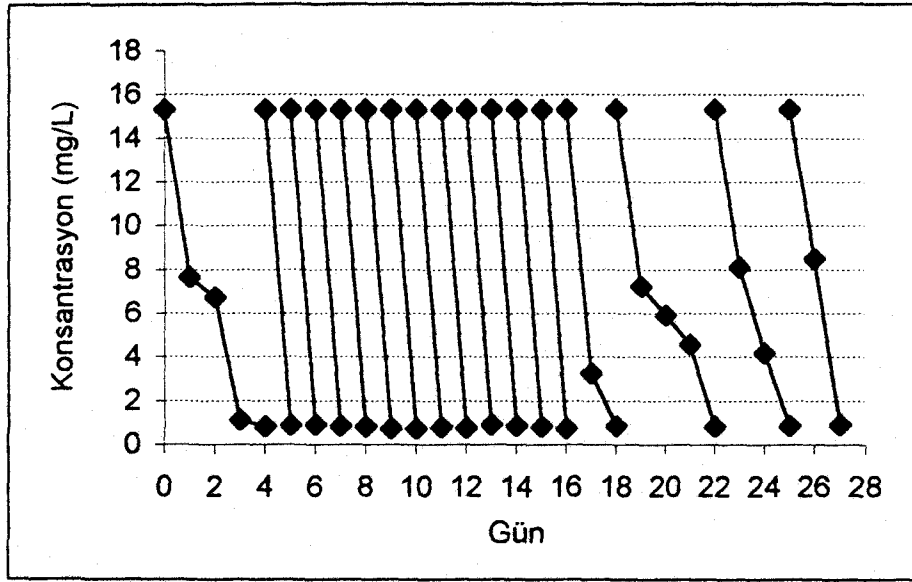
Lif içeren ortama fungus aşılandıktan 24 saat sonra ortamlarda 7,63 mg/L (% 50,13 giderim), 48 saat sonra 6,74 mg/L (% 55,96 giderim), 72 saat sonra 1,10 mg/L (% 92,81 giderim) boyar madde saptanmıştır (Şekil 4.29). İnkübasyonun ilk gününde boyar maddedeki hızlı giderim boyar maddenin tutuklama materyali olarak kullanılan lif üzerine adsorbe olmasından kaynaklanmaktadır. Makroskobik ve mikroskobik incelemeler sonucunda boyar maddenin fungus yüzeyine adsorbe olmadığı saptanmıştır. Fungus içermeyen ortamda yapılan analizler boyar maddenin yaklaşık 6,45 mg'ının lif üzerine adsorbe olduğunu göstermiştir. Fungus içeren ortamda, ortama eklenen boyar maddenin inkübasyonun 4. gününde ve lif üzerine

adsorbe olan boyar maddenin ise fungusun üremesini tamamladığı ve enzimlerin sentezlenmeye başladığı 3. gününde tümüyle giderildiği gözlenmiştir.



**Şekil 4.28.** *Luffa cylindrica* ile tutuklanmış *F. trogii*'nin inkübasyonun ilk gününde boyar madde eklenen ortamda protein (mg/L) ve lakkaz, peroksidaz (CU) enzim aktiviteleri değişimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı)

İnkübasyonun ilk gününde boyar madde eklenen ortamlarda lif üzerine tutuklanmış *F. trogii*'nin maksimum renk giderim kapasitesinin bulunması amacı ile ortama boyar madde yüklemesi (15,3 mg/L) yapılmış ve boyar madde konsantrasyonu 1,0 mg/L nin altına düştüğünde ( $\geq$  % 93,50) yüklemeye devam edilmiştir (Şekil 4.29). Ortamlara inkübasyonun 4. gününden 15. gününe kadar 15,3 mg/L konsantrasyonda 12 defa boyar madde eklenmiş (183,6 mg) ve her yüklemeden 24 saat sonra boyar madde konsantrasyonu 1,0 mg/L nin altına düşmüştür. Fungusun bu ortamdaki renk giderim yeteneğinin 16. günden sonra azaldığı ve 16. günde eklenen boyar maddenin 48 saatte, 18. günde eklenen boyar maddenin 96 saatte, 22. günde eklenen boyar maddenin 72 saatte giderildiği saptanmıştır. İnkübasyon sonuna kadar 260,1 mg boyar maddenin rengi fungus tarafından giderilmiştir.

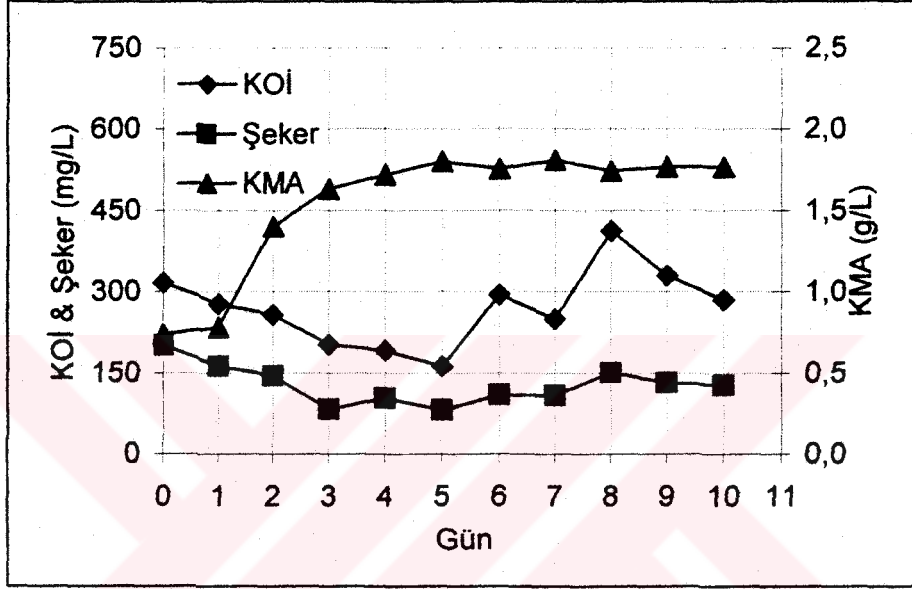


**Şekil 4.29.** İnkübasyonun ilk gününde boyar madde eklenen ortamda boyar madde giderimi (mg/L) (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı)

#### 4.3.4. İnkübasyonun 3. Gününde Boyar Madde Eklenen Ortamlarda Renk Giderimi (3. gün-T<sub>3</sub>)

*F. trogii*'nin lif içeren ortama aşılmasının ardından 3 gün boyunca çalkalamalı inkübatörde (150 rpm, 30 °C) yetiştirildikten sonra ortama boyar madde (15 mg/L) eklenmiştir. Boyar maddenin ortama eklendiği 3. gün KOİ ve şeker konsantrasyonu 202,4 ve 82,4 mg/L olarak ölçülmüştür. Yapılan pH ölçümlerinde pH'nın inkübasyon sonuna kadar değişmediği saptanmıştır. Yapılan KOİ analizleri KOİ'nin 5. güne kadar azaldığı, ardından şeker konsantrasyonuna bağlı olarak artışlar ve azalışlar gösterdiği saptanmıştır. En yüksek KOİ ve şeker konsantrasyonuna 8. günde ulaşılmıştır (Şekil 4.30). Fungal gelişiminin kontrol grubunda olduğu gibi aynı zamanda yavaşladığı ve fungusun sekonder faza girildiği saptanmıştır. İnkübasyonun 4. ve 5. günlerinden sonra kuru misel ağırlığı kontrol grubundan daha düşük ve inkübasyonun ilk gününde boyar madde eklenen ortamdaki daha yüksek olması fungusun lif üzerine tutuklandıktan sonra boyar maddeden daha az etkilendiğini göstermektedir (Şekil 4.30).

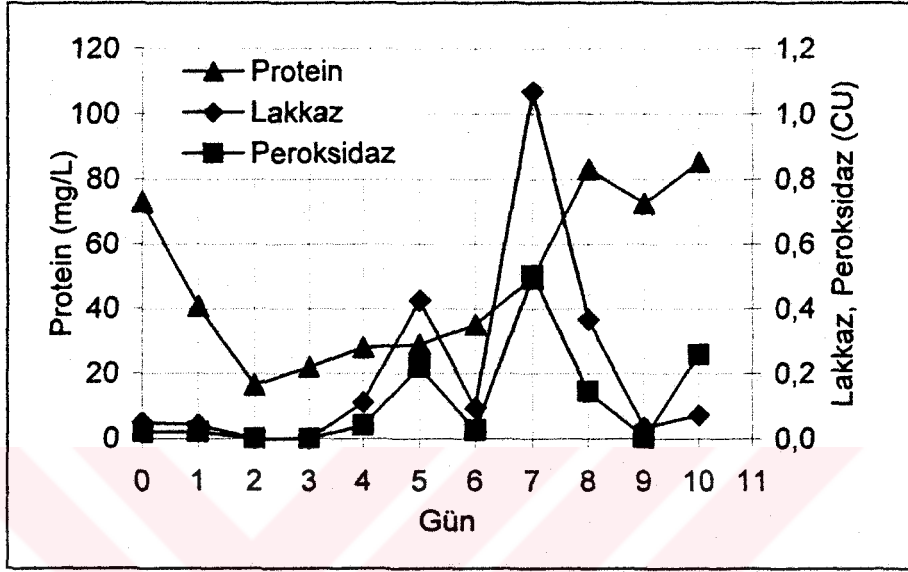
Fungusun 3 günlük inkübasyonu boyunca enzim aktivitesine rastlanmamıştır. Lakkaz ve peroksidaz enzimlerinin boyar maddenin eklendiği 3. günden sonra sentezlendiği ve inkübasyonun 5. gününde 0,426 ve 0,220 CU, 7. gününde 1,068 ve 0,502 CU'ya ulaştığı saptanmıştır. Bu ortamda ölçülen enzim aktivitelerinin kontrol grubunda ve  $T_0$ 'dan yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar enzim sentezinin boyar madde ile ilişkili olduğu ve 3 günlük inkübasyonun enzim sentezi için uygun süre olduğunu göstermiştir (Şekil 4.31).



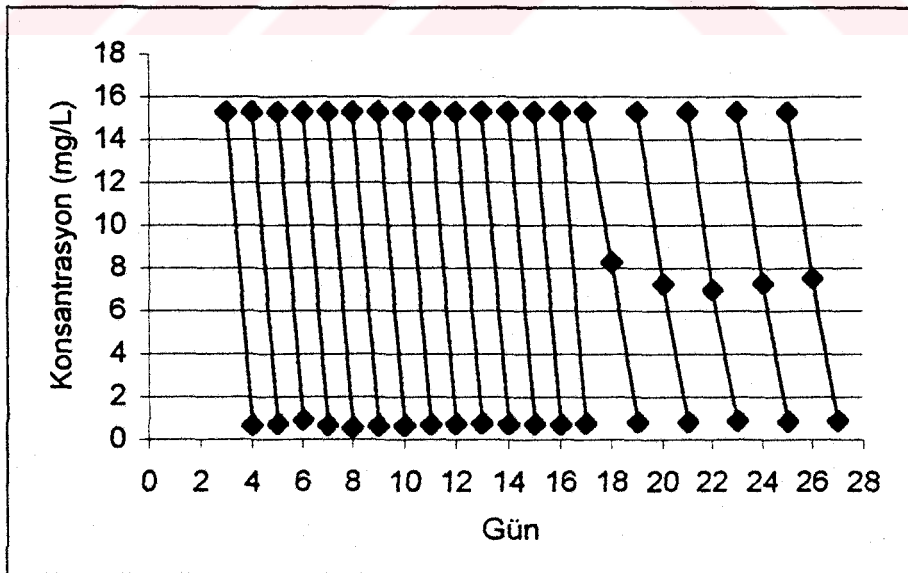
Şekil 4.30. Üç günlük misel yaşına sahip *Luffa cylindrica* ile tutuklanmış *F. trogii*'nin boyar madde içeren ortamda KOİ, şeker (mg/L) ve KMA (g/L) değişimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı)

Yapılan boyar madde analizi ortam renginin boyar maddenin eklenmesinden 24 saat sonra %90'nın üzerinde giderildiği saptanmıştır (Şekil 4.32). İnkübasyonun 3. gününde ortama eklenen boyar maddenin renginin 24 saatte %90'nın üzerinde giderildiği saptanmıştır. İnkübasyonun 3. gününde boyar madde eklenen ortamda lif üzerine tutuklanmış *F. trogii*'nin maksimum renk giderim kapasitesinin bulunması amacı ile ortama boyar madde yüklemesi (15,3 mg/L) yapılmış ve boyar madde konsantrasyonu 1,0 mg/L nin altına düştüğünde ( $\geq$  % 93,50) tekrar yüklemeye devam edilmiştir. Ortama inkübasyonun 4. günden 17. güne kadar 15,3 mg/L konsantrasyonda 13 defa boyar madde eklenmiş (198,9 mg) ve her yüklemeden 24 saat sonra boyar madde konsantrasyonu 1,0 mg/L'nin altına düşmüştür. Fungusun renk gideriminin 17. günden sonra azaldığı ve inkübasyonun 17. gününden 25.

gününe kadar 5 defa eklenen boyar maddenin 48 saatte giderildiği saptanmıştır. İnkübasyon sonuna kadar 290,7 mg boyar madde fungus tarafından giderilmiştir. Bu sonuç inkübasyonun ilk gününde boyar madde eklenen ( $T_0$ ) ortamları karşılaştırıldığında daha yüksek gerçekleşmekte (Şekil 4.32) ve renk gideriminin fungusun life tutuklanmasıyla hızla arttığını göstermektedir.



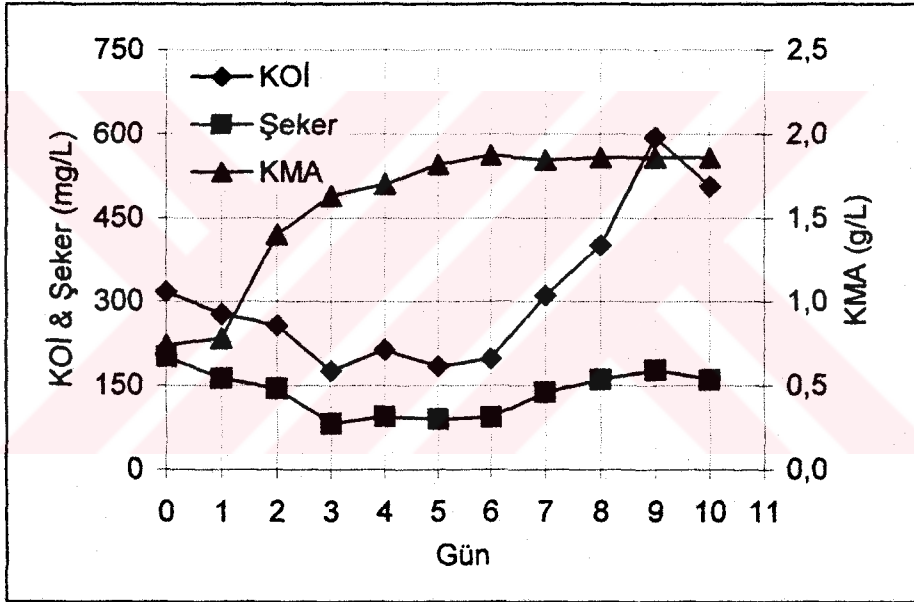
Şekil 4.31. Üç günlük misel yaşına sahip *Luffa cylindrica* ile tutuklanmış *F. trogii*'nin boyar madde içeren ortamda Protein (mg/L) ve Lakkaz, Peroksidaz (CU) aktivite değişimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı)



Şekil 4.32. Üç günlük misel yaşına sahip life tutuklanmış fungus tarafından renk giderimi (mg/L) (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı)

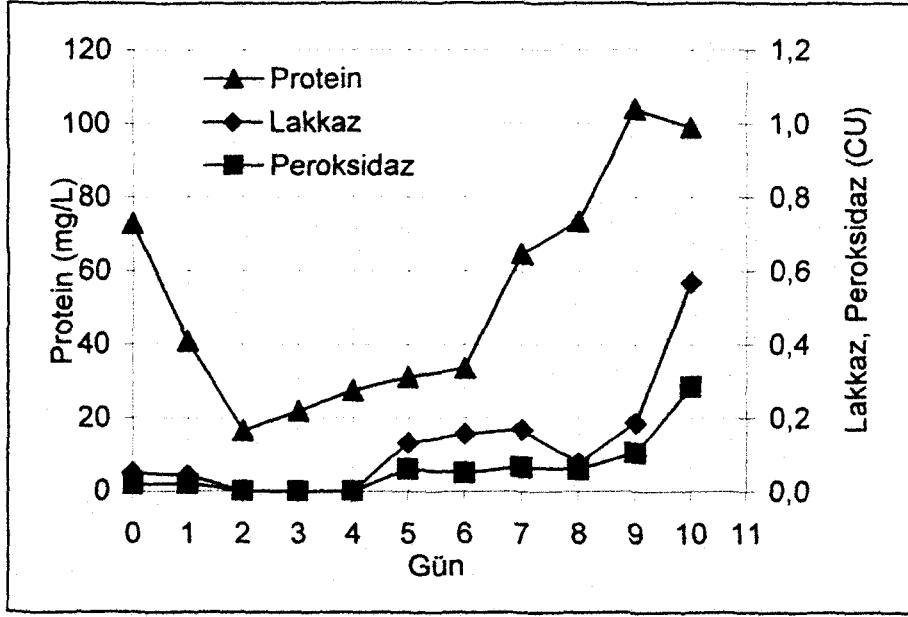
#### 4.3.5. İnkübasyonun 6. Gününde Boyar Madde Eklenen Ortamlarda Renk Giderimi (6. gün-T<sub>6</sub>)

Beyaz çürükçül fungus *F. trogii*'nin lif içeren ortama aşılmasının ardından 6 gün boyunca çalkalamalı inkübatörde (150 rpm, 30 °C) yetiştirildikten sonra ortama boyar madde (15 mg/L) eklenmiştir. İnkübasyonun başlangıcında ortamdaki KOİ ve şeker konsantrasyonu 317,0 ve 201,7 mg/L olarak ölçülmüş, boyar maddenin ortama eklendiği 6. gün KOİ ve şeker konsantrasyonunun 198,50 ve 92,88 mg/L'ye düştüğü saptanmıştır. Boyar maddenin life tutuklanmış fungus içeren ortama eklendiğinde ortam pH'sı 4,88 olarak ölçülmüş ve inkübasyon sonuna kadar değişmediği saptanmıştır.



Şekil 4.33. Altı günlük misel yaşına sahip *Luffa cylindrica* ile tutuklanmış *F. trogii*'nin inkübasyonun KOİ, şeker (mg/L) ve KMA (g/L) değişimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı)

İnkübasyonun 5. gününde ortamda ölçülen KOİ ve şekerin, boyar maddenin ortama eklendiği 6. günden itibaren hızla arttığı saptanmıştır. Ortamda ölçülen KOİ ve şeker gideriminin günlere bağlı olarak çizilen grafiği, iki parametrenin birbirleriyle yakın ilişkide olduğunu göstermektedir (Şekil. 4.33). Fungusun boyar maddenin ilk eklendiği 6. günde durağan fazda olduğu ve inkübasyon boyunca misel ağırlığını değiştirmedeği saptanmıştır (1,858 g/L).

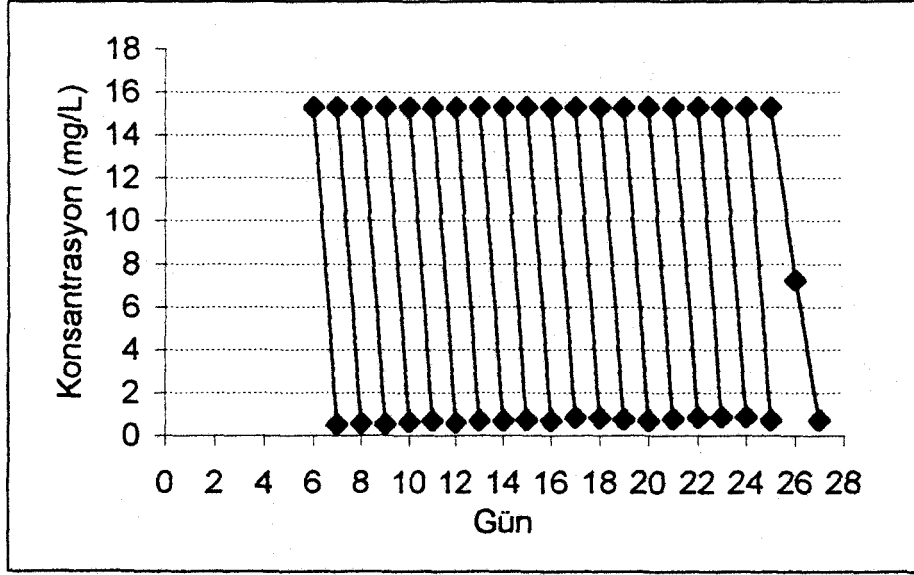


Şekil 4.34. Altı günlük misel yaşına sahip *Luffa cylindrica* ile tutuklanmış *F. trogii* nin Protein (mg/L) ve Lakkaz, Peroksidaz (CU) enzim aktiviteleri değişimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı)

İnkübasyon ortamında 2., 3. ve 4. Günlerde gerek lakkaz gerekse de peroksidaz enzim aktivitelerine rastlanmamıştır. İnkübasyonun 5. gününden itibaren sentezlenmeye başlayan lakkaz ve peroksidaz, inkübasyon sonuna kadar en fazla 0,568 ve 0,286 CU seviyesine çıkmıştır. Enzim aktivitesi 3 günlük misel yaşına sahip kültürlerde ölçülen enzim aktivitelerinden düşük bulunmuştur (Şekil 4.34).

İnkübasyonun 6. gününde ortama boyar madde eklenmiş ve boyar maddenin renginin 24 saatte % 90'nun üzerinde giderildiği saptanmıştır. Life tutuklanmış ve 6 günlük misel yaşına sahip *F. trogii*'nin tekrar kullanılması ve fungusun bu ortamdaki en yüksek renk gideriminin bulunabilmesi için saptayabilmek için ortama aynı konsantrasyonu sağlayacak şekilde (15 mg/L) boyar madde eklenmiştir. 24 saat aralıkla yapılan ölçümlerde ilk boyar maddenin eklendiği 6. günden inkübasyonun 25. gününe kadar 20 defa eklenen boyar maddenin % 90'nun üzerinde giderildiği saptanmıştır. İnkübasyonun 26. gününde ortama eklenen boyar maddenin 24 saat sonunda % 53'ünün ve 48 saat sonunda ise % 96'sının giderildiği tespit edilmiştir.

İnkübasyon sonuna kadar 6 günlük misel yaşına sahip life tutuklanmış *F. trogii* tarafından toplam 306 mg boyar maddenin giderildiği saptanmıştır (Şekil 4.35).



Şekil 4.35. İnkübasyonun 6. gününde boyar madde eklenen ortamda renk giderimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı)

Farklı misel yaşlarının çalkalamalı koşullarda renk giderimi üzerine etkisinin incelendiği bu çalışmada elde edilen renk giderim veriminin statik kültürlerde ve çalkalamalı koşullarda serbest hücrelerde elde edilen verimden oldukça yüksek olduğu saptanmıştır. Statik kültürlerle yapılan renk giderim çalışmasında 6 günlük inkübasyon periyodu sonunda yaklaşık 15,0 mg/L konsantrasyonda boyar maddenin rengi yaklaşık % 95 oranında giderilirken, aynı inkübasyon süresinde inkübasyonun ilk gününde boyar madde eklenen ortamlarda life tutuklanmış fungus tarafından 60 mg/L konsantrasyonda boyar maddenin rengi tamamen giderilebilmiştir.

Çalkalamalı koşulların statik koşullara göre daha başarılı olduğu birçok araştırmacı tarafından da rapor edilmiştir. *Bjerkandera sp. BOS55* ve *T. versicolor*'un statik kültürlerinin Amaranın % 5-8'ini 20 günde, çalkalamalı kültürlerinin ise % 99'unu 24 saatte giderdiği bildirilmiştir. Bununla beraber 10 gün statik koşullarda beklemiş *T. versicolor* kültürleri çalkalamalı ortama alındığında renk gideriminin arttırdığı rapor edilmiştir. Bunun nedeni, çalkalamanın etkisi ile ortamda oksijen çözünürlüğünün ve hücrenin ve/veya enzimlerin boyar madde ile karşılaşma



olasılığının artması şeklinde açıklanmıştır [148, 165]. Aynı çalışmada statik koşullarda 60 mg/L Remazol Black B'nin *T. versicolor* tarafından 3, *P. chrysosporium* tarafından 2 ve *Bjerkandera sp* BOS55 tarafından 4 günde tümüyle giderildiği rapor edilmiştir. *P. chrysosporium* ile statik koşullarda yapılan bir başka çalışmada ise fungusun renk gideriminde etkili olduğu rapor edilmiştir [150]. Bu durum birçok araştırmacı tarafından yüzey alanı-hacim oranının (10 mL ortam/125 mL erlen) çok yüksek olmasından kaynaklanmış olabileceği şeklinde açıklanmış ve inkübasyon ortamında fungusun ihtiyaç duyduğu oksijeni kolaylıkla sağlayabildiği vurgulanmıştır [74, 76, 77, 192, 193]. Kağıt hamuru üretim tesislerinden kaynaklanan atıksuların renginin giderilmesi çalışmasında, statik koşullarda inkübasyona bırakılan kültürlerin gelişimlerinin yavaş olması nedeni ile renk gideriminde etkili olmadıkları rapor edilmiştir [161]. *T. villosa* ile renk giderim çalışmasında renk giderim hızının artırılmasında çalkalamalı şartların gerekli olduğu rapor edilmiştir [97]. Zhang ve Yu'nun [194] Acid violet 7 ile yaptıkları renk giderimi çalışmasında 100 mg/L konsantrasyonda boyar maddenin renginin serbest hücrelerle 11 saatte; aktif karbona tutuklanmış hücrelerle 6 saatte tamamen giderildiği rapor edilmiştir.

Bu çalışmada serbest *F. troglia* misellerinin Reactive Black 5'in renk gideriminde etkili olmadığı saptanmıştır. Ancak Yeşilada ve arkadaşlarının [141] serbest *F. troglia* misellerini kullandıkları çalışmada Astrozon boyar maddesinin renginin etkili şekilde giderildiği rapor edilmiştir. Benzer fungus türlerinin kullanılmasına karşılık elde edilen farklı sonuçlar renk gideriminde boyar madde türünün önemli bir faktör olduğunu göstermektedir. Benzer sonuç Claus ve ark. [195] tarafından da rapor edilmiş, renk giderimine karşı oluşan direncin boyar maddelerin yapılarının farklı olmasından kaynaklandığı bildirilmiştir.

Boyar madde içermeyen kontrol grubunda inkübasyonun ilk günlerinde prekültürden gelen enzimin aktivitesi okunmuş, ardından 2., 3. ve 4. günlerde enzim aktivitesine rastlanmamıştır. KMA'nın sabitlenmeye başladığı 4. günden sonra enzim aktivitesinin artmaya başladığı ve en yüksek aktiviteye 7. günde (yaklaşık 0,2 CU) ulaşıldığı saptanmıştır. Inkübasyonun ilk gününde boyar madde eklenen

ortamda ise KMA'nın sabitlendiği 3. günden itibaren artan enzim sentezi 5. ve 7. günlerde en yüksek seviyelere çıkmıştır (yaklaşık 0,4 CU). İnkübasyonun 3. gününde boyar madde eklenen ortamda ise boyar madde eklenmesinin ardından 5. ve 7. günlerde enzim aktivitesinin hızla arttığı (yaklaşık 1,0 CU) bulunmuştur. İnkübasyonun 6. gününde boyar madde eklenen ortamda ise boyar madde ilavesinin ardından enzim aktivitesi artmaya başlamıştır. Literatürlerde fungusun ortama adaptasyonunun ardından enzim aktivitesinin gözlenmeye başladığı rapor edilmiştir [196, 197]. *P. chrysosporium*'la yapılan renk giderimi çalışmasında fungusun sekonder metabolik faza girdiği 6. günde enzim sentezinin en yüksek seviyede olduğu ve Remazol Turquoise Blue'nun renginin hızla giderildiği bulunmuştur. Bu bulgu, ortamda LiP ve MnP aktiviteleri düşük bulunmasına rağmen renk gideriminde enzimlerin ilişkisi olduğu şeklinde yorumlanmıştır [198]. Bu çalışmada bu bulguya ek olarak ortama boyar madde ilavesinin enzim aktivitesini arttırdığı bulunmuştur.

Çalışılan tüm ortamlarda (kontrol, T<sub>0</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>6</sub>) şeker konsantrasyonunun yaklaşık 100 mg/L'ye düşmesinin ardından enzim sentezinin ve renk gideriminin arttığı belirlenmiştir. Bu sonuç lif içeren ortamda fungus tarafından sentezlenen enzimlerin boyar madde gideriminde rol oynadığını göstermektedir. Funguslarla yapılan çalışmalarda renk gideriminin ortamda bulunan glikoz ve/veya azotun tükenmesi ile hızlandığı rapor edilmektedir. Wang ve Yu [140], 10 günlük misel yaşına sahip fungusun (*Trametes versicolor*) yüzeyine adsorbe olan boyar maddenin azotun tükenmesi ile dekolorize edildiğini ve enzim sentezinin arttığını rapor etmişlerdir. Bir diğer çalışmada *P. chrysosporium*'un üreme ortamında glikoz seviyesinin 2,0 g/L'den 0,2 g/L'ye düşmesi ile enzim sentezinin arttığı bildirilmiştir. [74]. Benzer bulgu Vandertol-Vanier ve ark. [200] tarafından rapor edilmiş, *Coriolopsis gallica*'nın yetiştirildiği ortamda glikozun azalmasıyla enzimin sentezlenmeye başladığı bildirilmiştir. Shim ve Kawamoto [201], karbon ve azot miktarının sınırlı olduğu ortamlarda enzimlerin daha yüksek oranlarda sentez edildiklerini rapor etmişlerdir. Lakkaz enzimi ile yapılan bir çalışmada 50 mg/L Reaktif Black 5'in renginin inkübasyon süresi sonunda (30 dakika) yaklaşık % 5 (serbest enzim) ile % 10 (tutuklanmış enzim) arasında giderildiği rapor edilmiştir.

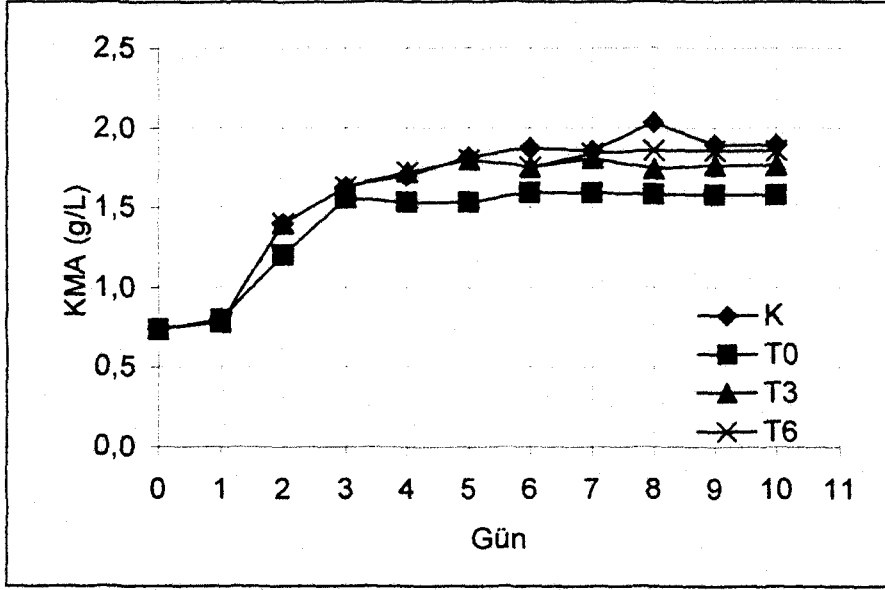
[199]. Bu bulgu Reaktif Black 5'in lakkaz enzimi tarafından sınırlı şekilde renksizleştirilebileceğini göstermektedir.

*Luffa cylindrica* ile tutuklanmış *F. trogii* kültürlerinde glikoz konsantrasyonunun 100 mg/L nin altına düşmesini izleyen günlerde glikoz konsantrasyonunda salınımlar saptanmıştır. Karbon kaynağı eklemesi yapılmayan bu ortamlarda glikoz konsantrasyonundaki artış fungusun odun çürükçül olmasından kaynaklanmaktadır. Ligninolitik aktiviteye sahip fungusun sentezlediği enzimlerle selülozu monomerlerine parçalamakta ve gerekli olan enerji ihtiyacını buradan karşılamaktadır [201]. Bu nedenle çalışma boyunca KOI'nin de buna bağlı olarak salınımlar göstermesi beklenen bir sonuçtur.

Bu çalışmada, ilk günde boyar madde eklenen ortamda ( $T_0$ ) saptanan enzim aktivitelerinin boyar madde içermeyen kontrol grubundan daha yüksek bulunması, 3 günlük ( $T_3$ ) ve 6 günlük ( $T_6$ ) misel yaşına sahip kültürlerde boyar madde ilavesinin ardından enzim sentezinin hızla artması renk gideriminde enzimlerin rolü olduğunu göstermektedir.

#### 4.3.6. Boyar Madde Reaktif Black 5'in Life tutuklanmış *F. trogii*'nin Gelişimi Üzerine Etkisi

Tutuklama materyali olarak *Luffa cylindrica*'nın kullanıldığı çalışmada fungusun ortama aşılmasını takip eden farklı günlerde ortama eklenen boyar maddenin fungal gelişim üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Çalışılan tüm ortamlarda fungusun ortama yaklaşık 1 günde adapte olduğu, adaptasyonu tamamladıktan sonra logaritmik üreme fazına girdiği bulunmuştur (Şekil 4.36). Fungal gelişme  $T_0$ 'da 3. günde dururken kontrol grubunda 3. günden sonra yavaşlamaya başlamış ve 6. günde durmuştur. İnkübasyon sonunda KMA kontrol grubunda 1,856 g/L'ye ulaşırken  $T_0$ 'da 1,580 g/L'de kalmıştır. Bu sonuç boyar maddenin fungal gelişimi inhibe ettiği ve fungusun durağan faza girişini hızlandırdığını göstermektedir.



**Şekil 4.36.** Farklı inkübasyon sürelerinde eklenen Reaktif Black 5'in life tutuklanmış *F. trogii* gelişimi üzerine etkisi.

İnkübasyonun 3. gününde boyar madde eklenmesi yapılan grupta ( $T_3$ ) fungal gelişme kontrol grubunda olduğu gibi 3. günde yavaşlamaya başlamıştır. İnkübasyonun 5. gününden sonra fungal gelişme durmuştur. İnkübasyon sonunda  $T_3$  grubunda 1,765 g/L KMA saptanmıştır.  $T_0$  ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında boyar maddenin 3. günde eklenmesinin fungal gelişimi ilk günde boyar madde eklenen ortam kadar etkilemediğini göstermektedir.

İnkübasyonun 6. gününde boyar madde eklenen ortamda ( $T_6$ ) fungusun durağan fazda olduğu ve boyar madde eklenmesinin ardından KMA'nın değişmediği saptanmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında misel gelişiminin yaklaşık aynı olduğu (1,858 g/L) saptanmıştır. Boyar madde eklenmesinin yapıldığı 6. günde *F.trogii*'nin gelişimini tamamlamış olması ve kontrol grubuna yakın gelişim göstermesi sekonder metabolik faza giren fungusun boyar madde inhibisyonundan etkilenmediği göstermektedir. Ayrıca sonuçlar fungusun life tutuklanmasının boyar maddenin toksik etkisini azaltıcı bir faktör olduğu fikrini vermektedir.

#### 4.3.7. Farklı Misel Yaşlarında Renk Giderimine Ait İlk Hızların Bulunması

Boyar maddelerin renginin giderimlerine ilişkin enzimlerle yapılan çalışmalarda, boyar maddenin enzimle karşılaşmasının ardından ortam renginde azalma olmaktadır. Bu reaksiyonun  $t_0$  anındaki hızı ortamda ürün olmadığından en yüksek seviyededir ve ilk hız olarak adlandırılmaktadır. İlk hız ( $V_0$ ) reaksiyon başında sabit olabilir, ancak ortamdaki substratın azalması ile sifıra yaklaşır. Zamana karşı giderim grafiğinde başlangıç noktası sıfırdan geçecek şekilde çizilen doğrusal eğrinin eğimi ilk hızı verecektir.

Misel yaşının renk giderimi üzerine etkisinin incelendiği bu bölümde renk gideriminin birden fazla faktörden etkilendiği bulunmuştur. Ortamlarda ölçülen enzim aktivitelerinin, ortama boyar madde ilavesi yapıldığı günlerin ardından artması renk gideriminin enzimlerle ilişkili olduğunu göstermektedir. Ancak inkübasyonun ilk gününde boyar madde eklenen ortamda ( $T_0$ ) enzim aktivitesinin çok düşük olmasına;  $T_3$  ortamında 9. günde enzim aktivitesine rastlanmamasına rağmen renk gideriminde azalma olmaması renk gideriminde yalnızca enzimlerin değil aynı zamanda fungusun ve/veya literatürlerde rapor edildiği gibi bazı aktive edici küçük moleküllerin de rol oynadığını göstermektedir [140, 194]. Bu nedenle misel yaşının renk giderimi üzerine etkisinin incelendiği bu çalışmada renk gideriminin sağlandığı fungus, fungusun tutuklandığı lif ve fungus tarafından sentezlenen enzimler (lakkaz ve peroksidaz) tek bir katalizör olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmada kullanılan lifin ağırlığı tüm ortamlarda yaklaşık aynı tutulmuştur ( $\cong 1,000$  g). İnkübasyonun ilk gününde boyar madde ilavesinin yapıldığı ortamlarda fungus gelişiminin tutuklanma gerçekleşikten sonra boyar madde eklemesi yapılan ortamlardan daha fazla etkilendiği ve inkübasyon sonunda fungus gelişiminin daha düşük olduğu bulunmuştur. Bu nedenle misel yaşının renk giderimi üzerine etkisinin incelendiği bu çalışmada farklı misel yaşlarına ait ilk hızlar bulunurken birim kuru misel başına renk giderimi hesaplanmıştır.

Birim kuru hücre başına renk giderimi ( $q$ ) ortamda 24 saat sonunda giderimi sağlanan rengi veren boyar madde konsantrasyonunun ( $mg/L$ ;  $C_g$ ;  $C_{giderilen}$ ) aynı

günde ortamda ölçülen kuru misel ağırlığına ( $T_0$ ,  $T_3$ ,  $T_6$ ) bölünmesinden elde edilmiş, günlere bağlı renk giderimi ( $C_g$ ) kümülatif olarak değerlendirilmiştir. İlk hızın bulunabilmesi için,  $q$ 'ya karşı  $t$  grafiği çizilmiş ve  $q$ 'nun zamana karşı doğrusal artış gösterdiği aralıkta değerleri kesen doğrunun eğiminden ilk hız hesaplanmıştır. Grafikten elde edilen formül;

$$y = a \cdot x \quad (1)$$

şeklindedir ve burada  $y$  yerine  $q$  ve  $x$  yerine  $t$  yazıldığında oluşan denklemden birim zamanda birim kuru misel ağırlığı başına giderilen boyar maddeye ait ilk hız aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanabilmektedir.

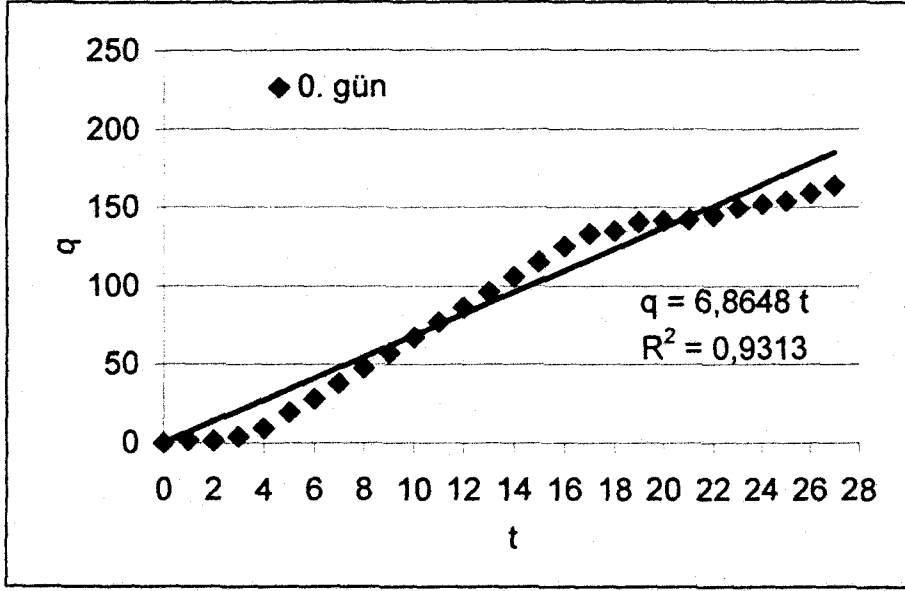
$$q = k \cdot t \quad (2)$$

$$k = q / t \quad (3)$$

$$k = (\text{mg boyar madde/g km}) / \text{gün} \quad (4)$$

Formülden elde edilen  $k$  sabiti renk giderimine ait ilk hızı ( $V_0$ ) vermektedir.

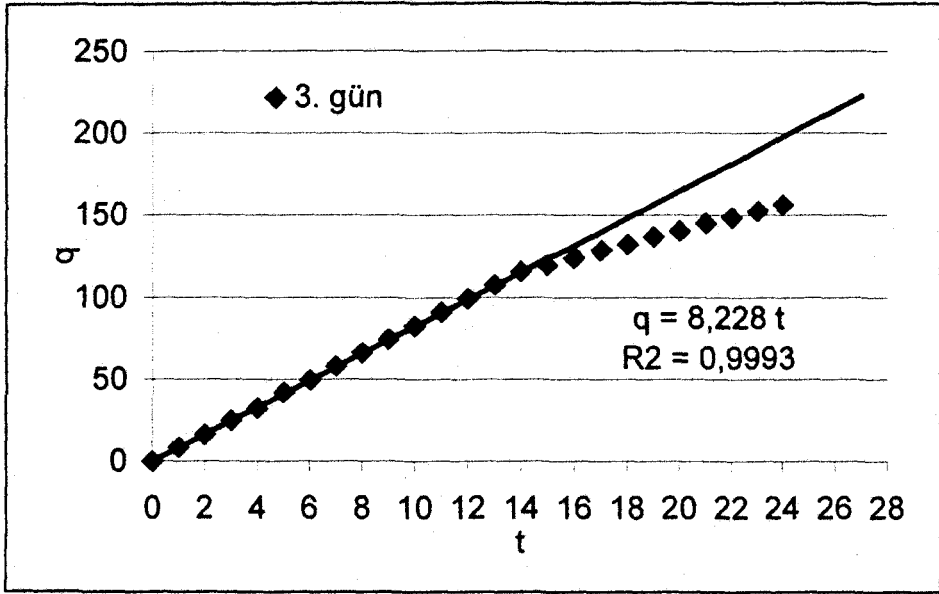
İnkübasyonun ilk gününde boyar madde eklenen ortamlarda inkübasyonun 3. gününe kadar fungusun yeni aşılandığı boyar madde ve lif içeren ortama adaptasyonundan (1. günün sonuna kadar) ve life tutuklanmış fungus miktarının yeterli düzeye ulaşmamasından (3. günün sonuna kadar) dolayı renk gideriminin etkili şekilde gerçekleşmediği belirlenmiştir. İnkübasyonun 17. gününe kadar renk giderimi doğrusal olarak artmıştır. Bu günden sonra renk giderim hızında azalma meydana gelmiştir. Bunun nedeni olarak, ortamda boyar maddenin renginin giderimi süresince aromatik bileşiklerin birikmesinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. İnkübasyonun ilk gününde boyar madde eklenen ortamda  $t$ 'ye karşı çizilen  $q$  grafiğinden boyar madde giderim hızı  $V_0 = 6,8648$  mg boyar madde / g km. gün olarak bulunmuştur (Şekil 4.37).



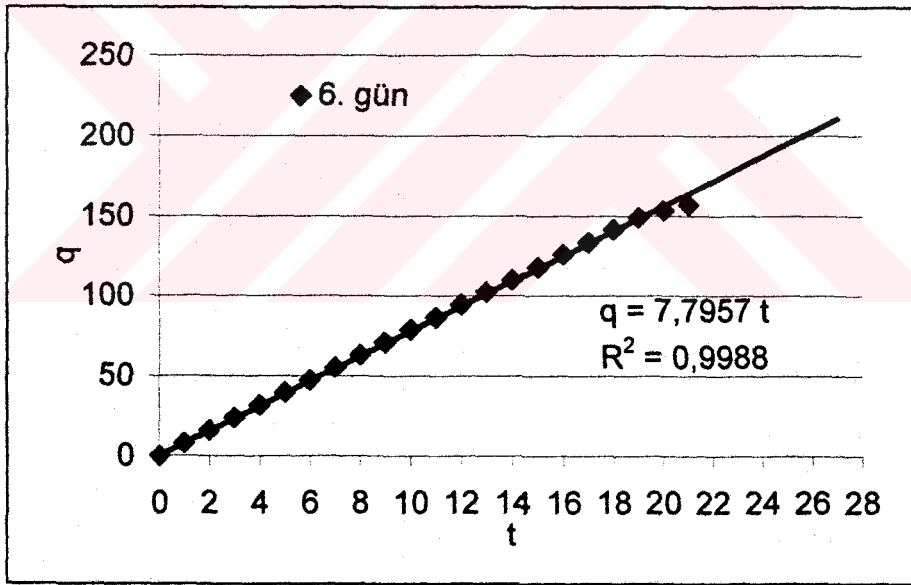
Şekil 4.37. İnkübasyonun ilk gününde boyar madde eklenen ortamlarda birim zamanda birim kuru hücre başına boyar madde giderimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı).

İnkübasyonun 3. gününde boyar madde eklenen inkübasyon ortamında renk gideriminin 15. güne kadar lineer olarak arttığı ardından azaldığı saptanmıştır. Bu ortamda ortama boyar maddenin eklenmesine kadar geçen sürede fungus ortama adaptasyonunu tamamlamış ve life tutuklanmıştır. Bu aşamadan sonra ortama eklenen boyar maddenin rengi etkili şekilde giderilmiştir. Bu sonuç renk gideriminde en iyi sonucun fungusun ortama adaptasyonunu tamamlamasının ardından boyar madde eklenmesi ile elde edileceğini göstermektedir. Çalışmada t'ye karşı çizilen q grafiğinden boyar madde giderim hızının  $V_0 = 8,228$  mg boyar madde / g km. gün olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.38).

İnkübasyonun 6. gününde boyar madde eklenen ortamda giderimin 21. güne kadar lineer olarak arttığı ardından azaldığı saptanmıştır. İnkübasyonun 3. gününde boyar madde eklenen ortamlarda olduğu gibi renk giderimi etkili şekilde gerçekleşmiştir. Çalışmada t'ye karşı çizilen q grafiğinden bu ortamda boyar madde giderim hızının  $V_0 = 7,7957$  mg boyar madde / g km. gün olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.39).



Şekil 4.38. İnkübasyonun ilk gününde boyar madde eklenen ortamlarda birim zamanda birim kuru hücre başına boyar madde giderimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı).



Şekil 4.39. İnkübasyonun ilk gününde boyar madde eklenen ortamlarda birim zamanda birim kuru hücre başına boyar madde giderimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı).

Lif içeren ve çalkalamalı koşullarda yapılan bu çalışma sonucunda farklı misel yaşlarına sahip fungusların bulunduğu ortalara 200 mg/L'ye yakın boyar



madde eklemesi yapılmıştır. Farklı misel yaşlarına sahip olmalarına rağmen rengi giderilen boyar madde miktarı birbirine yakın olmuştur.

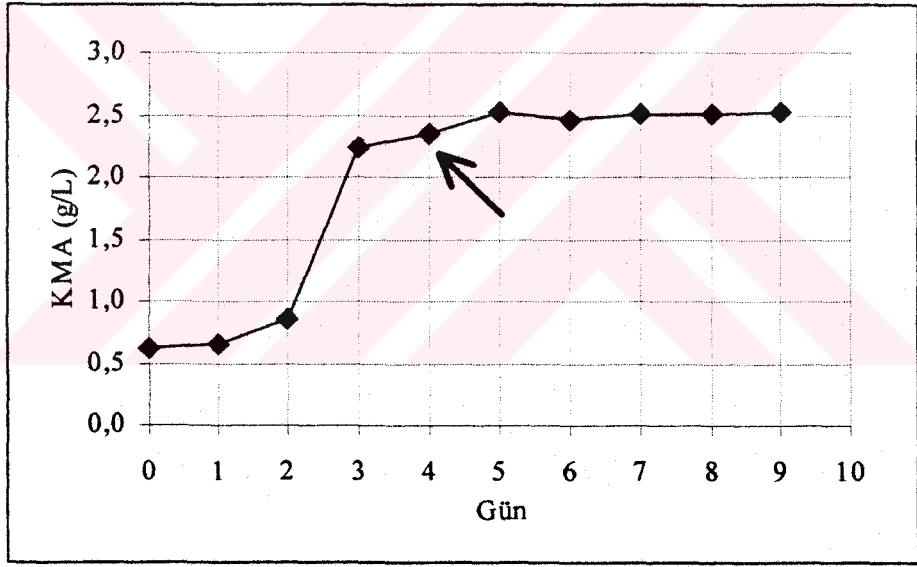
Farklı misel yaşlarına sahip fungusların (0 günlük, 3 günlük, 6 günlük misel yaşları) renk giderim hızlarının sırası ile 6,8648, 8,228 ve 7,7957 mg boyar madde / g km. gün olduğu bulunmuştur. Boyar madde eklenmiş lif içeren ortamda fungusun adaptasyon süresi yaklaşık 1 gün, life tutuklanması ve KMA'sını sabitlemesi yani sekonder metabolizmaya girişi üç gün sürmüştür.

Benzer sonuç Knapp ve ark. [149] tarafından da rapor edilmiştir. Farklı misel yaşlarının (4-6-9 günlük) Orange II üzerine etkisinin incelendiği çalışmada 6 günlük misel yaşına sahip fungus kültürlerinin renk gideriminde daha etkili oldukları rapor edilmiştir. *Phanerochaete flavid-alba* ile kağıt fabrikası atık sularının renk gideriminde fungusun 9-12 günlük kültürlerinin daha başarılı olduğu bildirilmiştir [158]. Özsoy [147] tarafından 7 günlük misel yaşına sahip *F. trogii*'nin renk gideriminde daha etkili olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmalarda rapor edilen bulgular çalışma bulgularımızla desteklenir görünmektedir.

İnkübasyonun ilk gününde boyar madde eklenmiş 0 günlük misel yaşında fungusun kullanıldığı ortamlarda renk giderimine ilişkin ilk hız ( $V_0$ ), 3 ve 6 günlük misel yaşında fungusların kullanıldığı ortamlardan daha düşüktür. Bu nedenle çalkalamalı şartlarda renk giderim kapasitesinin bulunmasında fungusun life tutuklanması ve üremesini tamamlaması (3.-6. günler arası) beklenmiştir.

#### 4.3.8. Farklı Boyar Madde Konsantrasyonlarında Tutuklanmış *Funalia trogii*'nin Renk Giderimi

Life tutuklanmış *F. trogii*'nin çalkalamalı koşullarda en yüksek renk giderim veriminin bulunabilmesi için ortama farklı konsantrasyonlarda (18, 34, 61, 96, 125 mg/L) boyar madde eklenmiştir. *Funalia trogii*, lif içeren (*Luffa cylindrica*) ( $1,000 \pm 0,031$  g/L lif kuru ağırlığı) 0,1 M fosfat tamponu ile pH sı 4,78'e ayarlanmış 100 mL ortama aşılanmış (yaklaşık 0,624 g/L kuru ağırlıkta) ve 30 °C'de 150 rpm'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Fungus gelişimi 24 saat aralıkla 9 gün boyunca izlenmiş ve fungus gelişiminin 3. günden sonra azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.40). Boyar madde ilavesinin ardından fungus KMA'nın değişmemesi (Bölüm 4.3.1-4.3.4) nedeniyle ortamlara boyar madde ilavesi inkübasyonun 4. gününde ( $T_0$ ) yapılmıştır.



Şekil 4.40. Günlere bağlı Kuru Misel Ağırlığı (KMA) Değişimi (g/L) (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı).

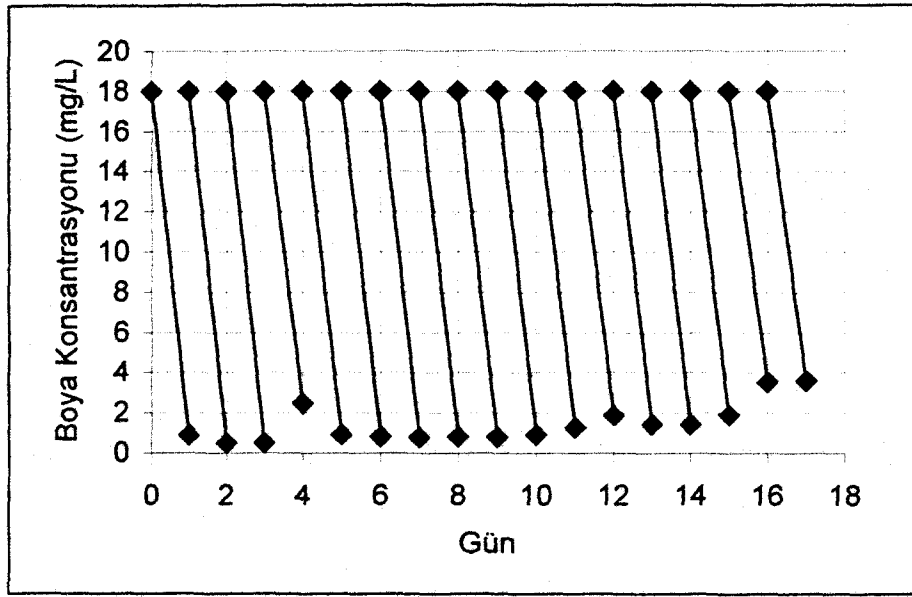
Çalkalamalı şartlarda *F. trogii*'nin renk giderim kapasitesinin bulunabilmesi amacı ile beş farklı konsantrasyonda (18, 34, 61, 96, 125 mg/L) boyar madde kullanılmıştır. Çalışmada kontrol grubu olarak fungus içermeyen 18 mg/L boyar madde içeren ortam kullanılmış ve boyar madde analizleri 24 saat aralıklarla yapılmıştır. Ortamlara boyar madde önceki boyar madde ilavesini takip eden 24.

saatin sonunda ortamlarda yaklaşık % 90'nun üzerinde renk giderimi saptandığında ilave edilmiştir.

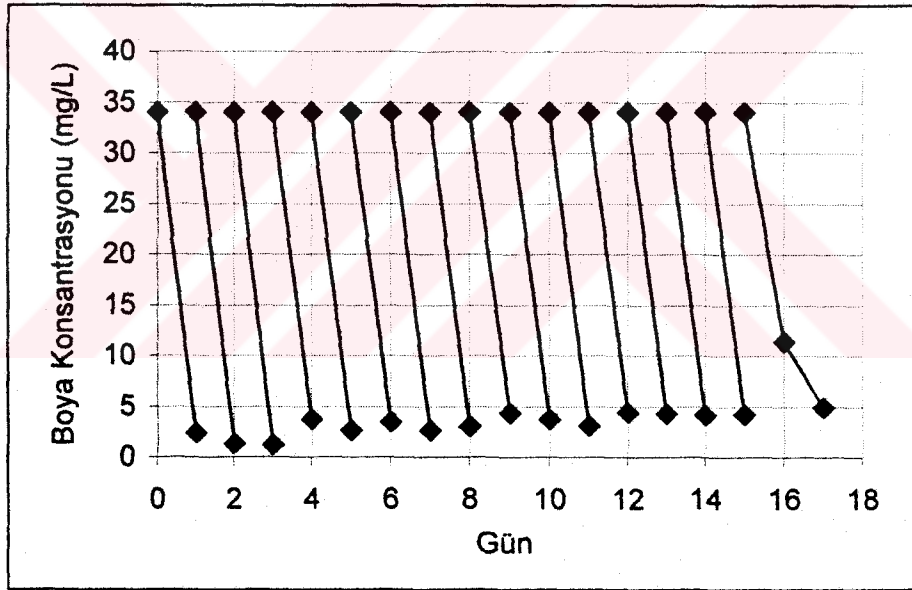
Boyar madde eklendikten sonra kontrol grubunda boyar maddenin life adsorbe olduğu saptanmıştır. Ancak *F. trogii*'nin aşılandığı lif içeren ortamda adsorbe olan boyar maddenin 24 saat sonunda giderildiği saptanmıştır. Bu nedenle boyar maddenin lif üzerine adsorpsiyonu renk gideriminde önemli bulunmamıştır. Life tutuklanmış *F. trogii*'nin farklı konsantrasyondaki boyar maddeleri etkili şekilde giderdiği saptanmıştır. 18, 34, 61 mg/L olacak şekilde boyar madde eklenen ortamlarda 24 saat sonunda sırası ile % 99, % 98 ve % 93; 96 ve 125 mg/L olacak şekilde boyar madde eklenen ortamlarda 48 saatin sonunda % 88 ve % 97 oranında giderildiği saptanmıştır.

18 mg/L olacak şekilde boyar madde eklenen ortamda boyar maddenin rengi 17 günlük inkübasyon süresi sonuna kadar etkili şekilde giderilmiştir (Şekil 4.41). İlk boyar madde eklenmesini takip eden 24 saatte rengin % 94,90'ının giderildiği saptanmıştır. Ardından ortama 16 defa daha boyar madde eklenmiş ve inkübasyon sonuna kadar yüklenen 306,00 mg/L boyar maddenin 302,40 mg/L'si giderilmiştir.

34 mg/L olacak şekilde boyar madde eklenen ortamda renk 17 günlük inkübasyon süresi sonuna kadar etkili şekilde giderilmiştir (Şekil 4.42). Inkübasyon sonuna kadar toplam 578,00 mg/L boyar madde yüklemesi yapılmış ve inkübasyon sonunda 539,07 mg/L'sinin rengi giderilmiştir. İlk boyar madde eklemesinden sonra ortama 14 defa daha aynı konsantrasyonda boyar madde eklenmiştir. 14. günün sonuna kadar ortalama % 90,47'lik renk giderimi sağlanmıştır. 15. günde ortama eklenen boyar maddenin 24 saat sonunda % 38,40'ının, 48 saatte ise % 92,57'sinin giderildiği saptanmıştır.



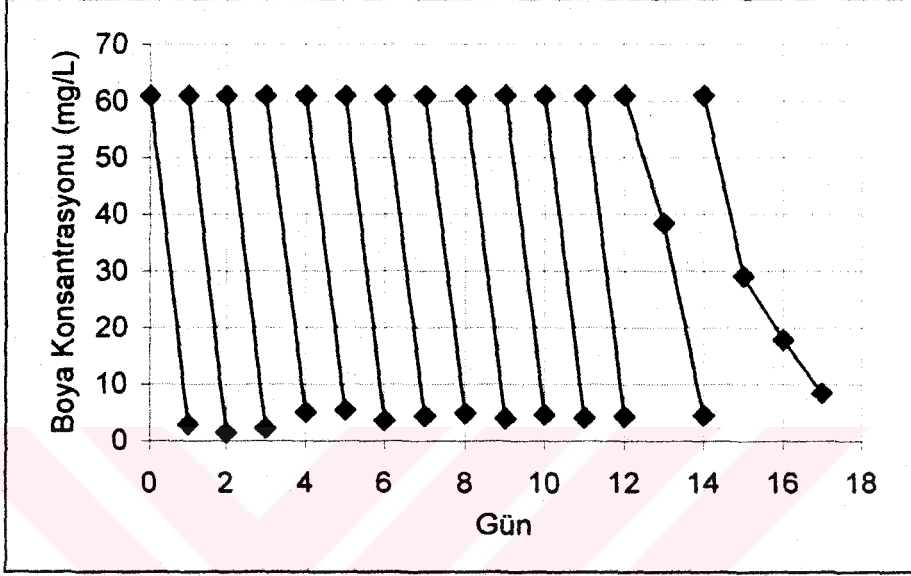
**Şekil 4.41.** Reaktif black 5'in 18 mg/L konsantrasyonda *F. trogii* ile renk giderimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı).



**Şekil 4.42.** Reaktif black 5'in 34 mg/L konsantrasyonda *F. trogii* ile renk giderimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı).

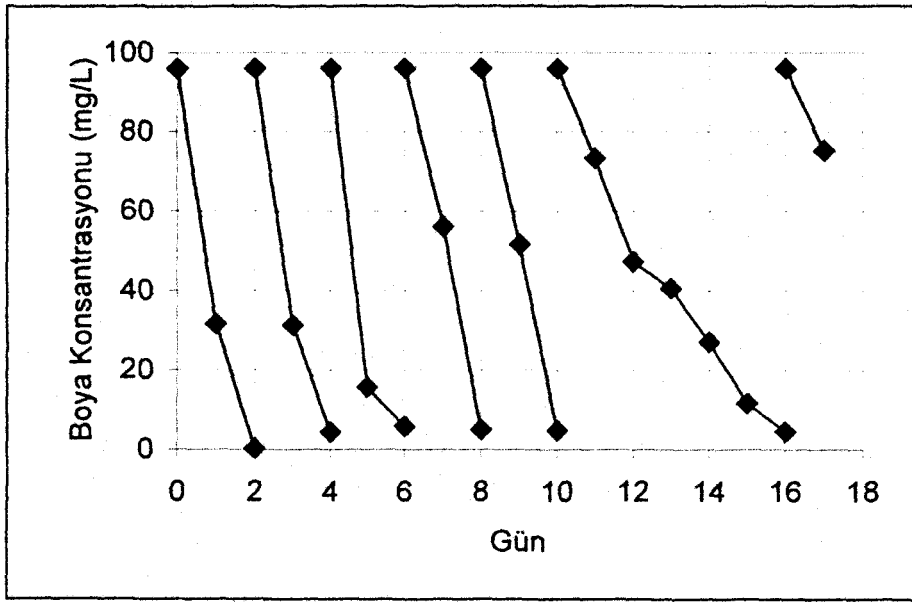
61 mg/L olacak şekilde boyar madde eklenen ortamda boyar maddenin rengi 17 günlük inkübasyon süresi sonuna kadar etkili şekilde giderilmiştir (Şekil 4.43). İlk boyar madde ilavesinden sonra ortama eklenen boyar maddenin renginin % 95 oranında giderildiği saptanmış ve fungus aynı konsantrasyonda boyar madde eklenerek 13 defa daha kullanılmıştır. Çalışmada inkübasyon sonuna kadar toplam

854 mg/L boyar madde yüklemesi yapılmış inkübasyon sonunda 846,27 mg/L boyar maddenin renginin giderildiği saptanmıştır. 11. günün sonuna kadar ortalama % 93,60'lık giderim sağlanmıştır. İnkübasyonun 12. gününde ortama eklenen boyar maddenin renginin 48 saatte % 92,57'sinin giderildiği, 14. gününde ortama eklenen boyar maddenin renginin 72 saate ancak % 80,07'sinin giderildiği saptanmıştır.



Şekil 4.43. Reaktif black 5'in 61 mg/L konsantrasyonda *F. troglia* ile renk giderimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı).

96 mg/L olacak şekilde boyar madde eklenen ortamda boyar maddenin rengi 48 saatte etkili şekilde giderilmiştir. 48 saat sonunda ortama 6 defa daha aynı konsantrasyonda boyar madde eklenmiştir (Şekil 4.44). İnkübasyonun 10. gününde ortama eklenen boyar maddenin renginin 6 gün sonra ancak % 95'inin giderildiği saptanmıştır. Çalışmada inkübasyon sonuna kadar toplam 672 mg/L boyar madde yüklemesi yapılmış ve 592,20 mg/L boyar maddenin rengi giderilmiş ve 10. günün sonuna kadar ortalama % 95,77'lik renk giderimi sağlanmıştır. İnkübasyonun 10. gününde ortama eklenen 61 mg/L boyar maddenin renginin 6 gün sonra % 95,35'i giderilmiştir. Lif bu konsantrasyonda boyar madde içeren ortamda 9. günden sonra parçalanmaya başlamıştır.

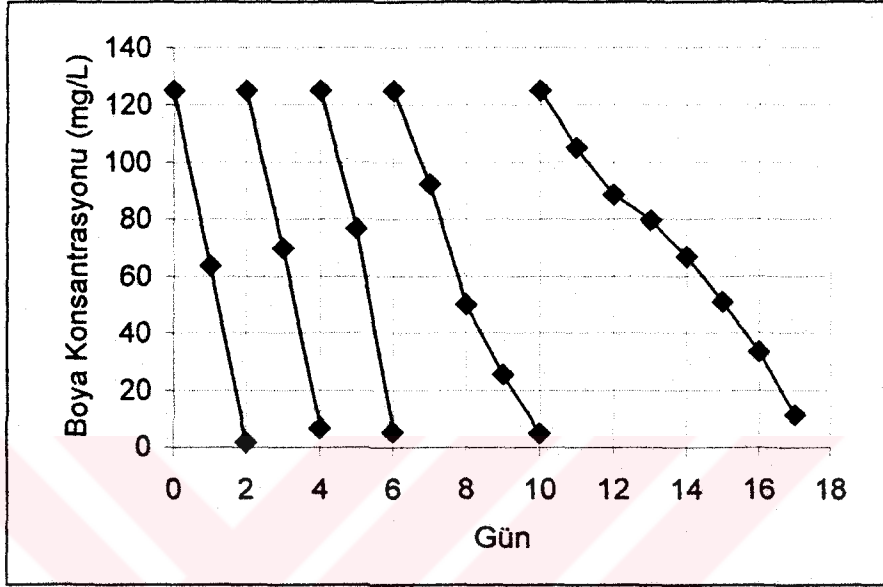


**Şekil 4.44.** Reaktif black 5'in 96 mg/L konsantrasyonda *F. troglia* ile renk giderimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı).

125 mg/L olacak şekilde boyar madde eklenen ortamda boyar maddenin rengi 48 saatte etkili şekilde giderilmiştir (Şekil 4.45). İnkübasyonun 6. gününde ortama eklenen boyar maddenin renginin 96 saat sonunda (4 gün) % 96'sının giderildiği, 10. gününde ortama eklenen boyar maddenin renginin 144 saat sonunda % 90,80'inin giderildiği saptanmıştır. Çalışmada inkübasyon sonuna kadar toplam 625 mg boyar madde yüklemesi yapılmış ve 608,23 mg/L boyar maddenin rengi giderilebilmiştir. 125 mg/L boyar madde yüklemesi yapılan ortamda fungus 4 defa kullanılmıştır. 96 mg/L boyar madde çalışmasında olduğu gibi lifin 9. günden sonra parçalanmaya başladığı gözlenmiştir.

Çalışılan ortamlarda (96 ve 125 mg/L) lifin fungal faaliyetlerin bir sonucu olarak 96 mg/L konsantrasyonda 10 günde, 125 mg/L konsantrasyonda ise 6 gününde parçalanmaya başladığı gözlenmiştir. Çalkalamalı koşulların parçalanma üzerine etkisinin olmadığı diğer konsantrasyonlarda lifte parçalanmanın meydana gelmemesiyle açıklanabilmektedir. Bu sonuç parçalanmanın fungal faaliyetin bir sonucu olarak meydana geldiğini göstermektedir. Çalışılan diğer konsantrasyonlarda parçalanmanın meydana gelmemesi ve boyar madde konsantrasyonunun artması ile lifin daha erken parçalanmaya başlaması eklenen başlangıç boyar madde

konsantrasyonunun 2,9:1,4 oranda (%) selüloz:lignin içeriğine sahip lifin [191] fungus tarafından parçalanmasını (selülozunu kullanmasını) aktive etmiş olabileceği fikrini vermektedir. Ayrıca her iki konsantrasyonda da boyar madde giderim hızının lifin parçalanmaya başladığı günlerde azalması fungusun lifi karbon ve enerji kaynağı olarak kullanmaya başladığını gösteren önemli bir bulgudur.



Şekil 4.45. Reaktif black 5'in 125 mg/L konsantrasyonda *F. trogii* ile renk giderimi (30 °C; pH 4,78; 150 rpm çalkalama hızı).

Farklı boyar madde yüklemelerinin yapıldığı ortamlarda inkübasyon sonunda (17 gün) 302–845 mg/L boyar maddenin rengi yaklaşık % 88-99 oranında giderilmiştir. Renk giderimleri birbirlerine yakın olmasına rağmen en fazla boyar maddenin rengi 61 mg/L konsantrasyonda boyar madde eklenen ortamlarda saptanmıştır.

Başlangıç boyar madde konsantrasyonunun 61 mg/L olduğu ortamlarda 24 saatte yaklaşık % 98'inin, 96 mg/L olduğu ortamlarda yaklaşık % 60'ının renginin giderildiği saptanmıştır. Benzer sonuç 125 mg/L konsantrasyonda çalışılan ortamlarda da bulunmuş ve 24 saat sonunda yaklaşık % 50 renk giderimi sağlanmıştır. Bu sonuçlar life tutuklanmış *F. trogii*'nin (yaklaşık 2,340 g/L kuru misel, 30 °C, pH 4.78, 150 rpm çalkalama hızı) yaklaşık 60 mg/L boyar maddenin

rengini 24 saatte giderebildiğini göstermektedir. Fungus çalışma boyunca 18 mg/L konsantrasyonda 17, 34 mg/L konsantrasyonda 15, 61 mg/L konsantrasyonda 13, 96 mg/L konsantrasyonda 6 ve 125 mg/L konsantrasyonda 4 defa kullanılmıştır (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1.** Farklı boyar madde konsantrasyonlarında ortamlara eklenen ve rengi giderilen toplam boyar madde konsantrasyonu (mg/L)

Co (mg/L)	Yüklenen (mg/L)	Giderilen (mg/L)
18,0	306,0	302,40
34,0	578,0	539,07
61,0	854,0	846,27
96,0	672,0	592,20
125,0	625,0	608,23

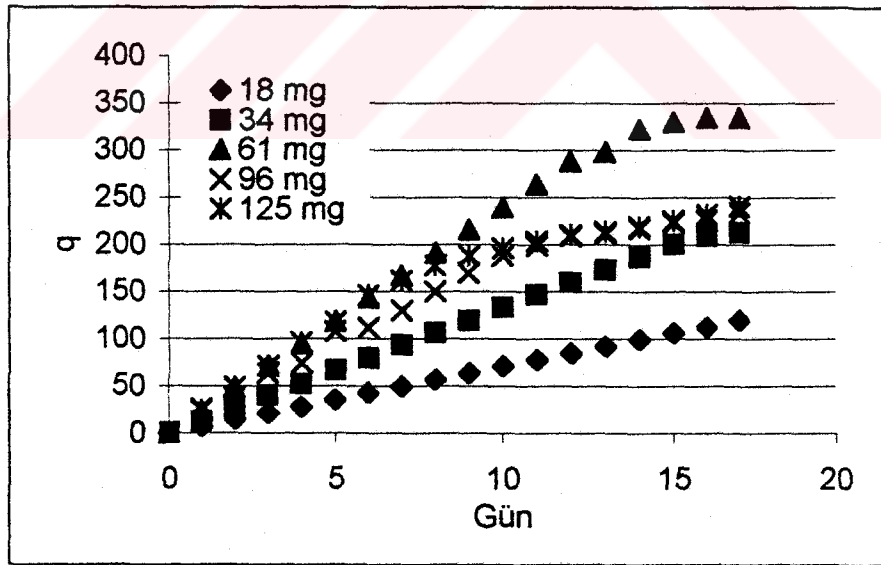
Statik koşullarda gerçekleştirilen çalışmalarda ortama eklenen 109,0 mg/L konsantrasyonda boyar maddenin 9 günlük inkübasyon periyodu sonunda yaklaşık 77,0 mg/L'sinin rengi giderilmiştir. Çalkalamalı koşullarda aynı sürede yaklaşık 480 mg/L, toplamda 846 mg/L (17 günlük inkübasyon) konsantrasyonda boyar maddenin rengi giderilmiştir. Bu sonuç çalkalamalı şartlarda tutuklanmış kültürlerin daha başarılı olduğunu göstermektedir. Benzer tutuklama materyalinin kullanıldığı bir çalışmada *Aspergillus niger*'den polimetilgalakturonaz enzim üretiminin serbest hücrelere oranla 10 kat fazla sentez edildiği rapor edilmiştir [190]. Maximo ve ark. [151] *Geotrichum* türü fungus ile Reaktif black 5, Reaktif red 158 ve Reaktif yellow 27'nin (100 mg/L) renk giderimi çalışmasında Reaktif black 5'in 10 günlük, Reaktif red 158 ve Reaktif yellow 27'nin 20 günlük inkübasyon periyodu sonunda giderildiğini rapor etmişlerdir. Çalışmada 120 rpm çalkalama hızında yaklaşık 2,0 g/L konsantrasyona kadar artan kuru misel ağırlığı reaktif black 5'in 200 mg/L konsantrasyonunun rengini yaklaşık 6 günde giderebilmiştir [151]. Buna karşılık *F. trogii* ile yağ fabrikası atık sularında renk, KOİ ve fenol gideriminde statik ve çalkalamalı koşulların benzer sonuçlar verdiği bildirilmiştir [80].



#### 4.3.9. Kinetik Çalışmalar

Çalışma sonucunda farklı konsantrasyonlarda boyar maddelerin renginin life tutuklanmış funguslar tarafından etkili şekilde giderildiği bulunmuştur. Ortamlara 24 saat aralıklarla eklenen boyar maddelerin 15, 18, 34, 61 mg /L konsantrasyonlarının 24 saatte, 96, 125 mg/L konsantrasyonlarının 48 saatte giderildiği bulunmuştur. Çalışmada inkübasyon sonuna kadar 18, 34, 61, 96, 125 mg /L konsantrasyonda boyar madde yüklemesi yapılan ortamlarda sırası ile toplam 302,40; 539,07; 846,27; 592,20; 608,63 mg /L konsantrasyonda boyar maddenin rengi giderilmiştir.

Farklı konsantrasyonlara ait renk giderim çalışmalarında kuru misel ağırlığı başına (q) renk giderim verimleri hesaplanmıştır. Grafikten 18 ve 34 mg/L konsantrasyonlarda yapılan çalışmalarda giderimin çalışma sonuna kadar doğrusal olarak arttığı, bu doğrusal artışın 61 mg/L konsantrasyonlarda 12, lifin parçalanmasından dolayı 96 mg/L konsantrasyonlarda 9 ve 125 mg/L konsantrasyonlarda ise 5 gün sürdüğü saptanmıştır (Şekil 4.46).



Şekil 4.46. Başlangıç boyar madde konsantrasyonuna göre renk giderim kinetiğinin değişimi

Çalışmada 18, 34, 61, 96, 125 mg/L boyar madde yüklemesi yapılan ortamlarda birim kuru hücre başına giderilen boyar maddenin (q) sırası ile 111, 203, 314, 226, 235 olduğu bulunmuş ve en yüksek giderim başlangıç boyar madde konsantrasyonu 61 mg /L olan ortamlarda saptanmıştır. *Aspergillus niger* ile yapılan renk giderimi çalışmasında, 50 mg/L başlangıç konsantrasyonuna sahip Basic Blue 9 ve Acid Blue 29 içeren ortamlarda gram hücre başına sırası ile 1,17 ve 6,63 mg boyar maddenin renginin giderildiği rapor edilmiştir [81, 82]. *Tremella fuciformis* ile yapılan bir başka çalışmada Reaktif black 5 ve Reaktif Blue 19 için q değeri sırası ile 92 ve 41 mg / g hücre olarak bildirilmiştir [86].

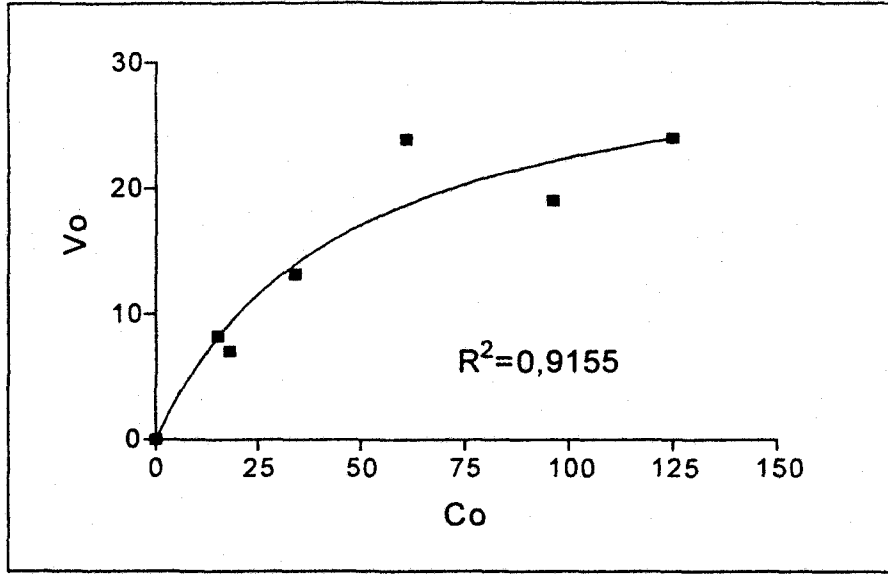
Farklı boyar madde eklemesi yapılan ortamların renk giderimlerinin doğrusal olduğu değerler ilk hızın bulunmasında kullanılmış ve ilk hızlar ( $V_0$ ) Bölüm 4.3.6'da açıklandığı gibi bulunmuştur (Çizelge 4.2). Elde edilen ilk hızlar başlangıç boyar madde konsantrasyonuna karşı grafiklendirilmiş (Şekil 4.47) ve Michaelis-Menten grafiği elde edilmiştir.

**Çizelge 4.2.** Başlangıç boyar madde konsantrasyonuna göre renk giderim ilk hızları

Boyar Madde Konsantrasyonu (mg/L)	$V_0$ (mg boyar madde/ g KM)
15	8,228
18	7,0542
34	13,168
61	23,911
96	19,036
125	24,021

Renk giderim hızının, başlangıç boyar madde konsantrasyonun 61 mg/L olduğu konsantrasyona kadar doğrusal olarak arttığı (I. dereceden), 61 mg/L konsantrasyondan sonra ise artış gözlenmediği yani sabit kaldığı (0. dereceden) saptanmıştır. Başlangıç substrat konsantrasyonun karşı ( $C_0$ ) çizilen ilk hız ( $V_0$ ) grafiğinin değerlendirilmesi Analyzing Data with GraphPad Prism (1999) ile

yapılmıştır [202]. Bu değerlendirme sonucunda Michealis-Menten eşitliği  $K_m = 45,71$  ve maksimum renk giderim hızı  $V_{max} = 32,71$  olarak bulunmuştur.



**Şekil 4.47.** *F. troglia* tarafından Reaktif Black 5'in renk gideriminde Michealis-Menten grafiği

Michealis-Menten grafiğinin  $V_{max}$  ve  $K_m$  saptanmasında başarılı olmadığı bilinmektedir. Bir seri deneyden sonra farklı substrat konsantrasyonlarında eğrinin platosu oluşmadıkça  $V_{max}$  ve bundan dolayı  $K_m$  doğru olarak elde edilemez. Bunun yerine Michaelis-Menten eşitliğinden türetilen Lineweaver-Burk eşitliği kullanılmaktadır [203]. Lineweaver-Burk'tan elde edilen grafik deneysel aşamada boyar madde derişimi doygunluk seviyesine ulaşmasa da doğrusal olabilmektedir. Bu nedenle elde edilen  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri doğrulukla hesaplanabilmektedir.

Çalışmada Michaelis-Menten grafiğinin çıkarılmasında kullanılan başlangıç boyar madde konsantrasyonlarının ve bu konsantrasyonlara ait ilk hız değerlerinin  $1/C_0$ 'a karşı  $1/V_0$  grafiği çizilerek Lineweaver-Burk grafiği elde edilmiştir (Şekil 4.48). Grafikten

$$y = a \cdot x + c \quad (1)$$

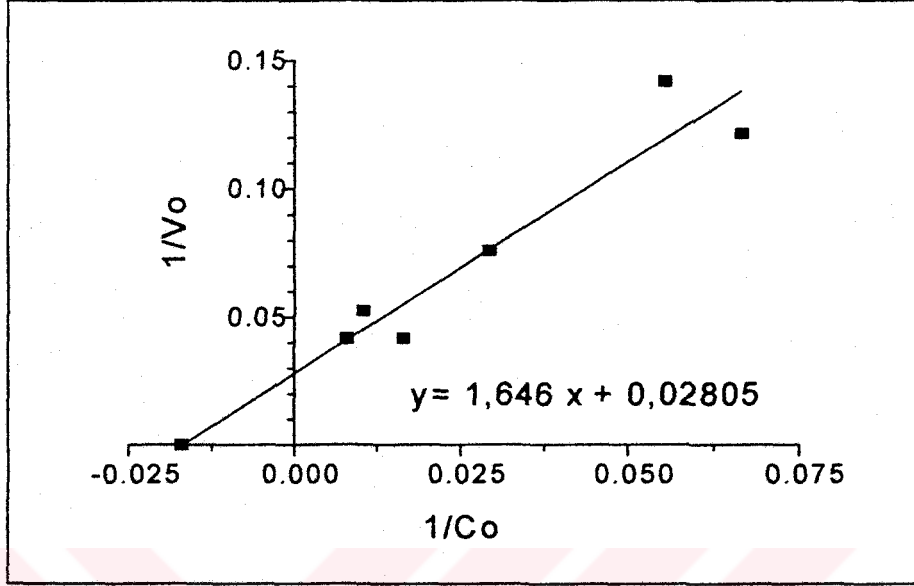
şeklinde formül elde edilmiştir. Bu formülde eğim  $m$  ( $K_m/V_{max}$ ),  $y$  eksenini kesim noktası ise  $c$  ( $1/V_{max}$ )'dir. Buna göre formül tekrar düzenlendiğinde

$$1/V_0 = K_m / V_{max} \cdot 1 / C_0 + 1 / V_{max} \quad (2)$$

elde edilir. Bu eşitlikten

$$1/V_{\max} = 1/0.002805 \Rightarrow V_{\max} = 35,65 \text{ olarak,}$$

$$K_m/V_{\max} = 1,646 \Rightarrow K_m = 58,68 \text{ olarak hesaplanmıştır.}$$



**Şekil 4.48.** *F. trogii* tarafından Reaktif Black 5'in renk gideriminde Lineweaver-Burk grafiği

Xin-jiao ve ark. [126] tarafından, *Aspergillus ficuum* tarafından Direck Black 22'nin renk giderim çalışmasında da rapor edilmiştir. Çalışmada Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk eşitliklerine ait  $V_{\max}$  (mg boyar madde / g kuru misel. gün) ve  $K_m$  (mg boyar madde / L) değerleri sırası ile 22,55-146,03 ve 24,03-173,12 olarak bulunmuş ve sonuçta birbirine yakın olan bu değerlerin birinci dereceden tersinmez bir işlemi ifade ettiği bildirilmiştir. Bu çalışmada elde edilen iki kinetik değerlendirmeye ait  $V_{\max}$  ve  $K_m$  değerleri karşılaştırıldığında (Çizelge 4.3) değerlerin birbirine yakın olduğu ve bu benzer sonuçların reaktif black 5'in renk gideriminde birinci dereceden olduğunu göstermektedir.

**Çizelge 4.3.** Kinetik değerlendirme ve sonuçlar

<i>F. trogii</i>	Vo-Co grafiğinden		1/Vo-1/Co grafiğinden	
	$V_{\max}$	$K_m$	$V_{\max}$	$K_m$
	32,71	45,71	35,65	58,68

Polmann ve ark. [86], yaptıkları renk giderimi çalışmasında, Reaktif Black 5'in *Candida rugosa*'nın gram hücresi başına 31 mg, *Tremella fuciformis*'in gram hücresi başına 92 mg'ının giderildiğini rapor etmişlerdir. Reaktif black 5 ile yapılan bir başka çalışmada *Phanerochaete chrysosporium*'dan elde edilen ligninaz enziminin renk giderimi üzerine etkinliği araştırılmıştır [8]. Çalışma sonucunda 40-50 mg /L konsantrasyonda boyar maddenin 9 gün sonunda % 11,3'ünün giderildiği bildirilmiştir. Bu çalışmada Reaktif Black 5'in *F. trogii*'nin gram hücresi başına en yüksek 334,38 mg'ının (17 günlük inkübasyon) giderildiği saptanmıştır. Bu sonuç *F.trogii*'nin renk gideriminde literatürlerde rapor edilen mikroorganizmalardan daha etkili olduğunu ortaya koymaktadır.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada Türkiye’de tekstil fabrikalarında en çok kullanılan boyar madde Reactive Black 5 (Remazol Black B)’nin bir beyaz çürükçül fungus türü olan *Funalia trogii* tarafından renk giderimi araştırılmıştır. Çalışmada; *F. trogii*’nin renk giderimindeki fizyolojik parametrelerinin belirlenmesi amacıyla statik koşullarda farklı pH (4,78; 5,00; 5,50; 6,00), sıcaklık (20, 25, 30 35 °C), karbon kaynağı (glikoz, sükroz, nişasta), azot kaynağı (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, Üre) ve azot kaynağı konsantrasyonları (0,50, 2,55, 5,11, 17,40 mM) araştırılmıştır. Ayrıca statik kültürle ve *Luffa cylindrica*’ya tutuklanmış kültürlerin çalkalamalı koşullarda renk giderim kapasitesi incelenmiştir.

Statik koşullarda yapılan optimizasyon çalışmasında renk giderimi için en uygun pH’nın pH 4,78 ve sıcaklığın 30 °C olduğu saptanmıştır.

Farklı karbon ve azot kaynaklarının renk giderimi üzerine etkisinin incelendiği çalışmada, karbon ve azot kaynağı konsantrasyonunun artması ile renk gideriminin azaldığı saptanmış ve glikoz-amonyumdihidrojen fosfat içeren ortamların diğer karbon ve azot kaynağı eklenen ortamlardan daha etkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca çalışmada kontrol grubu olarak kullanılan, karbon ve azot kaynağı eklenmemiş ortamların renk gideriminde oldukça etkili oldukları ve renk gideriminin ortama karbon ve azot kaynağı eklemesi yapılmaksızın gerçekleştiği bulunmuştur.

Statik *Funalia trogii* kültürleri ile yapılan çalışmada ortamda boyar madde konsantrasyonunun artması ile fungus gelişiminin yavaşladığı, fungusun daha kısa sürede sekonder metabolik faza girdiği saptanmıştır. Kuru misel ağırlığının boyar madde içermeyen kontrol grubunda daha yüksek olmasından dolayı Reaktif Black 5’in toksik etkili olduğunu sonucuna varılmıştır.

Çalkalamalı koşullarda life tutuklanmış fungusun misel yaşının renk gideriminde önemli bir faktör olduğu ve 3 günlük misel yaşına sahip fungusların

renk gideriminde daha etkili olduğu saptanmıştır. Statik koşullarda 9 günlük inkübasyon süresi sonunda yaklaşık 77 mg/L konsantrasyonda boyar maddenin rengi giderilirken, life tutuklanmış fungusun aynı sürede yaklaşık 480 mg/L boyar maddenin rengini giderdiği bulunmuştur. Bunun yanında yapılan kinetik değerlendirmede fungusun boyar maddeye olan afinitesi ( $K_m$ ) 58,68 mg boyar madde / L olarak ve maksimum renk giderim hızı ( $V_{max}$ ) 35,65 mg boyar madde / L.gün olarak bulunmuştur.

Bu araştırmada ilk defa tutuklama materyali olarak *Luffa cylinrica*'nın beyaz çürükçül funguslarla renk giderim çalışmalarında kullanılabilir uygun bir materyal olduğu gösterilmiştir. Lif içeren ortamlarda renk gideriminin karbon ve azot kaynağı eklenmeksizin gerçekleşmesi ve materyalin renk giderim çalışmalarında tekrar tekrar kullanılabilmesi renk giderim maliyetini azaltacağı için önemli bulunmuştur. Ayrıca işlem sonrası bitkisel bir materyal olan lifin doğada kolayca parçalanabilir olması evre açısından uygun ve değerli bir tutuklama materyali olduğu sonucunu ortaya koymaktadır.

Tekstil veya boya üreten fabrikaların ürettikleri ve/veya kullandıkları boyar maddelerin çeşitli türde ve sayıda olması nedeniyle belirlenen bu parametrelerde farklı yapı ve türde boyar maddenin *Funalia trogii* ile renk giderimi çalışmaları yapılması önerilmektedir. Tutuklama materyali olarak kullanılan *Luffa cylindrica*'nın daha uzun sreler kullanılabilmesi için dayanıklılığını arttırıcı çalışmalar yapılabilir.

Çalışmada renk gideriminin özellikle karbon ve azot kaynağı eklenmeksizin gerçekleşmesi işlemin maliyetini azaltacağı için önemli bulunmuştur. *F. trogii*'nin boyar maddelerin renk giderimi üzerine sürekli sistemlerin denenmesi, sürekli sistemdeki renk giderim yeteneğinin ortaya çıkarılması ile teknolojik olarak kullanılabilirliliğinin ortaya konulması gerekmektedir. Bu Şekilde beyaz çürükçül funguslardan *F. trogii*'nin arıtım sistemlerinde kullanılabilirliliği ortaya çıkarılmış olacaktır.

## KAYNAKLAR

- [ 1 ] Zollinger, H. "Color Chemistry", VCH, Weinheim, Germany, 496 s., (1991).
- [ 2 ] Shreve, R.N. and Brink, J.A. "Chemical Process Industries", McGraw-Hill Book Company, 867s., (1977).
- [ 3 ] Başer, İ. and İnanıcı, Y. "Boyarmadde Kimyası", Marmara Üniv.Teknik Eğitim Fak.Yayın No: 2, İstanbul, s.47-52, 103-115, (1990).
- [ 4 ] Al-Degs, Y., Khraisheh, M.A.M., Allen, S.J. and Ahmad, M.N. "Effect of Carbon Surface Chemistry on the Removal of Reactive Dyes from Textile Effluent" *Wat. Res.*, **34(3)**: 927-935, (2000).
- [ 5 ] Özcan, Y. "Tekstil Elyaf ve Boyama Tekniği", İstanbul Üniv. Yayın No:2557, s.311-335, (1978).
- [ 6 ] Spadaro, J.T. and Renganathan, V. "Peroxidase-Catalyzed Oxidation of Azo Dyes: Mechanism of Disperse Yellow 3 Degradation", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **312(1)**: 301-307, (1994).
- [ 7 ] Rodriguez, E., Pickard, M.A. and Duhalt, R.V. "Industrial Dye Decolorization by Laccases from Ligninolytic Fungi", *Current Microbiology*, **38**:27-32, (1999).
- [ 8 ] Young, L. and Yu, J. "Ligninase-Catalysed Decolorization of Synthetic Dyes", *Wat.Res.*, **31(5)**: 1187-1193, (1997).
- [ 9 ] Wong, Y., Yu, J. "Laccase-Catalyzed Decolorization of Synthetic Dyes", *Wat.Res.*, **33(16)**: 3512-3520, (1999).
- [ 10 ] Banat, I.M., Nigam, P., Singh, D. and Marchant, R. "Microbial Decolorization of Textile-Dye-Containing Effluents: A Review", *Bioresource Technology*, **58**:217-227, (1996).
- [ 11 ] Slokar, Y.M. and Le Marechal, A.M., "Methods of decoloration of textile wastewaters", *Dyes Pigments* **37**: 335-356, (1997).
- [ 12 ] Pak, D., Chang, W., "Decolorizing dye wastewater with low temperature catalytic oxidation", *Water Sci. Technol.*, **40**: 115-121, (1999).
- [ 13 ] Raghavacharya, C., "Colour removal from industrial effluents - a



- comparative review of available technologies”, Chem. Eng. World **32**: 53-54, (1997).
- [ 14 ] Balcioglu, I.A., Arslan, I. and Sacan, M.T., “Homogenous and heterogenous advanced oxidation of two commercial reactive dyes”, Environmental Technology, **22**: 813-822, (2001).
- [ 15 ] Kaptan, D., Pagano, S.M. and Tunay, O., “Tekstil endüstrisi atık sularında fenton prosesi ile renk giderimi”. 8. Endüstriyel Kirlenme Kontrolü Sempozyumu, 18-20 Eylül, 205-212, (2002).
- [ 16 ] Verma, P., Baldrian, P. and Nerud, F., “Decolorization of Structurally Different Synthetic Dyes using Cobalt (II)/Ascorbic Acid/Hydrogen Peroxide System”, Chemosphere, **50**: 975-979, (2003).
- [ 17 ] Lin, S.H. and Lin, C.M., “Treatment of textile waste effluents by ozonation and chemical coagulation”. Water Res. **27**: 1743-1748, (1993).
- [ 18 ] Xu, Y. and Lebrun, R.E., “Treatment of textile dye plant effluent by nanofiltration membrane”, Separ. Sci. Technol. **34**: 2501-2519, (1999).
- [ 19 ] Ince, N.H. and Gonenç, D.T., “Treatability of a textile azo dye by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>”. Environ. Technol. **18**: 179-185, (1997).
- [ 20 ] Gahr, F., Hermanutz, F. and Opperman, W., “Ozonation an important technique to comply with new German law for textile wastewater treatment”, Water Sci. Technol. **30**: 255-263, (1994).
- [ 21 ] Peralto-Zamora, P., Kunz, A., Gomez de Morales, S., Pelegrini, R., de Capos Moleiro, P., Reyes, J. and Duran, N., “Degradation of reactive dyes I. A comparative study of ozonation, enzymatic and photochemical processes”, Chemosphere **38**: 835-852, (1999).
- [ 22 ] Groff, K.A. and Byung, R.K., “Textile wastes”, J.WPCF **6**: 872-876, (1989).
- [ 23 ] Lopez, A., Ricco, G., Ciannarella, R., Rozzi, A., Di Pinto, A.C. and Possino, R., “Textile wastewater reuse: ozonation of membrane concentrated secondary effluent”. Water Sci. Technol. **40**: 99-105, (1999).
- [ 24 ] Ölmez, T., Kabdaşlı, I. and Tunay, O., “Tekstil endüstrisi reaktif boya

- banyolarında ozon ile renk giderimine etki eden faktörlerin belirlenmesi". 8. Endüstriyel Kirlenme Kontrolü Sempozyumu, 18-20 Eylül, 191-197, (2002).
- [ 25 ] Yang, Y., Wyatt, D.T. and Bahorsky, M., "Decolorization of dyes using UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> photochemical oxidation", *Text.Chem.Color.* **30**:27-35, (1998).
- [ 26 ] Ogutveren, U.B. and Kaparal, S., "Colour removal from textile effluents by electrochemical destruction", *J. Environ. Sci. Health* **29**: 1-16, (1994).
- [ 27 ] Pelegrini, R., Peralto-Zamora, P., de Andrade, A.R., Reyers, J. and Duran, N., "Electrochemically Assisted Photocatalytic Degradation of Reactive Dyes", *App. Catal. B-Environ.* **22**: 83-90, (1999).
- [ 28 ] Choy, K.K.H., McKay, G. and Porter, J.F., "Sorption of Acid Dyes from Effluents using Activated Carbon", *Resour. Conserv. Recy.* **27**:57-71, (1999).
- [ 29 ] Kumar, M.N., Sridhari, T.R., Bhavani, K.D. and Dutta, P.K., "Trends in Color Removal from Textile Mill Effluents", *Colorage* **40**:25-34. (1998).
- [ 30 ] Chiou, M.S. and Li, H.Y., Adsorption behavior of Reactive Dye in Aqueous Solution on Chemical Cross-linked chitosan Beads, *Chemosphere*, **50**:1095-1105, (2003).
- [ 31 ] 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).
- [ 32 ] Nasser, N.M. and El-Geundi, M., "Comparative Cost of Colour Removal from Textile Effluents Using Natural Adsorbents", *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **50**:257-264, (1991).
- [ 33 ] Rao, K.L., Krishnaiah, L.N. and Ashutush, K., "Colour Removal from a Dyestuff Industry Effluent Using Activated Carbon", *Indian J. Chem. Technol.*, **1**:13-19, (1994).
- [ 34 ] Al-Degs Y., Khraisheh MA, Allen S.J. and Ahmad MN., "Effect of Carbon Surface Chemistry on the Removal of Reactive Dyes from

- Textile Effluent", *Water Res.*, **34**:927-35, (2000).
- [ 35 ] Nigam, P., Armour, G., Banat, I.M., Singh, D. and Marchant, R. "Physical Removal of Textile Dyes from Effluents and Solid-State Fermentation of Dye-Adsorbed Agricultural Residues", *Bioresource Technology*, **72**: 219-226, (2000).
- [ 36 ] Poots, V.J.P. and McKay, J.J., "The Removal of Acid Dye from Effluent Using Natural Adsorbents II Wood", *Water Res.* **10**: 1067-1070, (1976).
- [ 37 ] Robinson, T., Chandran, B. and Nigam, P., "Studies on the Production of Enzymes by White-Rot Fungi for the Decolourisation of Textile Dyes", *Enzyme and Microbial Technology* **29**: 575-579, (2001).
- [ 38 ] Gupta, G. S., Prasad, G. and Singh, V. N., "Removal of Chrome Dye from Aqueous Solutions by Mixed Adsorbents: Fly Ash and Coal", *Wat. Res.*, **24(1)**: 45-50, (1990).
- [ 39 ] Misra, G. and Tripathy, M., "A Critical Review of the Treatments for Decolourization of Textile Effluent", *Colourage*, **40**: 35-38, (1993).
- [ 40 ] Lopez, C., Mielgo, I., Moreira, M.T., Feijoo, G. and Lema J.M., "Enzymatic Membrane Reactors for Biodegradation of Recalcitrant Compounds. Application to Dye Decolourisation" *Journal of Biotechnology*, **99**: 249-257, (2002).
- [ 41 ] Ckhakraborty, S., Purkait, M.K., DasGupta, S., De, S. and Basu, J.K., "Nanofiltration of Textile Plant Effluent for Color Removal and Reduction in COD", *Separat. and Purific. Tech.*, **AIP00**: 1-11, (2002).
- [ 42 ] Hosono, M., Arai, M., Yamamoto, I., Shimizu, K. and Sugiyama, M., "Decoloration and Degradation of Azo Dye in Aqueous Solution of Super Saturated with Oxygen by Irradiation of High-Energy Electron Beams", *Appl. Rad. Iso.*, **44**: 1199-1203, (1993).
- [ 43 ] Knapp, J.S. and Newby, P.S., "The Microbiological Decolorization of an Industrial Effluent Containing a Diazo-linked Chromophore", *Water Res.*, **29**: 1807-1809, (1995).
- [ 44 ] Nigam, P. and Marchant, R., "Selection of the Substratum for Composing Biofilm System of Textile Decolourizing Bacteria",

- Biotechnol. Lett., 17: 993-996, (1995).
- [ 45 ] Nigam, P., Banat, I.M., Singh, D. and Marchant, R., "Microbial Process for the Decoloration of Textile Effluent Containing Azo, Diazo and Reactive Dyes", Proc Biochem., 31: 435-442, (1996).
- [ 46 ] Ogawa, T. and Yatome, C., "Biodegradation of Azo Dyes in Multistage Rotating Biological Contactor Immobilized by Assimilating Bacteria", Bull. Environ. Contam. Toxicol., 44: 561-566, (1990).
- [ 47 ] Manning, B.W., Cerniglia, C.E. and Federle, T.W., "Metabolism of the benzidine-based azo dye Direct Black 38 by human intestinal mikrobiota", Appl. Environ. Microbiol., 1: 10-15, (1985).
- [ 48 ] Medvedev, Z.A., Crowne, H.M. and Medvedeva-M-N., "Age related variations of hepatocarcinogenic effect of azo dye (3'-MDAB) as linked to the level of hepatocyte polyploidization", Mech-Ageing-Dev. Dec. 46 (1-3): 159-174, (1988).
- [ 49 ] Percy, A.J., Moore, N. and Chipman, J.K., "Formation of Nuclear Anomalies in Rat Intestine by Benzidine and Its Biliary Metabolites", Toxicology, 57:217-223, (1989).
- [ 50 ] Haugh, W., Schmidt, A., Nörtemann, B., Hempel, D.C., Stolz, A. and Knackmuss, H.J. "Mineralization of the Sulfonated Azo Dye Mordant Yellow 3 by 6-Aminonaphthalene-2-Sulfonate-Degrading Bacterial Consortium", Applied and Environmental Microbiology, Nov., 57: (11) 3144-3149, (1991).
- [ 51 ] An, H., Qian, Y., Gu, X. and Tang, W. Z., "Biological Treatment of dye Wastewaters Using an Anaerobic-oxic System", Chemosphere, 33 (12): 2533-2542, (1996).
- [ 52 ] Tan, N. C. G., Prenafeta-Boldua, F. X., Opsteeg, J. L., Lettinga, G. and Field, J. A., "Biodegradation of Azo Dyes in Cocultures of Anaerobic Granular Sludge with Aerobic Aromatic Amine Degrading Enrichment Cultures", Appl Microbiol Biotechnol., 51: 865-871, (1999).
- [ 53 ] Zeng, L., Luo, G., Huanjing K.J., Zhongguo, K., Shengtai, H. and Yanjiu, Z.: Technology process for treatment of dyeing wastewater

- with predominant bacteria. Journal CA Section: 60 (Waste Treatment and Disposal), 7 (2): 92-96 (1999).
- [ 54 ] O'Neill, C., Hawkes, F.R., Hawkes, D.L., Lourenco, N.D., Pinheiro, H.M. and Delee, W., "Colour in Textile Effluents—sources, Measurement, Discharge Consents and Simulation: a Review", J. Chem. Technol. Biotechnol. 74: 1009-1018, (1999).
- [ 55 ] Chinwetkitvanich, S., Tuntoolvest, M. and Panswad, T. "Anaerobic Decolorization of Reactive Dyebath Effluents by a Two-Stage UASB System with Tapioca as a Co-Substrate", Wat.Res., 34 (8): 2223-2232, (2000).
- [ 56 ] Ganish, R., Boardman, G. and Michelsen, D. "Fate of Azo Dyes in Sludges", Wat.Res., 28 (6): 1367-1376, (1994).
- [ 57 ] Carliell, C.M., Barclay, S.J., Naidoo, N., Buckley, C.A., Mulholland, D.A. and Senior, E., "Microbial Decolourisation of a Reactive Azo Dye Under Anaerobic Conditions", Water SA, 21 (1): 61-69, (1995).
- [ 58 ] Keck, A., Klein, J., Kudlich, M., Stolz, A., Knackmuss, H.J. and Mattes, R., "Reduction of Azo Dyes by Redox Mediators Originating in the Naphthalenesulfonic Acid Degradation Pathway of *Sphingomonas* sp. Strain BN6", Applied and Environmental Microbiology, Sept: 3684-3690, (1997).
- [ 59 ] Razo-Flores E., Luijten M., Donlon B., Lettinga G. and Field J. "Biodegradation of Selected Azo Dyes under Methanogenic Conditions", Water Sci. Technol. 36: 65-72, (1997).
- [ 60 ] Donlon, B., Razo-Flores, E., Luijten, M., Swarts, H., Lettinga, G. and Field, J., "Detoxification and Partial Mineralization of the Azo Dye Mordant Orange 1 in a Continuous Upflow Anaerobic Sludge-Blanked Reactor", Appl. Microbiol. Biotechnol., 47: 83-90, (1997).
- [ 61 ] O'Neill, C., Lopez, A., Esteves, S., Hawkes, F.R., Hawkes, D.L. and Wilcox, S., "Azo-dye Degradation in an Anaerobic-Aerobic Treatment System Operating on Simulated Textile Effluent", Appl. Microbiol. Biotechnol., 53: 249-254, (2000).
- [ 62 ] Rajaguru, P., Kalaiselvi, K., Palanivel, M. and Subburam, V.,

- “Biodegradation of Azo Dyes in a Sequential Anaerobic-Aerobic System”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **54**: 268-273, (2000).
- [ 63 ] Chinwetkitvanich, S., Tuntoolvest, M. and Panswad, T., “Anaerobic Decolorization of Reactive Dyebath Effluents by a Two-Stage UASB System with Tapioca as a Co-Substrate” *Wat. Res.*, **34**:(8), 2223-2232, (2000).
- [ 64 ] Walker G.M. and Weatherley L.R., “Biodegradation and Biosorption of Acid Anthraquinone Dye”, *Environ. Pollut.*, **108**: 219-23, (2000).
- [ 65 ] Kapdan, I.K., Kargı, F., McMullan, G. and Marchant, R., “Effect of Environmental Conditions on Biological Decolorization of Textile Dyestuff by *C. versicolor*”, *Enzyme Microb. Technol.*, **26**: 381-387, (2000).
- [ 66 ] Panswad, T. and Luangdilok, W., “Decolorization of Reactive Dyes with Different Molecular Structures under Different Environmental Conditions”, *Water Resource*, **34**:(17) 4277-4184, (2000).
- [ 67 ] Panswad, T., Iamsamer, K. and Anotai, J., “Decolorization of Azo-Reactive Dye by Polyphosphate-and Glycogen-Accumulating Organisms in an Anaerobic-Aerobic Sequencing Batch Reactor”, *Bioresource Technology*, **76**: 151-159, (2001).
- [ 68 ] Eaton, D., Chang, H.M. and Kirk, T.K., “Fungal Decolorization of Kraft Bleach Plant Effluent”, *Tappi J.*, **63**:103-109, (1980).
- [ 69 ] Fukuzumi, T., “Microbial Decolorization and Defoaming of Pulping Waste Liquors in Lignin Biodegradation”, *Potential Applications CRC press*, **1**: 215-230, (1980).
- [ 70 ] Bilgiç, H., Gökçay, C.F. and Hasırcı, N., “Color Removal by White Rot Fungi”, *Global Environmental Biotechnology*, 211-222, (1997).
- [ 71 ] Cammarota, M.C. and Sant Anna, G.L., “Decolorization of Kraft Bleach Plant El Stage Effluent in a Fungal Bioreactor”, *Environ. Technol.* **13**:65-71, (1992).
- [ 72 ] Lankinen, V.P., Inkeroinen, M.M., Pellinen, J. and Hatakka, A.I., “The Onset of Lignin-modifying Enzymes, Decrease of AOX and Color Removal by White Rot Fungi Grown on Bleach Plant Effluents”.

Water Sci. Technol. 24:(3/4), 189-198, (1991).

- [ 73 ] Tatarko M. and Bumpus, J.A., "Biodegradation of Congo Red by *Phanerochaete chrysosporium*", Water Res., 32:1713-1717, (1998).
- [ 74 ] Olikka, P., Alhonmaki, K., Leppanen, V.M., Glumoff, T., Raijola, T. and Suominen, I., "Decolorization of Azo, Triphenyl Methane, Heterocyclic, and Polymeric Dyes by Lignin Peroxidase Isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*", Appl. Environ. Microbiol., 59:(12) 4010-4016, (1993).
- [ 75 ] Pasti-Grigsby, M.B., Paszczynski, A., Goszczynski, S., Crawford, D.L. and Crawford, R.L., "Influence of Aromatic Substitution Patterns on Azo Dye Degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*", Appl. Environ. Microbiol., 58:(11), 3605-3613, (1992).
- [ 76 ] Spadaro, J.T., Gold, M.H. and Renganathan, V., "Degradation of Azo Dyes by the Lignin-degrading Fungus *Phanerochaete chrysosporium*", Appl. Environ. Microbiol., 58:(8) 2397-2401, (1992).
- [ 77 ] Glenn, J.K. and Gold, M.H., "Decolorization of Several Polymeric Dyes by the Lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*", Appl. Environ. Microbiol., 45: 1741-1747, (1983).
- [ 78 ] Knapp J.S. and Newby P.S., "The Decolourization of a Chemical Industry Effluent by White Rot Fungi", Water Res., 33: 575-577, (1999).
- [ 79 ] Knapp J.S., Newby P.S., Reece L.P., "Decolorization of Dyes by Wood-Rotting Basidiomycete Fungi", Enzyme Microbial. Technol., 17: 664-668, (1995).
- [ 80 ] Yeşilada, O., Fiskin, K. and Yesilada, E. "The Use of White Rot Fungus *Funalia trogii* (Malatya) for the Decolourization and Phenol Removal from Olive Mill Wastewater", Environmental Technology, 16: 95-100, (1995).
- [ 81 ] Fu, Y. and Viraraghavan, T., "Publications removal of Acid Blue 29 from an aqueous solution by fungus *Aspergillus niger*", In: Nikolaidis, 31th Mid-Atlantic Industrial and Hazardous Waste Conference, USA,

- pp. 510-519. (1999).
- [ 82 ] Fu, Y. and Viraraghavan, T., "Removal of a dye from an aqueous solution by fungus *Aspergillus niger*", Water Qual. Res. J. Canada, **35** (1): 95-111, (2000).
- [ 83 ] Zhou, J.L. and Banks, C.J., "Removal of Humic Acid Fraction by *Rhizopus arrhizus*: Uptake and Kinetic Studies", Environ. Technol., **12**: 859-869, (1991).
- [ 84 ] Zhou, J.L. and Banks, C.J., "Mechanism of Humic Acid Colour Removal from Natural Waters by Fungal Biomass Biosorption", Chemosphere, **27** (4): 607-620, (1993).
- [ 85 ] Gallagher, K.A., Healy, M.G. and Allen, S.J., "Biosorption of Synthetic Dye and Metal Ions From Aqueous Effluents using Fungal Biomass", Global Environmental Biotechnology, 27-50, (1997).
- [ 86 ] Polmann, J.K. and Breckenridge, C.R., "Biomass-mediated Binding and Recovery of Textile Dyes from Waste Effluents", Textile Chemist and Colorist, **28** (4): 31-35, (1996).
- [ 87 ] Fu, Y. and Viraraghavan, T., "Fungal Decolorization of Dye Wastewater: a Review", Biosource Technology, **79**: 251-262, (2001).
- [ 88 ] Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. and Nigam, P., "Remediation of Dyes in Textile Effluent: a Critical Review on Current Treatment Technologies with a Proposed Alternative", Bioresource Technology, **77**: 247-255, (2001).
- [ 89 ] Zhang, F., Knapp, J. S. and Tapley, K.N., "Decolorization of Cotton Bleaching Effluent with Wood Rotting Fungus", Water Res., **3** (4): 919-929, (1999).
- [ 90 ] Watanabe, Y., Sugi, R. and Tanaka, Y., "Enzymatic Decolorization of Melanoidin by *Coriolus* sp. No. 20", Agric. Biol. Chem. **46** (6): 1623-1630, (1982).
- [ 91 ] Miranda, M.P., Benito, G.G., Cristobal, N.S. and Nieto, C.H., "Color Elimination from Molasses Wastewater by *Aspergillus niger*", Bioresource Technol., **57**: 229-235, (1996).
- [ 92 ] Belsare, D.K. and Prasad, D.Y., "Decolorization of Effluent from the



- Bagasse-based Mills by White Rot Fungus, *Schizophillum commune*". Appl. Microbiol. Biotechnol., **28**: 301-304, (1988).
- [ 93 ] Vasdev, K., Kuhad, R.C. and Saxena, R.K., "Decolorization of triphenylmethane dyes by the bird's nest fungus *Cyathus bulleri*", Current Microbiol., **30**: 269-272, (1995).
- [ 94 ] Zhen, Z. and Yu, J., "Stresses on Immobilized *Phanerochaete chrysosporium* Hyphae in Submerged Cultures for Ligninase Production", Can. J. Chem. Eng. **76**: 784-789, (1998).
- [ 95 ] Raghukumar, C., Chandramohan, D., Michel, F.C. and Reddy, C.A., "Degradation of Lignin and Decolorization of Paper Mill Bleach Plant Effluent (BPE) by Marine Fungi", Biotechnol. Lett., **18**: 105-106, (1996).
- [ 96 ] Mou, DG., Lim, K.K. and Shen, H.P., "Microbial Agents for Decolorization of Dye Wastewater", Biotechnol. Adv., **9**: 613-622, (1991).
- [ 97 ] Soares, C.H.L. and Duran, N., "Degradation of Low and High Molecular Mass Fractions of Kraft Mill Effluent by *Trametes villosa*", Environ. Technol., **19**: 883-891, (1998).
- [ 98 ] Sumathi, S. and Phatak, V., "Fungal Treatment of Bagasse Based Pulp and Paper Mill Wastes", Environ. Technol., **19**: 93-98, (1999).
- [ 99 ] Benito, G.G., Miranda, M.P. and De Los Santos, D.E., "Decolorization of Wastewater from an Alcoholic Fermentation Process with *Trametes versicolor*". Bioresource Technol., **61**: 33-37, (1997).
- [ 100 ] Boussaid, A., "Pulp-mill Effluent Color Removal using *Sagemonella striatispora*". Ph.D. Thesis, Oregon State Univ. USA, (1995).
- [ 101 ] Dönmez, G., "Bioaccumulation of the Reactive Textile Dyes by *Candida tropicalis* Growing in Molasses Medium", Enzyme and Microbial Technology, **30**: 363-366, (2002).
- [ 102 ] Brahimi-Horn, M.C., Lim Liang, S.L. and Mou, D.G., "Binding of Textile Azo Dyes by *Mirothecium verrucaria* Orange II, 10B (blue) and RS (red) Azo Dye Uptake for Textile Wastewater Decolorization", J. Ind. Microbiol., **10**: 245-261, (1992).

- [ 103 ] Sayadi, S. and Ellouz, R., "Roles of Lignin Peroxidase and Manganese Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in Decolorization of Olive Mill Wastewater", *Appl. Environ. Microbiol.* **61** (3): 1098-1103, (1995).
- [ 104 ] Schliephake, K., Lonergan, G.T., Jones, C.L. and Mainwaring, D.E., "Decolorization of a Pigment Effluent by *Pycnoporus cinnabarinus* in a Packed Bed Bioreactor", *Biotechnol. Lett.*, **15** (11): 1185-1188, (1993).
- [ 105 ] Zheng, Z. and Obbard, J.P., "Removal of Surfactant Solubilized Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium* in a Rotating Biological Contactor Reactor", *Journal of Biotechnology*, **96**: 241-249, (2002).
- [ 106 ] Banks, C.J. and Parinson, M.E., "The Mechanism and Application of Fungal Biosorption to Color Removal from Raw Water", *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **54**: 192-196, (1992).
- [ 107 ] Nam, S. and Renganathan, V., "Non-enzymatic Reduction of Azo Dyes by NADH", *Chemosphere*, **40**: 351-357, (2000).
- [ 108 ] O'Mahony T., Guibal E. and Tobin, J.M. "Reactive Dye Biosorption by *Rhizopus arrhizus* Biomass", *Enzyme and Microbial Technology*, **31**: 456-463, (2002).
- [ 109 ] Mansur, M., Suarez, T., Fernandez-Larrea, J.B., Brizuela, M.A. and Gonzalez, A.E., "Identification of a Laccase Gene Family in the New Lignin Degrading Basidiomycete CECT 20197", *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 2637-2647, (1997).
- [ 110 ] Schliephake, K., Mainwaring, D.E., Lonergan, G.T., Jones, I.K. and Baker, W.L. "Transformation and Degradation of the Disazo Dye Chicago Sky Blue by a Purified Laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*", *Enzyme and Microbial Tech.*, **27**: 100-107, (2000).
- [ 111 ] Heinfling, A., Martinez, M.J., Martinez, A.T., Bergbauer, M. and Szewzyk, U., "Purification and Characterization of Peroxidases from the Dye-decolorizing Fungus *Bjerkandera adusta*". *FEMS, Microbiol Letters*, **165**: 43-50, (1998).

- [ 112 ] Mielgo, I., Moreira, M.T., Feijoo, G., Lema, J.M., "A Packed-bed Fungal Bioreactor for the Continuous Decolourisation of Azo-dyes (Orange II)", *Journal of Biotechnology*, **89**: 99–106, (2001).
- [ 113 ] Chivukula M. and Renganathan V., "Phenolic Azo Dye Oxidation by Laccase from *Pyricularia oryzae*", *Appl. Environ. Microbiol* **61**: 4374–4377, (1995).
- [ 114 ] Collins, J.P., Field, J.A., Teunissen, P. and Dobson, A.D.W., "Stabilization of Lignin Peroxidases in White Rot Fungi by Tryptophan" *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 2543–2548, (1997).
- [ 115 ] Michel, F.C., Dass, S.B., Grulke, E.A. and Reddy, C.A., "Role of Manganese Peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* in the Decolorization of Kraft Bleach Plant Effluent", *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 2368-2375, (1991).
- [ 116 ] Paszczynski A., Pasti M.B., Goszczynski S., Crawford, D.L. and Crawford, R.L. "Mineralization of Sulfonated Azo Dyes and Sulfanilic Acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*". *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 3598–3604, (1992).
- [ 117 ] Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K.H., Paulo, A.C. and Gübitz, G.M. "Decolorization and Detoxification of Textile Dyes with a Laccase from *Trametes hirsuta*", *Appl. And Environ. Microbiol.*, Aug, 3357-3362, (2000).
- [ 118 ] Soares M.B.G., Amorim M.T. P., Hrdina R. and Costa-Ferreira, M., "Studies on the Biotransformation of Novel Disazo Dyes by Laccase", *Process Biochemistry*, **37**: 581–587, (2002).
- [ 119 ] Kasinath, A., Nototny, C., Sovobodavo, K., Patel, K.C. and Sasek, V., "Decolorization of Synthetic Dyes by *Irpex lacteus* in Liquid Cultures and Packed-bed Bioreactor", *Enzyme and Microbial Technology*, **32**: 167-173, (2003).
- [ 120 ] Sik, S. and Unyayar, A., "*Phanerochaete chrysosporium* and *Funalia trogii* for the Degradation of Cotton Stalk and Their Laccase, Peroxidase, Ligninase and Cellulase Enzyme Activities under Semi-

- solid State Conditions”, Tr.J.of Biology, **22**: 287-298, (1998).
- [ 121 ] ISIS™/DRAW 2.4 MDL Information, Copyright 2001, www.mdli.com
- [ 122 ] Adosinda, M., Martins, M., Ferreira, I.C., Santos, I.M., Queiroz, M.J. and Lima, N., “Biodegradation of Bioaccessible Textile Azo Dyes by *Phanerochaete chrysosporium*”, Journal of Biotechnology, **89**: 91-98, (2001).
- [ 123 ] Mazmancı, M.A., Unyayar, A. and Ekiz, H.I., “Decolorization of Methylene Blue By White Rot Fungus *Coriolus Versicolor*”, FEB, **11** (5): 254-258, (2002).
- [ 124 ] Tereke, M., Mswaka, A.Y., Zvauya, R. and Read, J.S., “Growth, Dye Degradation and Ligninolytic Activity Studies on Zimbabwean White Rot Fungi”, Enzy. Microb. Technol. **28**: 420-426, (2001).
- [ 125 ] Ko, E.-M., Leem Y.-E. and Choi, H. T., “Purification and Characterization of Laccase Isozymes from the White-rot Basidiomycete *Ganoderma lucidum*”, Appl Microbiol Biotechnol. **57**: 98–102, (2001).
- [ 126 ] Xin-jiao, D., Zhi-you, D. and Zhu, C., “Decolorization of Direct Black 22 by *Aspergillus ficuum*”, Journal of Environmental Sciences, **13** (4): 472-475, (2001).
- [ 127 ] Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19<sup>th</sup> ed., American Public Health Asso. Washington DC., USA, (1995).
- [ 128 ] Bullock, C.M., Bicho, P.A., Zhang, Y. and Saddler, J.N., “A Solid Chemical Oxygen Demand (COD) Method for Determining Biomass in Waste Waters”, Water Research, **30** (5): 1280-1284, (1996).
- [ 129 ] Chu, H.C. and Chen, K.M., “Reuse of Activated Sludge Biomass: I. Removal of Basic Dyes from Waste Water by Biomass”, Process Biochemistry, **37**: 595-600, (2002).

- [ 130 ] Rao, P. and Pattabiraman, T.N., "Reevaluation of the phenol-sulphuric acid reaction for estimation of hexoses and pentoses", *Anal. Biochem.*, **181**: 18-22, (1989).
- [ 131 ] Admassu, W., Gupta, A., Korus, R.A., Breese, T. and Paszczynski, A., "Kinetic Characterization of *Phanerochaete chrysosporium* for Growth in a Low Cost Medium and for Degradation of Azo Dye 1" *Advances in Environmental Research*, **2** (4): 397-408, (1999).
- [ 132 ] Robles, A., Lucas, R., Martinez-Canamero, M., Omar, N.B., Pérez, R. and Gálvez, A., "Characterisation of Laccase Activity Produced by the Hyphomycete *Chalara* (syn. *Thielaviopsis*) *paradoxa* CH32", *Enzyme and Microbial Technology*, **31**: 516-522, (2002).
- [ 133 ] Lowry, D.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., "Protein Measurement with the Folin Reagent", *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275, (1951).
- [ 134 ] Bazaraa, W.A., Hamdy, M.K., and Toledo, R., "Bioreactor for Continuous Synthesis of Compactin by *Penicillium cyclopium*", *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **21**: 192-202, (1998).
- [ 135 ] Boynard, C. A. and D'almeida, J. R. M., "Water Absorption by Sponge Gourd (*Luffa Cylindrica*)-Polyester Composite Materials", *Journal of Materials Science Letters*, **18**: 1789 - 1791, (1999).
- [ 136 ] Deveci, T., Ünyayar, A., Mazmancı, M.A. ve Özsoy, H.D., "*Trametes versicolor* dan Elde Edilen Kültür Filtratı ile Remazol Brilliant Blue R' nin Renk Giderimi" *Ulusal Sanayi-Çevre Sempozyumu ve Sergisi*, 450-457, (2001).
- [ 137 ] Deveci, T., Ünyayar, A., Mazmancı, M.A. ve Özsoy, H.D., "Katı Faz Fermentasyonunda Üretilen *Funalia trogii* den Elde Edilen Kültür Filtratı ile Remazol Brilliant Blue R nin Renk Giderimi Üzerine Etkisi", *XII. Biyoteknoloji Kongresi*, 141-146, (2001).
- [ 138 ] Paszczynski, A, Pasti-Grigsby, M.B, Goszczynski, S, Crawford, R.L.S. and Crawford D.L., "Mineralization of Sulfonated Azo Dyes and Sulfanilic Acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces*

- chromofuscus*", Enzyme Microbiol. Technol., **58**: 3598–604, (1992).
- [ 139 ] Young, L. and Yu, J., Ligninase-catalysed Decolorization of Synthetic Dyes, Wat. Res., **31** (5): 1187-1193, (1997).
- [ 140 ] Wang, Y. and Yu, J., "Adsorption and Degradation of Synthetic Dyes on the Mycelium of *Trametes versicolor*", Wat. Sci. Tech., **38** (4-5): 233-238, (1999).
- [ 141 ] Yeşilada, Ö., Ching, S. and Asma, D., "Decolourisation of the Textile Dye Astrazon Red FBL by *Funalia trogii*", Biosource Technology, 155-157, (2002).
- [ 142 ] Yu, J., Wang, X. and Yue, P.L., "Optimal Decolorization and Kinetic Modelling of Synthetic Dyes by *Pseudomonas* strains", Water Res. **35** (15): 3579-3586, (2001).
- [ 143 ] Reddy, C.A., "The Potential for White Rot Fungi in the Treatment of Pollutants", Curr. Opin. Biotechnol., **6**: 320-328, (1995).
- [ 144 ] Yu, J., Wang, X., and Yue, P.L., "Optimal Decolorization and Kinetic Modeling of Synthetic Dyes by *Pseudomonas* Strains", Wat. Res., **35** (15): 3579–3586, (2001).
- [ 145 ] Field, J.A, Jong E., Feijoo-Costa, G. and Bont, J.A.M., "Screening for Lignolytic Fungi Applicable to the Biodegradation of Xenobiotics", Trends Biotechnol., **11**: 44–49, (1993).
- [ 146 ] Orth A.B. and Tien M, "Biotechnology of Lignin Degradation". In: Esser, K, Lemke, PA (eds) The Mycota. II. Genetics and biotechnology. Springer, Berlin Heidelberg New York, 287–302, (1995).
- [ 147 ] Özsoy H.D., "Reaktif Boyar Maddeler Remazol Brilliant Blue R ve Drimaren Blue X3LR'nin Beyaz Çürükçül Funguslarla Renk Giderimi" MEÜ., Fen Bilimleri Enstitüsü, YL Tezi, (2001).
- [ 148 ] Swamy, J. and Ramsay, J., "The Evaluation of White Rot Fungi in the Decoloration of Textile Dyes". Enzyme Microb. Technol., **24**: 130–137, (1999).
- [ 149 ] Knapp, J.S., Zhang, F. and Tapley, K.N., "Decolorization of Orange II by a Wood Rotting Fungus", J. Chem Tech. Biotechnol., **69**: 289-296,

(1997).

- [ 150 ] Bumpus, J.A. and Brock, J.B., "Biodegradation of Crystal Violet by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*", Appl. Environ. Microbiol., **54**: 1143-1150, (1988).
- [ 151 ] Maximo, C., Amorim, M.T.P. and Costa-Ferreira, M., "Biotransformation of Industrial Reactive Azo Dyes by *Geotrichum* sp. CCM1 1019", Enzyme and Microbial Technology, **32**: 145-151, (2003).
- [ 152 ] Archibald, F.S., "A New Assay for Lignin-type Peroxidases Employing the Dye Azure B", Applied and Environmental Microbiology, **58 (9)**: 3110-3116, (1992).
- [ 153 ] Cookson, L.J., "Reability of Poly B-411, a Polimeric Anthraquinone-Based Dye, in Determining the Rot Type Caused by Wood-Inhabiting Fungi", Applied and Environmental Microbiology, **61 (2)**: 801-803, (1995).
- [ 154 ] Schliephake, K. and Lonergan, T., "Laccase Variation During Dye Decolorization in a 200 L Packed Bed Bioreactor", Biotechnology Letters, **18**: 881-886, (1996).
- [ 155 ] Ramsay, J.A. and Nguyen T., "Decoloration of Textile Dyes by *Trametes versicolor* and Its Effect on Dye Toxicity", Biotechnology Letters, **24**: 1757-1761, (2002).
- [ 156 ] Couto, S.R., Rivela, I., Munoz, M.R. and Sanroman, A., "Stimulation of Ligninolytic Enzyme Production and the Ability to Decolourise Poly R-478 in Semi-solid-state Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*", Bioresource Technology, **74**: 159-164, (2000).
- [ 157 ] Balan, D.S.L. and Monteiro, R.T.R., "Decolorization of Textile Dye by Ligninolytic Fungi", Journal of Biotechnol. **89**: 141-145, 2001.
- [ 158 ] Perez, J., Saez, L., Rubia T. and Martinez, J., "*Phanerochaete flavidoalba* Ligninolytic Activities and Decolorization of Partially Biodepuratad Paper Mill Wastes", Wat. Res., **31**: 495-502, (1997).
- [ 159 ] Fu, Y., Viraraghavan, T., "Dye Biosorption Sites in *Aspergillus niger*", Biosource Technology, **82**: 251-262, (2002).

- [ 160 ] Palleria, S. and Chambers, R. P., "Characterization of a Caalginate-Immobilized *Trametes versicolor* Bioreactor for Decolourization and AOX reduction of paper mill effluents", *Biores. Technol.*, **60**: 1-8, (1997).
- [ 161 ] Martin, C. and Manzanares, P., "A study of the Decolorization of Straw Soda-puping Effluents by *Trametes versicolor*", *Bioresource Technology*, **47**: 209-214, (1994).
- [ 162 ] Chen, K-C., Wu, J-Y, Liou D-J. and Hwang, S-C.J., "Decolorization of the Textile Dyes by Newly Isolated Bacterial Strains", *Journal of Biotech.*, **101**: 57-68, (2003).
- [ 163 ] Nyanhongo, G.S., Gomes, J., Gubitz, G.M., Zvauya, R., Read, J. and Steiner, W., "Decolorization of Textile Dyes by Laccases from a Newly Isolated Strain of *Trametes modesta*", *Water Research*, **36**: 1449-1456, (2002).
- [ 164 ] Nagel, F.J., Oostro, J. and Tramper, J., "Improved model system for solid state fermentation : effect of pH, nutrients, and buffer on fungal growth rate", *Process Biochemistry*, **35**: 69-75, (1999).
- [ 165 ] Swamy, J. and Ramsay, J., "Effects of Glucose and  $\text{NH}_4^+$  Concentrations on Sequential Dye Decoloration by *Trametes versicolor*", *Enzyme Microb. Technol.*, **25**: 278-284, (1999).
- [ 166 ] Sumathi, S. and Manju, B.S., "Uptake of Reactive Textile Dyes by *Aspergillus foetidus*", *Enzyme and Microbial Technology*, **27**: 347-355, (2000).
- [ 167 ] Kapdan, I.K. and Kargi, F., "Biological Decolorization of Textile Dyestuff Containing Wastewater by *Coriolus versicolor* in a Rotating Biological Contactor", *Enzyme and Microbial Technology*, **30**: 195-199, (2002).
- [ 168 ] Novotny, C., Rawal, B., Bhatt, M., Patel, M., Sasek, V. and Molitoris H.P., "Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for Decolorization of Chemically Different Dyes", *Journal of Biotechnol.*, **89**: 113-122, (2001).
- [ 169 ] Hatvani, N. and Mecs, I., "Effect of the Nutrient Composition on Dye



- Decolorisation and Extracellular Enzyme Production by *Lentinus Edodes* on Solid Medium”, *Enzyme and Microbial Technology*, **30**: 381–386, (2002).
- [ 170 ] Diana, S., Orlandi, M., Bestetti, G., Wiik, C. and Elegir, G., “Degradation of  $\beta$ -5 Lignin Model Dimers by *Ceriporiopsis subvermispora*”, *Enzyme and Microbial Technology*, **30**: 499-505, (2002).
- [ 171 ] Panswad, T. and Luangdilok, W., “Decolorization of Reactive Dyes with Different Molecular Structures under Different Environmental Conditions”, *Wat. Res.*, **34** (17): 4177-4184, (2000).
- [ 172 ] Rosa, E.V.C., Smionatto, E.L., Sierra, M.M.S., Bertoli, S.L. and Radetski, C.M., “Toxicity-based Criteria for the Evaluation of Textile Wastewater Treatment Efficiency”, *Environ. Toxicol. Chemist.*, **20** (4): 839-845, (2001).
- [ 173 ] Kaur, A., *Environ. Mol. Mutagen, (J)*, **22** (3): 188-194, (1993).
- [ 174 ] Sobti, R.C., *Med. Sci. Res., (J)*, **20** (10): 373-380, (1992).
- [ 175 ] Al-sabti, K., “Chlorotriazine Reactive Azo Red 120 Textile Dye Induces Micronuclei in Fish”, *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **47**: 149-155, (2000).
- [ 176 ] Odeigah, P.G.C. and Osanyipeju, A.O., “Genotoxic Effects of Two Industrial Effluents and Ethyl Methane Sulfonate in *Clarias lazera*”, *Fd. Chem. Toxicol.*, **33** (6): 501-505, (1995).
- [ 177 ] Yun, C. and Qi-xing, Z., “Ecological Toxicity of Reactive X-3B Red Dye and Cadmium Acting on Wheat (*Triticum aestivum*)”, *Journal of Environmental Sciences*, **14** (1): 136-140, (2002).
- [ 178 ] Chagas, E.P. and Durrant, L.R., “Decolorization of Azo Dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*”, *Enzyme and Microbial Technology*, **29**: 473-477, (2001).
- [ 179 ] Newcombe, D., Paszczyński, A., Gajewska, W., Kröger, M., Feis, G. and Crawford, R., “Production of Small Molecular Weight Catalysts and the Mechanism of Trinitrotoluene Degradation by Several *Gloeophyllum* species”, *Enzyme and Microbial Technology*, **30**: 506–

517, (2002).

- [ 180 ] Gottlieb, A., Shaw, C., Smith, A., Wheatley, A. and Forsythe, S., "The Toxicity of Textile Reactive Azo Dyes after Hydrolysis and Decolourisation", *Journal of Biotechnology*, **101**: 49-56, (2003).
- [ 181 ] Jarosz-Wilkolazka, A., Kochmanska-Rdest, J., Malarczyk, E., Wardas, W. and Leonowicz, A., "Fungi and Their Ability to Decolourize Azo and Anthraquinonic Dyes", *Enzyme and Microbial Technology*, **30**: 566-572, (2002).
- [ 182 ] Ogbanna, J.C., Tomiyama, S. and Tanaka, H., "Development of a Method for Immobilization of Non-flocculating cells in Loofa (*Luffa cylindrical*) Sponge", *Proc. Biochem.*, **31**: 737-744, (1996).
- [ 183 ] Furuya, T., Koge, K. and Orihara, Y., "Long-term Culture and Caffeine Production of Immobilized Coffee (*Coffea arabica* L.) Cells in Polyurethane Foam", *Plant Cell Reports*, **9**: 125-128, (1990).
- [ 184 ] Iborra, J.L., Guardiola J., Montaner, S., Canovas, M. and Manjon, A., "Enhanced Accumulation of Anthocyanins in *Vitis vinifera* Cells Immobilized in Polyurethane Foam", *Enzyme Microb. Technol.*, **16**: 416-419, (1994).
- [ 185 ] Bhattacharya, P., Dey, S. and Bhattacharya, B.C., "Use of Low Cost gelling Agents and Support Matrices for Industrial Scale Plant Tissue Culture", *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **37**: 15-23, (1994).
- [ 186 ] Ogbanna, J.C., Liu, Y.C., Liu, Y.K. and Tanaka, H., "Loofa (*Luffa cylindrical*) Sponge as a Carrier for Microbial Cell Immobilization", *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **78**: 437-442, (1994).
- [ 187 ] Iqbal, M. and Zafar, S.I., "Vegetable Sponge: A New Immobilization Medium for Plant Cells", *Biotechnol. Tech.*, **7**: 323-324, (1993).
- [ 188 ] Liu, Y.K., Seki, M., Tanaka, H. and Furusaki, S., "Characteristic of Loofa (*Luffa cylindrica*) Sponge as a Carrier for Plant Cell Immobilization", *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **85** (4): 416-421, (1998).
- [ 189 ] Liu, K, Xu F and Erikssen K-EL., "Comparison of Fungal Laccases and Redox Mediators in Oxidation of a Non-phenolic Lignin Model

- Compound”, *Appl Environ Microbiol.*, **65**: 2654–2660, (1999).
- [ 190 ] Slokoska, L.S., Angelova, M.B., “Immobilization of Polymethylgalacturonase Producing *Aspergillus niger* on *Luffa* Sponge Material”, *Z. Naturforsch.* **53c**: 968–972, (1998).
- [ 191 ] Chang, S.C., Lee, M.S., Li, C.H. and Chen, M.L., “Dietary Fibre Content and Composition of Vegetables in Taiwan Area”. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* **4**: 204-210, (1995).
- [ 192 ] 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).
- [ 193 ] 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* sp. and *Phanerochaete chrysosporium*”, *Enzyme Microb. Technol.*, **13**: 378–384, (1991).
- [ 194 ] Zhang, F. and Yu, J., “Decolouration of Acid Violet 7 with Complex Pellets of White Rot Fungus and Activated Carbon”, *Bioprocess Engineering*, **23**: 295-301, (2000).
- [ 195 ] Claus, H., Faber, G. and König, H., “Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Original Paper, Published online: 26 July 2002.
- [ 196 ] Calvo, A.M., Copa-Patino, J.L., Alonso, O. and Gonzales, A.E., “Studies of the Production and Characterization of Laccase Activity in Basidiomycete *Coriolopsis gallica*, an efficient decolorizer of alkaline effluents”, *Arch. Microbiol.*, **171**: 31-36, (1998).
- [ 197 ] Galhaup, C., Wagner, H., Hinterstoisser, B. and Haltrich, D., “Increased Production of Laccase by the Wood-degrading Basidiomycete *Trametes pubescens*”, *Enzyme and Microbial Technology*, **30**: 529–536, (2002).
- [ 198 ] Coonely, A., Smyth, W.F. and McMullan, G., “Metabolism of the Phthalocyanine Textile Dye Remazol Turquoise Blue by *Phanerochaete chrysosporium*”, *FEMS Microbiology Letters*, **179**: 333-337, (1999).

- [ 199 ] Perata-Zamora, P., Pereira, C.M., Tiburtius, E.R.L., Moraes, S.G., Rosa, M.A., Minussi, R.C. and Duran, N., “Decolorization of Reactive Dyes by Immobilized Laccase”, *App. Catalysis B: Environmental*, **12 (95)**: 1-14, (2002).
- [ 200 ] Vandertol –Vanier, H.A., Vazquez-Duhalt, R., Tinoco, R., and Pickard, M.A., “Enhanced activity by poly(ethylene glycol) modification of *Corioloopsis gallica* laccase”, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **29**: 214 – 220, (2002).
- [ 201 ] Shim, S.S. and Kawamoto, K., “Enzyme Production Activity of *Phanerochaete chrysosporium* and Degradation of Pentachlorophenol in a Bioreactor”, *Water Research*, **36**: 4445–4454, (2002).
- [ 202 ] Motulsky, H.J., *Analyzing Data with GraphPad Prism*, (1999), GraphPad Software Inc., San Diego CA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).
- [ 203 ] Cengiz, S. and Cengiz M., “Enzim Bilgisi” (Trewor Palmer 'Understanding Enzymology' 1990) çevirisi 20 Bölüm 528 sayfa, Bilimsel ve Teknik Yayınlar Çeviri Vakfı Basımevi İstanbul, (1993).

## ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında İskenderun'da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi İskenderun'da tamamladım. 1992 yılında İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü bitirdim. 1997 yılında Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı'nda yüksek lisansımı tamamladım. Aynı yıl doktora öğrenimime başladım. 1994 yılından itibaren Mersin Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümü'nde Araştırma görevlisi olarak görev yapmaktayım. Evli ve bir çocuk babasıyım.

### Yayınlar ve Bildiriler

- Mazmancı, M.A., Ünyayar, A., Ekiz, H.I., "Decolorization of Methylene Blue By White Rot Fungus *Coriolus versicolor*", FEB, 11 (5): 254-258, (2002).
- Özsoy H.D., Ünyayar A., Mazmancı, M.A., Deveci, T., "Tekstil Boyar Maddesi Remazol Brilliant Blue R' nin Beyaz Çürükçül Funguslarla Renk Giderimi", IV. Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi, 168-174, 2001.
- Özsoy, H.D., Ünyayar, A., Mazmancı, M.A., Deveci, T., "Drimaren Blau X3LR'nin Beyaz Çürükçül Funguslar *Funalia trogii* ve *Phanerochaete chrysosporium* ME446 Tarafından Renk Giderimi", Ulusal Sanayi-Çevre Sempozyumu ve Sergisi, 440-449, 2001.
- Deveci, T., Ünyayar, A., Mazmancı, M.A., Özsoy, H.D., "Katı Faz Fermentasyonunda Üretilen *Funalia trogii*'den Elde Edilen Kültür Filtratı ile Remazol Brillant Blue R nin Renk Giderimi Üzerine Etkisi", XII. Biyoteknoloji Kongresi, 141-146, 2001.
- Deveci, T., Ünyayar, A., Mazmancı, M.A., Özsoy, H.D., "*Trametes versicolor*'dan elde edilen kültür filtratı ile Remazol Brillant Blue R'nin Renk Giderimi", Ulusal Sanayi-Çevre Sempozyumu ve Sergisi, 25-27 Nisan 2001, Mersin.
- Mazmancı, M.A., Ünyayar, A., "Beyaz Çürükçül Fungus *Funalia trogii* ile Metilen Mavisinin Biyolojik Yıkımı", XIII. Ulusal Biyoloji Kongresi, İstanbul, 17-20 Eylül 1996.